

Петр Петрович Степаненко более тридцати лет преподает микробиологию в Московском Государственном университете прикладной биотехнологии, автор свыше восьмидесяти научных трудов, учебников, учебных пособий, примерных и рабочих учебных программ.

УЧЕБНИК
ДЛЯ СТУДЕНТОВ ВУЗОВ

Студенческое
Читальный зал

П. П. СТЕПАНЕНКО

МИКРОБИОЛОГИЯ
МОЛОКА И МОЛОЧНЫХ
ПРОДУКТОВ

Рекомендовано Советом Учебно-методического объединения по образованию в области переработки сырья и продуктов животного происхождения в качестве учебника для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности "Технология молока и молочных продуктов"

МОСКВА 1999

В 269 ББК 36.1я73
79

Рецензенты: И.Я. Коль — доктор медицинских наук, профессор, академик РАЕН, руководитель лаборатории по изучению питания здоровых детей;
С.А. Шеселева — кандидат медицинских наук, руководитель лаборатории санитарно-пищевой микробиологии и микрoэкологии (Институт питания РАМН);

А.Н. Панин — доктор ветеринарных наук, профессор, чл.-корр. РАСХН, зав. лабораторией контроля и стандартизации пробитиков и биологически активных ферментов, директор ВГНКИ;

А.М. Шешелова — доктор технических наук, профессор, зав. кафедрой технологии молока и молочных продуктов МГУП

ISBN-5-901091-08-6

Степаненко П. П.

С-79 Микробиология молока и молочных продуктов: Учебник для ВУЗов. — Сергиев Посад: ООО «Все для Вас-Подмосковье», 1999. — 415 с.: ил. — (Учебники и учебные пособия для высших учебных заведений)

В учебнике изложены основные сведения по систематике, морфологии, физиологии и генетике микроорганизмов. Рассмотрено влияние физических, химических и биологических факторов на развитие микробов, приведены биологические свойства основных физиологических групп микроорганизмов, оказывающих влияние на качество молока и молочных продуктов. Очень подробно представлены систематика и свойства молочнокислых и бифидобактерий. При этом использованы материалы последнего издания «Определителя бактерий Бердж» (1994).

Изложены основы промышленной гигиены и санитарии на предприятиях молочной промышленности, а также организация микробиологического контроля производства молока и молочных продуктов. Микробиологические нормативы приведены в соответствии с Санитарными правилами и нормами (СанПиН 2.3.2.560-96). Дано понятие о пробитиках и механизм их действия.

Учебник рекомендован для студентов высших учебных заведений. Может с успехом использоваться микробиологами промышленности, научно-исследовательских учреждений, аспирантами, преподавателями и студентами техникумов и др.

Пожелания и отзывы просьба направлять по адресу: 109316, Москва, ул. Талалыхина 33, Московский Государственный университет прикладной биотехнологии, кафедра микробиологии.

Данный учебник является интеллектуальной собственностью автора. Ни одна часть данного издания, включая название и художественное оформление, не может перерабатываться, передаваться, ксерокопироваться, воспроизводиться или множиться каким-либо иным способом без его согласия. Все права на книгу находятся под охраной автора.

Посвящается светлой памяти незабвенного Учителя
Сергея Яковлевича Любашенко

ВВЕДЕНИЕ

Предмет и содержание курса микробиологии. Микробиология (от греч. *micros* — малый, *bios* — жизнь, *logos* — учение) — наука о мельчайших, невидимых невооруженным глазом организмах, названных микробами или микроорганизмами. Она изучает их систематику, строение, физиологию, генетику, методы их выявления и распознавания.

К микроорганизмам относят бактерии, дрожжевые и нитчатые грибы (плесени), простейшие одноклеточные животные организмы и ультрамикроскопические существа — вирусы. Изучением групп микроорганизмов занимаются области микробиологии — бактериология, микология, протозология и вирусология.

Микроорганизмы имеют повсеместное распространение, что свидетельствует об их значительной роли в природе и жизни человека. Они играют важную роль в повышении плодородия почвы, образовании каменного угля и нефти и ряде других процессов, протекающих в природе. С помощью микроорганизмов происходят важные производственные процессы: хлебопечение, производство молочных продуктов, органических кислот, спирта, вина, пива, ферментов, гормонов, антибиотиков и других веществ.

Наряду с полезными микроорганизмами существуют группы возбудителей порчи пищевых продуктов, патогенных или болезнетворных микробов — возбудителей различных заболеваний человека, животных, растений и насекомых.

В соответствии с потребностями общества микробиологию подразделяют на общую и специальную, или частную, которую, в свою очередь, делят на сельскохозяйственную, техническую (промышленную), медицинскую, санитарную, ветеринарную, космическую.

Общая микробиология изучает строение, общие закономерности жизнедеятельности всех групп микроорганизмов и их распространение в природе. Она является обязательным разделом всех микробиологических дисциплин.

Сельскохозяйственная микробиология изучает значение микроорганизмов в почвообразовании, в повышении плодородия почвы, в литании растений. Она разрабатывает методы получения и применения бактериальных удобрений, способы консервирования кормов, методы борьбы с фитопатогенными микроорганизмами.

Техническая микробиология исследует микроорганизмы, применяемые в производстве пищевых продуктов, антибиотиков, спиртов, ферментов, витаминов и других органических веществ микробного происхождения.

Микробиология молока и молочных продуктов является частью технической микробиологии, она изучает роль микробов в превращении составных веществ молока, а также свойства различных физиологических групп микроорганизмов, влияющих на качество молока и молочных продуктов. В частности, микробиология молока и молочных продуктов изучает производственно-ценные и технически вредные микроорганизмы - возбудители порчи молока и молочных продуктов, а также патогенные бактерии, которые могут присутствовать в молоке и молочных продуктах.

Медицинская микробиология изучает патогенные и условно-патогенные для человека микроорганизмы, а также закономерности их взаимодействия с организмом человека.

Ветеринарная микробиология изучает возбудителей инфекционных болезней животных.

Санитарная микробиология изучает микрофлору окружающей среды с точки зрения возможного отрицательного или благоприятного влияния микробов на окружающую среду и здоровье человека, разрабатывает микробиологические показатели санитарно-гигиенического нормирования объектов внешней среды, а также мероприятия по их обезвреживанию, разрабатывает методы контроля эффективности этих мероприятий.

Космическая микробиология изучает особенности микрофлоры человека и окружающей среды в космических кораблях, а также условия выживания и распространения микроорганизмов в космосе.

Новый этап в развитии микробиологии - *биотехнология*. Эта наука, возникшая на стыке нескольких биологических дисциплин: микробиологии, генетики, вирусологии, растениеводства, имеющая уникальные возможности практического использования результатов исследований в этой области. Потенциал биотехнологии направлен не только на интенсификацию и улучшение традиционных технологий, но и на создание принципиально новых, объектами которых являются микроорганизмы, полученные методами селекции и генной инженерии.

Важные аспекты биотехнологии - улучшение штаммов промышленных микроорганизмов, получение микробных ферментов, ароматических веществ, которые могут использоваться в молочной, мясной и пищевой промышленности.

История развития микробиологии. В конце XVII столетия голландский натуралист А. Левенгук (1632-1723) сконструировал микроскоп, при помощи которого ему удалось увидеть микробы, точно описать и зарисовать их. Свои многочисленные наблюдения он отразил в книге «Тайны природы, открытые Антонием Левенгуком», вышедшей в 1695 г.

Заслуга Левенгука состоит в том, что он открыл завесу над тайнами природы, привлек внимание ученых к новому миру живых существ, изучение которых обещало заманчивую и интересную перспективу (до Левенгука микробы видел в крови больных людей А. Кирхер). Это были истоки современной науки о микробах — микробиологии. После открытия Левенгука ученые, описывая новые микробы (этот период развития микробиологии поэтому и получил название описательного или морфологического), не понимали ни их роли в природе, ни значения для человека.

С появлением работ французского ученого Луи Пастера (1822-1895) начинается новый этап в развитии микробиологии. Его работы дали возможность всесторонне изучать жизнедеятельность микробов, т. е. их физиологию. Поэтому новый этап развития науки получил название физиологического.

В 1857 г. Л. Пастер установил, что молочнокислое брожение происходит в результате жизнедеятельности молочнокислых бактерий, а спиртовое брожение вызывает дрожжи.

Изучая маслянокислое брожение, ученый открывает явление анаэробноз. До Л. Пастера незлым законом являлось положение, высказанное Лавуазье: жизнь без кислорода невозможна. Л. Пастер установил, что маслянокислые бактерии развивались без кислорода воздуха. После этого все микроорганизмы по типу дыхания разделили на две группы - аэробы и анаэробы.

Л. Пастер открыл также возбудителей уксуснокислого брожения, которые развивались в пленке на поверхности вина и оказались типичными аэробами, т. е. развивались только в присутствии кислорода воздуха.

Доказывая микробную природу брожения, Л. Пастер указал метод борьбы с «болезнями» вина и пива (1865), который применяется в настоящее время и известен под названием «пастеризация». Сущность этого метода заключается в нагревании продукта до 65-80 °С, в результате чего многие микроорганизмы погибают, но пищевая ценность продуктов не снижается.

Л. Пастер доказал, что возбудителями гниения различных продуктов являются микроорганизмы. Он открыл возбудителей болезней шелковичных червей, ряда заболеваний людей и животных. Л. Пастер установил возможность аттенуации (ослабления болезнетворности) микробов, что

легло в основу методов профилактики инфекционных болезней и явилось началом иммунологии. Он создал вакцины против сибирской язвы, рожи свиней, холеры кур. Л. Пастер совершил гражданский подвиг, так как им была создана вакцина против бешенства не только до открытия вируса бешенства, а вирусов вообще. Исследования Л. Пастера послужили основой для развития медицинской, ветеринарной, технической микробиологии, учения об иммунитете.

Создавалась новая наука, которую Л. Пастер назвал «микробия», ныне - микробиология, задачей которой по замыслу великого ученого являлось широкое изучение микробов и их роли в природе и жизни человека. Поэтому Л. Пастер считается основоположником современной микробиологии.

Одним из создателей современной микробиологии признан также немецкий ученый Р. Кох (1843-1910). С развитием науки возникла необходимость в получении чистой культуры и изучении свойств и значения вида микроба в отдельности. Р. Кох успешно решил проблему получения чистых культур микробов. Это событие совершило переворот в методике и технике микробиологических исследований. Он предложил использовать плотные искусственные питательные среды, применяя для их получения питательный желатин (1887 г.). При посеве на эти среды отдельные клетки микроорганизмов размножались на поверхности плотной среды, образуя так называемые колонии - скопления многих тысяч микробов, видимые невооруженным глазом, как правило, выросшие из одной бактериальной клетки.

Успеху изучения микробов способствовало также введение Р. Кохом в бактериологическую практику метода окраски микробов анилиновыми красителями, что позволяло увидеть четкие контуры клеток микробов и различать их структурные особенности. Р. Кох усовершенствовал микроскопию микробов, применив иммерсионную систему; благодаря этому увеличил разрешающую способность микроскопов, ввел в практику микрофотографию. Р. Кох открыл явление споробразования у бактерий, изучил защитную функцию спор возбудителя сибирской язвы. В 1882 г. он открыл возбудителя туберкулеза, в 1883 г. - возбудителя холеры. В 1905 г. ему была присуждена Нобелевская премия. Р. Кох был ярким приверженцем теории мономорфизма, т. е. считал, что виды микроорганизмов являются постоянными и неизменными.

В одном ряду с первооткрывателями стоит имя И. И. Мечникова (1845-1916) русского естествоиспытателя, доктора зоологии, лауреата Нобелевской премии (1908 г.). Он был признан одним из основоположников отечественной микробиологии. И. И. Мечников один из первых установил,

что защита организма животного и человека от патогенных микробов, их вредоносного воздействия представляет собой сложную биологическую реакцию, которая обуславливается в первую очередь фагоцитозом, т. е. растворением микробов клетками «белой крови» - лейкоцитами. Он также считал, что старость человека является следствием хронически развивающегося отравления организма продуктами обмена гнилостных бактерий, обитающих в кишечнике человека. И. И. Мечников открыл явление антагонизма. Для подавления развития гнилостных микробов он рекомендовал использовать молочнокислые бактерии, ежедневно употребляя для этой цели кисломолочные продукты.

Несмотря на большие научные достижения, в конце второй половины XIX столетия микробиологи столкнулись с неразрешимой проблемой. При многих, безусловно, инфекционных заболеваниях они не находили микроорганизмов-возбудителей, что привело к установившимся взглядам о том, что без микробов нет инфекционных болезней. Это несоответствие разрешил русский ботаник Д. И. Ивановский (1864-1920), открывший в 1892 г. невидимых под обычным микроскопом ультрамикробов, названных вирусами. Д. И. Ивановский установил, что размер вирусов находится за пределами разрешающей способности оптических микроскопов и они являются внутриклеточными паразитами, вследствие чего не растут на питательных средах, применяемых для культивирования других микроорганизмов. Д. И. Ивановский является основоположником современной вирусологии.

Основоположник отечественной микробиологии молока и молочных продуктов - С. А. Королев (1874-1932). С его именем связаны первые крупные научные открытия в области микробиологии молока в нашей стране. Им была создана первая школа отечественных микробиологов молочной промышленности. Он провел широкую программу исследований микробиологических процессов по основным отраслям молочного производства. С. А. Королев выявил закономерность молочнокислого процесса и динамику изменения различных групп микроорганизмов при этом. Он установил закономерность смены фаз микрофлоры молока в процессах производства всех молочных продуктов. Впервые в России применил закваски, т. е. чистые культуры молочнокислых бактерий.

С. А. Королевым была проведена большая работа по выяснению причин возникновения пороков кисломолочных продуктов. В 1932 г. С. А. Королевым был издан фундаментальный труд «Основы технической микробиологии молочного дела», который служил настольной книгой для микробиологов и специалистов молочной промышленности на протяжении десятилетий. Он не потерял своей актуальности и в настоящее время.

СИСТЕМАТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

1.1. МЕСТО БАКТЕРИЙ В ЖИВОЙ ПРИРОДЕ

В связи с тем, что бактерии и синезеленые водоросли (цианобактерии) имеют сходство в строении клеток, а растения и синезеленые водоросли обладают способностью к фотосинтезу, эти три группы живых организмов по традиции относили к объектам ботаники и поэтому утверждали, что бактерии являются, как правило, одноклеточными растениями.

В клетках различных живых существ ядерное вещество, или генофор, может быть не отделено от цитоплазмы ядерной мембраной (бактерии и синезеленые водоросли) или иметь собственную ядерную оболочку (растения, грибы, животные и простейшие). На этой основе различают прокариотический и эукариотический типы клеточной организации. В связи с этим организмы подразделяют на прокариоты и эукариоты. К прокариотам относятся бактерии.

Наиболее существенные особенности прокариот следующие:

- генофор (нуклеотид, нуклеоплазма, ядро) состоит из двойной спиральной нити дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Он не отделен от цитоплазмы какой-либо мембраной, поэтому генофор иногда называют диффузным ядром;
- отсутствие внутриплазматических органелл, окруженных элементарной мембраной, что маскирует их разнообразие;
- рибосомы малого размера рассеяны в цитоплазме, а не расположены на поверхности мембран, как у эукариот.

У эукариот ядро имеет собственную ядерную мембрану, поэтому его называют дифференцированным. Помимо этого имеются признаки, характерные для многих, но не для всех прокариот.

В состав клеточных стенок прокариот входит пептидогликан (муреин или мукопептид). Наличие пептидогликана не является особенностью всех прокариот, его нет у лишенных клеточной стенки микоплазм.

Характерными органами движения (плавания) служат жгутики,

которые встречаются у бактерий определенных видов. Среди прокариот много обязательных анаэробов, среди эукариот их почти нет.

В отличие от эукариот некоторые бактерии способны к фиксации (окислению) атмосферного азота.

В то же время нет никаких данных о существовании у прокариот эндоцитоза (способности захватывать частицы в пищевые вакуоли в качестве добычи), весьма характерного для эукариотических клеток.

Предложено выделить на высшем уровне прокариоты (доядерные микроорганизмы) в отдельное царство Procariotae наряду с царствами растений и животных.

1.2. ПОНЯТИЕ О СИСТЕМАТИКЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Микроорганизмы, как и все живые существа, обладают определенными признаками, с помощью которых их идентифицируют (от лат. *identificatio* — отождествление), т. е. распознают, или дифференцируют (от лат. *differentialis* — отличительный) и разделяют на устойчивые, отчетливо различающиеся группы.

Систематика (от греч. *systematicos* — упорядоченный, относящийся к системе) — это наука о разнообразии и сходстве объектов органического мира, основанном на общности происхождения и генетических связей различных групп живых существ.

Основными разделами систематики являются классификация и номенклатура.

Под классификацией понимают закономерность распределения микроорганизмов по систематическим группам, которые называют категориями, уровнями, рангами и таксонами, а классификацию поэтому называют еще таксономией.

Номенклатура обуславливает принципы определения названия для установленных таксонов. Основным таксоном, т. е. основной классификационной единицей в системе живых организмов, является вид.

Вид — это совокупность особей микроорганизмов, сходных по биологическим свойствам, имеющих единые происхождение и генотип, обладающих наследственно закрепленной способностью вызывать в среде естественного обитания определенные специфические процессы (изменения).

Виды, обладающие многими общими признаками, объединяют в таксоны более высокого уровня, называемые родами, которые, в свою очередь, группируются в таксоны еще более высокого порядка — семейства и т. д. Такое расположение соподчиненных таксонов в восходящий ряд составляет иерархическую систему классификации, или таксономическую иерархию. Основанием этой системы являются отдельные особи, а ее вершиной — один всеобъемлющий

таксон царство.

В бактериологии используют следующие основные уровни таксономической иерархии: царство (Regnum), отдел (Divisio), класс (Klassis), порядок (Ordo), семейство (Familia), род (Genus), вид (Species).

Кроме перечисленных имеются промежуточные таксоны подцарство, подотдел, подкласс, подпорядок, подсемейство, подрод, подвид.

Названия бактерий (включая актиноциеты) регламентируются Международным кодексом номенклатуры бактерий.

Названия микроорганизмов пишут буквами латинского алфавита и подчиняют правилам латинской грамматики, т. е. они являются латинскими, или латинизированными, если даже заимствованы из других языков.

Названия таксонов, у которых ранг выше вида, состоят только из одного слова и поэтому относятся к единичным, или унитарным. Некоторые таксоны имеют стандартные окончания. Например, названия порядков бактерий должны оканчиваться на -ales (Bacteriales), семейства на -aceae (Enterobacteriaceae), родов на -us, um (Bacillus, Streptococcus, Clostridium, Lactobacterium).

Для обозначения видов микроорганизмов применяют бинарную (биномиальную), или двойную, номенклатуру, т. е. названия видов состоят из двух слов и поэтому относятся к двойным, или бинарным. Первое слово обозначает название рода, к которому этот вид принадлежит, второе - вид, например *Lactobacterium acidophilum* (молочная палочка кислотолюбивая), *Streptococcus thermophilus* (стрептококк теплолюбивый). Родовое слово пишут с прописной буквы, видовое - со строчной. После того как полное название вида было упомянуто в тексте, первое слово (родовое название) можно сократить при последующем упоминании.

Если при изучении бактерий обнаруживают отклонения от типичных видовых свойств, то такие культуры рассматривают как подвиды. Название подвида состоит из полного названия вида, к которому он относится, и следующего за ним слова, обозначающего сам подвид, перед которым сокращенно указывают промежуточный таксон subspecies (подвид). Например, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* - лактококк молочный, подвид сливочный. Названия подвидов состоят из трех слов (исключая слово subspecies подвид) и называются поэтому тринерными.

Кроме подвида различают также инфраподвидовые подразделения (варианты) микроорганизмов, которые не располагаются в порядке классификационных рангов. Они основаны на различии особей какими-либо незначительными наследственными свойствами: антигенными - серовар (серотип), морфологическими - морфовар, химическими -

хемовар, физиологическими - биовар, патогенностью - патовар, отношением к бактериофагам - фаговар.

В микробиологии широко применяют термины «штамм» и «клон». Штамм - более узкое понятие, чем вид. Штаммами называют различные культуры одного и того же вида микроорганизма, выделенные из конкретного источника. Если микроорганизм выделен из воды, его называют водным штаммом, из сыра - сырным и т. п.

Они могут различаться отдельными незначительными признаками, например интенсивностью кислотообразования, устойчивостью к лекарственным и дезинфицирующим препаратам, способностью синтезировать ароматические вещества и антибиотики и др.

Клон означает раскладку микроорганизмов, или, как принято в микробиологии, культуру (популяцию), являющуюся потомством одной клетки. Популяция микробов, состоящая из особей одного вида, называется чистой или аксенической культурой, а состоящая из особей разных видов - смешанной.

1.3. КЛАССИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ

Все бактерии объединены в царство прокариот, состоящее из двух отделов: автотрофных фотобактерий и гетеротрофных хемобактерий, в каждый из которых входит 3 класса бактерий (схема 1).

Первый отдел объединяет классы: 1-й - синезеленые фотобактерии (цианобактерии), 2-й - пурпурные (розовые) и 3-й - зеленые фотобактерии.



Схема 1. Классификация бактерий

Во второй отдел входят следующие классы: 1-й - собственно бактерии (зубактерии), 2-й - риккетсии (внутриклеточные бактерии), 3-й - микоплазмы (бактерии, лишенные клеточной стенки).

Микроорганизмы первого отдела (сапротитные фототрофные микроорганизмы) широко распространены в природе. Они находятся в

почве, пресной и морской воде, сточных водах, богатых органическими веществами. Для молочной промышленности эта группа бактерий значения не имеет.

Гетеротрофные хемобактерии потребляют для своего развития энергию химических реакций, происходящих с использованием органических веществ. Они являются индифферентными к свету. Объектом изучения курса «Микробиология молока и молочных продуктов» являются в основном собственно бактерии.

Предложена также классификация бактерий, основанная на строении и составе клеточной стенки. При этом царство прокариот подразделяется на 4 отдела: Firmicutes, Gracilicutes, Tenericutes, Mendosicutes.

К фирмикутным (от лат. *firmus* – крепкий, *cutes* – кожа) относятся грамположительные бактерии, в клеточной стенке которых содержатся пептидогликан, тейхоевые и тейхуроновые кислоты.

Грациликутными (от лат. *gracilis* – тонкий) являются грамотрицательные бактерии, не содержащие в клеточной стенке пептидогликана, тейхоевых и тейхуроновых кислот.

Отдел тенирикутных бактерий (от лат. *teneris* – мягкий, нежный) представляют собой микроорганизмы, которые в процессе эволюции утратили клеточную стенку и окружены цитоплазматической мембраной. К ним относятся микоплазмы и некоторые другие прокариоты.

Мендозикутные (от лат. *mendosis* – имеющий дефект) не содержат в клеточной стенке пептидогликана и мураминовой кислоты. Их клетки покрыты макромолекулами протеина и гетерополисахаридами. Большинство мендозикутных бактерий являются неспорообразующими подвижными анаэробами.

В девятом издании «Определителя бактерий Берджи» все прокариоты с целью дифференциации (но не классификации) разделены по фенотипическим (генетическим) признакам на четыре основные категории:

1. Грамотрицательные зубактерии (собственно бактерии), имеющие клеточные стенки.
2. Грамположительные зубактерии, имеющие клеточные стенки.
3. Микоплазмы.
4. Архебактерии (преимущественно почвенные или водные микроорганизмы).

1.4. КЛАССИФИКАЦИЯ ГРИБОВ

Эту группу организмов ранее относили к растениям. В настоящее время грибы, насчитывающие около 100 тыс. видов, выделены в самостоятельное царство, поскольку по ряду биологических свойств они отличаются от бактерий, растений и животных.

Клетки грибов в отличие от бактерий являются эукариотами. От растений их отличают отсутствие хлорофилла и использование для питания готового органического вещества, т. е. по типу питания они являются гетеротрофами. Запасным питательным веществом у грибов служит гликоген, а не крахмал, характерный для большинства растений. По способу питания (всасывание) и неограниченному росту грибы приближаются к растениям. С животными их сближает то, что в обмене веществ участвует мочевины. Грибы характеризуются также образованием выраженной клеточной стенки, размножением спорами, неподвижностью в вегетативном состоянии и др.

В основе классификации грибов лежат способы размножения и особенности морфологии.

Царство грибы *Mycetalia*, *Fungi*, *Mycota* подразделяется на два подцарства (схема 2): низшие грибы (*Muxobionta*) и высшие грибы (*Mycobionta*).

Н и з ш и е г р и б ы характеризуются наличием зачаточного, а также одноклеточного мицелия. К ним относятся грибы отдела *Muxomycota* с подотделом *Muxomycotina*, объединяющим класс *Phycomycetes* (фикомицеты) — водные грибы.

Класс фикомицеты включает около 700 видов грибов. Фикомицеты имеют хорошо развитый одноклеточный несептированный (не имеющий перегородок) многоядерный мицелий. Грибы этого класса подразделяют на порядок мукоровые *Mucorales*, семейство *Mucogaeae*, объединяющее роды *Mucor*, *Rhizopus* и *Thamnidium*, являющиеся возбудителями пороков (порчи) молочных и других продуктов.

К в ы с ш и м г р и б а м относятся спорообразующие дрожжи, а также грибы, характеризующиеся многоклеточным мицелием. В клетках имеется по одному ядру, у многих — по два и более.

Подцарство высшие грибы включает отдел истинные (настоящие) грибы (*Eumycota*), подотдел истинные грибы (*Eumycotina*), объединяющий три класса: *Ascomycetes* — аскомицеты, или сумчатые грибы, *Basidiomycetes* — базидиомицеты, или базидиальные грибы, и класс несовершенные грибы (*Deuteromycetes* — дейтеромицеты, *Fungi imperfecti*).

Класс аскомицеты (от лат. *ascus* – сумка + греч. *myses* – гриб) объединяет более 30 тыс. видов. Характерным признаком для всего класса является половое спороношение и наличие в клетках (сумках) обычно 8 эндогенных спор (аскоспор), иногда 4-х или 2-х. В класс аскомицетов входит порядок *Endomycetales*, в который включено семейство *Endomycetaceae*, куда входят немиецелиальные одноклеточные спорообразующие грибы, называемые дрожжами, в частности дрожжи рода *Saccharomyces*. Эти дрожжи используют при изготовлении хлеба, вина, пива, спирта и др. К спорообразующим дрожжам относят и

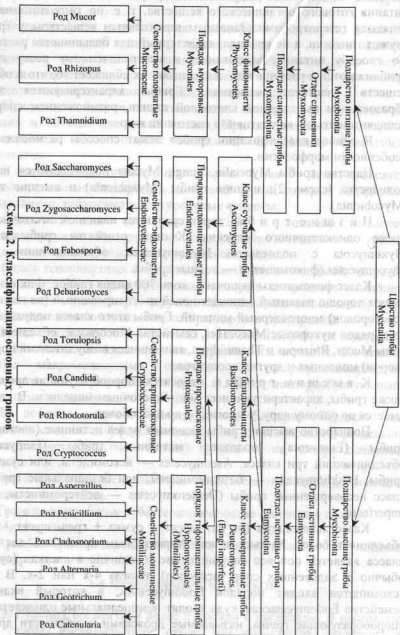


Схема 2. Классификация основных грибов

молочные дрожжи видов *Saccharomyces lactis* и *S. casei*.

Класс базидиомицеты (от греч. *basidion* – небольшое основание, фундамент + *myces* – гриб) объединяет более 20 тыс. видов грибов, имеющих развитый септированный мицелий. Основным органом спороношения у них являются дубинкообразные структуры — базидии (гомолог аска). Из базидиоспор развивается первичный (гаплоидный) мицелий, который в результате слияния гиф дает вторичный (диплоидный) мицелий со слиянием ядер, т. е. начинается половое размножение.

В класс базидиомицетов входят многие пищевые, несъедобные и ядовитые шляпные грибы, а также деструктурирующие — трутовики, паразиты хлебных злаков — ржавчинные и головневые грибы и др.

В класс несовершенных грибов входят более 25 тыс. грибов, не имеющих полового спороношения. Они имеют развитый многоклеточный мицелий. В этот класс отнесены также неспорообразующие дрожжи.

Отсутствие полового цикла у несовершенных грибов вынуждает исследователей сводить их в порядки, семейства и роды лишь на основе морфологии. Поэтому для грибов этого класса предложено несколько классификаций.

По характеру конидиального спороношения класс дейтеромицетов делат на несколько порядков, среди которых наибольшее значение имеют гифомицелиальные (*Hyphomycetales*) грибы (от греч. *hyphē* – ткань + *myces* – гриб) и *Protoascales* (протоасковые грибы). В порядок гифомицелиальных грибов входит семейство *Moniliaceae*, к которому относят роды плесеней *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Catenularia*, а также молочную плесень *Geotrichum* (*Oidium*, *Endomyces*) *lactis*, являющиеся частыми возбудителями порочков молочных продуктов.

В порядок протоасковых грибов входит семейство *Cryptosporaceae*, объединяющее одноклеточные аспорогенные дрожжи родов *Torulopsis*, *Candida*, *Rhodotorula*, которые могут вызывать порчу молочных и других пищевых продуктов.

Грибы рода *Candida* могут образовывать псевдомицелий, формирующийся из множественных почкующихся клеток.

Виды рода *Rhodotorula* отличаются желтой, оранжевой и красной окраской различных оттенков, зависящей от присутствия каротиноидов. Могут вызывать пороки цвета молока и других пищевых продуктов.

1.5. КЛАССИФИКАЦИЯ ВИРУСОВ

Вирусы являются доклеточными микроорганизмами, которые отличаются от прокариотов и эукариотов как в структурном, так и в функциональном отношении.

Характерные особенности вирусов — очень малые размеры (10–200 нм), содержание нуклеиновой кислоты только одного типа. Они не имеют

клеточного строения, являются внутриклеточными паразитами, не способны к росту и бинарному делению, не имеют собственных метаболических систем, используют рибосомы клетки хозяина для синтеза собственных белков.

Вместе с тем вирусы содержат собственную генетическую информацию, которую они передают своему потомству.

В основу классификации вирусов положены следующие свойства: тип нуклеиновой кислоты, ее молекулярная масса, количество нитей в нуклеиновой кислоте, процентное содержание нуклеиновой кислоты в вирусной частице, форма вирусной частицы, число структурных субъединиц (капсомеров) в белковой оболочке, тип симметрии расположения капсомеров.

На основании этих признаков вирусы выделены в отдельное царство *Vira*, которое подразделено по типу нуклеиновой кислоты на два подцарства — рибовирусы и дезоксирибувирусы. Подцарства делят на семейства, роды, виды и типы.

Вирусы человека и животных распределены в 19 семейств, из них 7 - ДНК-содержащие и 12 — РНК-содержащие.

По отношению к организму-хозяину вирусы подразделяют на следующие группы: паразиты бактерий — бактериофаги, паразиты высших растений и паразиты позвоночных.

В молочной промышленности имеют большое значение (негативное) бактериофаги, так как они вызывают гибель клеток заквасочных культур. Большинство фагов имеют сперматоидную форму, содержат РНК и ДНК. Различают шесть морфологических типов фагов.

К первому типу относят нитевидные ДНК-содержащие фаги. Вторую группу составляют мелкие РНК-содержащие фаги, фаги с одной спиралью ДНК и с аналогом хвостового отростка. В третий тип включены фаги без отростка, в четвертый — фаги с коротким отростком и двунитчатой ДНК. К пятому типу относятся ДНК-содержащие фаги с несокращающимся «чехлом» отростка и головкой разных формы и величины. Шестой тип — это фаги с сокращающимся «чехлом» отростка и сложной структурой.

Необходимо отметить, что достаточно четкой классификации вирусов до настоящего времени нет.

МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Морфологические свойства (от греч. *morphus* - форма) микроорганизмов изучают под микроскопом в окрашенных и влажных (неокрашенных) препаратах. При этом обращают внимание на форму, взаимное расположение, размер и строение микробных клеток, выявляют наличие и характер спор, капсул, жгутиков, а также изучают тинкториальные свойства, т. е. способность микроорганизмов окрашиваться анилиновыми красителями и по методу Грама.

2.1. ОСНОВНЫЕ ФОРМЫ БАКТЕРИЙ

Одноклеточные бактерии по внешнему виду можно разделить на три основные группы: шаровидные (кокки), палочковидные (цилиндрические) и спиралевидные (извитые).

К о к к и (от греч. *coccus* - ягода) - клетки могут иметь правильную форму шара, форму кофейных зерен, быть вытянутыми наподобие пламени свечи или ланцета, иметь бобовидную форму (рис. 1).

Клетки кокков могут располагаться беспорядочно или образовывать определенные сочетания, зависящие от характера их деления. Основными сочетаниями являются микрококки, диплококки, стрептококки, тетракокки, сарцины, стафилококки.

Микрококки (*Micrococcus*) (от греч. *micro* - мелкий) - характеризуются беспорядочным расположением клеток.

Отдельно расположенные клетки шаровидных бактерий называют монококками.

Диплококки (*Diplococcus*) (от греч. *diplos* - двойной) - парные кокки. Такое расположение часто наблюдается у молочнокислых стрептококков и энтерококков.

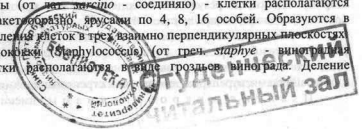
Стрептококки (*Streptococcus*) (от греч. *streptos* - плетень, витой) — располагаются в виде цепочек, что обусловлено особенностями деления клеток, происходящего, как и у диплококков, в одной плоскости. Отдельные клетки в цепочке соединяются друг с другом тончайшими цитоплазматическими тяжами, называемыми плазмодесмами.

Тетракокки (*Tetracosus*) (от греч. *tetra* - четыре) - располагаются по четыре клетки, что обусловлено делением их в двух взаимно перпендикулярных плоскостях.

Сарцины (от лат. *sarcino* - соединяю) - клетки располагаются кубиками, пакетикобразно, ярусами по 4, 8, 16 особей. Образуются в результате деления клеток в трех взаимно перпендикулярных плоскостях.

Стафилококки (*Staphylococcus*) (от греч. *staphye* - виноградная кисть) - клетки располагаются в виде гроздьев винограда. Деление

553247



клеток происходит в различных плоскостях, вследствие чего они располагаются без определенной системы.

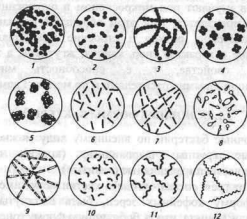


Рис. 1. Основные формы микроорганизмов (схема):

шаровидные: 1 - стафилококки, 2 - диплококки, 3 - стрептококки, 4 - тетракокки, 5 - сарцины; палочковидные: 6, 7 - бактерии, 8 - бациллы, 9 - стрептобациллы; 10 - вибрионы, 11 - спираиллы, 12 - спирохеты

Палочки имеют цилиндрическую или яйцевидную форму. Они могут быть короткими и длинными, толстыми и тонкими. Концы палочек бывают закругленными, заостренными, вздутыми или как бы обрезанными (см. рис. 1). Очень короткие палочки, напоминающие по форме шаровидные вытянутые клетки, называют коккобактериями; палочковидные, образующие ветвистые формы, напоминающие простейшие формы грибов, относят к микобактериям, а клетки, имеющие расширенный конец и внутри зернистость, - к коринебактериям.

Палочки, образующие споры, называют бациллами (от лат. *bacillus* - палочка), а не образующие спор - бактериями (от греч. *bacterium* - палочка). Среди спорообразующих помимо бацилл встречаются также клостридии (от греч. *closter* - веретено), у которых в отличие от бацилл в процессе спорообразования изменяется конфигурация клетки. Это обусловлено формированием споры, диаметр которой превышает ширину клетки, в результате чего она может приобретать форму веретена, лодочки, ложки, теннисной ракетки или барабанной палочки.

У большинства видов палочковидных микробов клетки располагаются беспорядочно, у некоторых - парами или цепочками. При этом их по аналогии с кокками называют диплобактериями или диплобациллами, стрептобактериями или стрептобациллами.

Извитые микроорганизмы имеют вид спирали

(см. рис. 1). Сильно извитые формы делят на две группы: спирохеты и лептоспирьи, относящиеся к семейству спирохет.

Слабоизвитые относятся к семейству спирилл. Они имеют от 4 до 6 витков. К этому же семейству относятся и вибрионы, имеющие лишь 1/4 завитка спирали и напоминающие слегка изогнутую запятую. Название происходит от лат. *vibrio* и переводится на русский язык «изогнутый, трепещущий», что указывает на активную подвижность вибрионов.

2.2. РАЗМЕРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

Размеры микроорганизмов измеряют в микрометрах (мкм) или нанометрах (нм), составляющих соответственно тысячные или миллионные доли миллиметра. Для измерения используют специальные приспособления — объект- и окулярмикрометры. Размер клетки можно определить также при помощи микрофотографии и другими способами.

Наиболее крупные микроорганизмы — плесени, тело которых состоит из длинных нитей, видимых иногда невооруженным глазом. Значительную длину (до 50 мкм) имеют нитчатые бактерии. Дрожжевые клетки по величине диаметра приближаются к размерам эритроцитов (8-10 мкм). Бактерии и бациллы считают крупными, если они имеют длину 5-8 мкм, средними — 3-4 мкм, мелкими — 1-2 мкм.

Толщина микробной клетки по сравнению с длиной — величина более постоянная и колеблется у различных видов микробов от 0,2 до 1 мкм, а иногда и больше. Крупными бактериями являются гнилостные спорообразующие бациллы и клостридии, маслянокислые бактерии и др.

Мелкие бактерии - это чудесная, флуоресцирующие палочки, уксуснокислые бактерии, возбудители бруцеллеза и туляремии, извитые формы. Сюда же относятся кокковые формы, которые имеют диаметр от 0,75 до 1,25 мкм.

Встречаются виды микроорганизмов, размеры которых находятся на границе разрешающей способности светового микроскопа (0,2 мкм). Извитые формы, в частности спирохеты, имеют значительную длину (до 10 мкм и более) при малой толщине (0,1-0,15 мкм). Наиболее мелкими среди бактерий являются риккетсии, имеющие длину 0,2-0,3 мкм, а также микоплазмы, диаметр которых колеблется от 0,125 до 0,150 мкм.

Необходимо отметить, что в целом микроорганизмы имеют очень малую величину. О незначительных размерах бактерий можно составить наглядное представление, если учесть, что в одной капле воды свободно вмещается несколько сот миллионов микробов ($1,0 \cdot 2,0 \cdot 10^8$), а в 1 см³ умещается до 550 млрд микробных тел бактерий средних размеров.

К ультрамикробам, невидимым в оптическом микроскопе, относят вирусы. Величина вирусов измеряется тысячными долями микрометра — нанометрами. Наиболее крупные вирусные частицы имеют величину 80-200 нм, а наиболее мелкие, как, например, вирус ящура — 8-20 нм.

Размеры наиболее мелких вирусов приближаются к величине молекул некоторых белковых веществ. Так, молекула казеина с молекулярной массой 160 тыс. имеет размеры около 2 нм, а молекула белка моллюсков гемоцианина достигает размеров 22 нм, т. е. больше вируса ящура.

Форма и размеры бактерий могут изменяться в зависимости от возраста культуры, состава и осмотических свойств питательной среды, температуры и ряда других факторов.

Наиболее характерными морфологическими свойствами обладают микроорганизмы в молодых 18-24-часовых культурах.

Кокки характеризуются наибольшей стабильностью своих размеров. Палочковидные формы более вариабельны, причем в большей степени изменяется длина клеток. Однако при стандартных условиях культивирования бактерий они стабильно сохраняют форму и размеры.

2.3. СТРОЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Структурными компонентами клетки являются оболочка бактерий, состоящая из клеточной стенки, цитоплазматической мембраны и иногда капсулы; цитоплазма; рибосомы; различные цитоплазматические включения; нуклеонд (ядро). Некоторые виды бактерий имеют, кроме того, споры, жгутики, реснички (пили, фимбрии) (рис. 2).

Клеточная стенка — обязательное образование бактерий большинства видов. Ее строение зависит от вида и принадлежности бактерий к группам, дифференцируемым при окраске по методу Грама. Масса клеточной стенки составляет около 20 % сухой массы всей клетки, толщина — от 15 до 80 нм.

Клеточная стенка имеет поры диаметром до 1 нм, поэтому она — полупроницаемая мембрана, через которую проникают питательные вещества и выделяются продукты обмена. Она непроницаема для коллоидов с молекулярной массой 10 000 и более. Эти вещества могут проникать внутрь микробной клетки лишь после предварительного гидролитического расщепления специфическими ферментами, выделяемыми бактериями во внешнюю

среду.

Химический состав клеточной стенки неоднороден, но он является постоянным для определенного вида бактерий, что используется при идентификации. В составе клеточной стенки обнаружены азотистые соединения, липиды, целлюлоза, полисахариды, пектиновые вещества.

Наиболее важным химическим компонентом клеточной стенки является сложный полисахаридпептид. Его еще называют пептидогликан, гликопептид, муреин (от лат. *murus* — стенка).

Муреин представляет собой структурный полимер, состоящий из молекул гликана, образованных ацетилглюкозаминном и ацетилмуравовой кислотой. Синтез его осуществляется в цитоплазме на уровне цитоплазматической мембраны.

Пептидогликан клеточной стенки различных видов имеет специфический аминокислотный состав и в зависимости от этого определенный хемотип, что учитывают при идентификации молочнокислых и других бактерий. Так, например, аминокислотный состав пептидов в пептидогликане лейкококков чаще представлен сочетаниями: L-лизин-L-серин-L-гуанин; у лактобактерий наиболее распространенным типом пептидогликана является лизин-D-аспаргиновая кислота.

Содержание муреина в стенках грамположительных бактерий достигает 50-80 %, а в стенках грамотрицательных бактерий — 1-10 % сухой массы стенки.

В клеточной стенке грамотрицательных бактерий пептидогликан представлен одним слоем, тогда как в стенке грамположительных бактерий он формирует несколько слоев.

По содержанию в клеточной стенке муреина, теиховых, тейхуроновых кислот и других компонентов прокариоты разделяются на грамположительные (фирмикутные) и грамотрицательные (грациликутные).

В 1884 г. Ch. Gram предложил метод окраски ткани, который использовали для окрашивания клеток прокариот. Если при окраске по Граму фиксированные клетки обработать спиртовым раствором краски кристаллического фиолетового, а затем раствором йода, то эти вещества образуют с муреином устойчивый окрашенный комплекс.

У фирмикутных микроорганизмов окрашенный фиолетовый комплекс под воздействием этанола не растворяется и соответственно не обесцвечивается, при докрасывании фуксином (краска красного цвета) клетки остаются окрашенными в темно-фиолетовый цвет. Такие микроорганизмы называются **грамположительными**.

У грациликутных видов микроорганизмов, имеющих многопелестковую клеточную стенку с незначительным количеством муреина, образовавшийся комплекс растворяется и вымывается

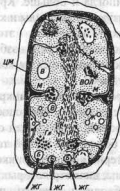


Рис. 2. Схема строения бактериальной клетки: Я — ядерное вещество (нуклеонд); М — мезосомы; ВОЛ — зерна волютина; Гл — гликоген; Р — рибосомы; В — вакуоли; Ж — жир; ЦП — цитоплазматическая мембрана; КС — клеточная стенка; К — капсула; ЖГ — жгутики; Б — блефаропласт

этанолом, а при докрасивании фуксином клетка окрашивается в красный цвет (*грамотрицательные* микроорганизмы).

Способность микроорганизмов окрашиваться по Граму называют *миктотриальными свойствами*. Их необходимо изучать в молодых (18-24 часовых) культурах, так как некоторые фирмикутные бактерии в старых культурах теряют способность положительно окрашиваться по методу Грама.

Значение пептидогликана заключается в том, что благодаря ему клеточная стенка обладает ригидностью, т. е. упругостью, и является защитным каркасом бактериальной клетки.

При разрушении пептидогликана, например, под действием лизоцима клеточная стенка теряет ригидность и разрушается. Содержимое клетки (цитоплазма) вместе с цитоплазматической мембраной приобретает сферическую форму, т. е. становится протопластом (сферопластом).

Пептидогликан чувствителен также к ингибирующему действию антибиотиков. Так, пенициллин способствует потере клеточными стенками ригидности.

К протопластам относят L-формы бактерий, которые представляют собой своеобразное проявление изменчивости микроорганизмов. Морфологически они выглядят в виде крупных шаровидных и нитевидных плазматических структур, не имеющих клеточной стенки. Они образуются при угнетении синтеза клеточной стенки под влиянием различных веществ (чаще пенициллина), в результате чего нарушается координация между ростом и делением клетки.

Различают стабильные и нестабильные L-формы бактерий. Последние способны приобретать клеточную стенку после прекращения действия трансформирующего агента. Стабильные L-формы бактерий по своим свойствам очень сходны с микоплазмами.

С клеточной стенкой связаны многие как синтезирующие, так и разрушающие ферменты. Компоненты клеточной стенки синтезируются в цитоплазматической мембране, а затем транспортируются в клеточную стенку.

Цитоплазматическая мембрана (перипласт) располагается под клеточной стенкой и плотно прилегает к ее внутренней поверхности. Она представляет собой полупроницаемую оболочку, окружающую цитоплазму и внутреннее содержимое клетки - протопласт. Цитоплазматическая мембрана - это уплотненный наружный слой цитоплазмы. От клеточной стенки она отделена периплазматическим пространством. Толщина цитоплазматической мембраны составляет 5-13 нм.

Цитоплазматическая мембрана является главным барьером между цитоплазмой и окружающей средой, нарушение ее целостности приводит

к гибели клетки. В ее состав входят белки (50-75 %), липиды (15-45 %), у многих видов - углеводы (1-19 %).

Главным липидным компонентом мембраны являются фосфолипиды и гликолипиды.

Мембранные белки, как правило, состоят из различных ферментов. По аминокислотному составу они отличаются от других клеточных белков чрезвычайно малым содержанием цистина.

Углеводы мембран входят в состав гликолипидов и гликопротеидов.

Цитоплазматическая мембрана при помощи локализованных в ней ферментов осуществляет разнообразные функции: синтезирует мембранные липиды - компоненты клеточной стенки; мембранные ферменты - переносчики (пермеазы) избирательно переносят через мембрану различные органические и неорганические молекулы и ионы, мембрана участвует в превращениях клеточной энергии, а также в репликации хромосом, в переносе электрохимической энергии и электронах.

Таким образом, цитоплазматическая мембрана обеспечивает избирательное поступление в клетку и удаление из нее разнообразных веществ и ионов.

Производными цитоплазматической мембраны являются *мезосомы*. Это сферические структуры, образуемые при закручивании мембраны в завиток. Они располагаются с двух сторон - в месте образования клеточной перегородки или рядом с зоной локализации ядерной ДНК (дезоксирибонуклеиновой кислоты).

Мезосомы функционально эквивалентны митохондриям клеток высших организмов. Они участвуют в окислительно-восстановительных реакциях бактерий, играют важную роль в синтезе органических веществ, в формировании клеточной стенки.

Капсула является производным наружного слоя клеточной стенки и представляет собой слизистую оболочку, окружающую одну или несколько микробных клеток. Толщина ее может достигать 10 мкм, что во много раз превышает толщину самой бактерии (рис. 3).

Капсулообразование чаще встречается у палочковидных форм бактерий и наблюдается как у болезнетворных, так и у сапрофитных представителей. Капсула выполняет защитную функцию. Патогенные виды она защищает от бактерицидных (губительных) иммунных факторов инфицированного макроорганизма, сапрофитные микробы предохраняет от высушивания и воздействия вредных факторов

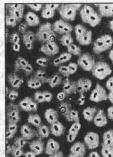


Рис. 3. Капсулы у бактерий

внешней среды.

Химический состав капсулы бактерий различен. В большинстве случаев она состоит из сложных полисахаридов, мукополисахаридов, иногда полипептидов.

Бактерии некоторых видов могут выделять секрет, состоящий из полисахаридов, который адсорбируется в виде очень тонкого слоя на поверхности клетки, формируя так называемую **микрочапсулу**.

Капсулообразование, как правило, является видовым признаком. Однако появление микрочапсулы часто зависит от условий культивирования бактерий.

У некоторых сапрофитных бактерий образуется общая капсула для многих особей. Такие скопления микроорганизмов, заключенных в общую капсулу, называют **зооглеями**.

Капсула не является жизненно необходимой частью микробной клетки. Ее можно удалить различными способами, не причиняя вреда бактериям, хотя при этом снижается их устойчивость. Капсулообразование может утрачиваться видом в естественных условиях.

Капсулу обнаруживают специальными методами окраски. В связи с тем, что капсульное вещество плохо адсорбирует краску, она окрашивается иначе, менее интенсивно, чем вегетативная клетка.

Ц и т о п л а з м а — сложная коллоидная система с содержанием большого количества воды (80-85 %), в которой диспергированы белки, углеводы, липиды, а также минеральные соединения и другие вещества.

Цитоплазма представляет собой содержимое клетки, окруженное цитоплазматической мембраной. Ее подразделяют на две функциональные части.

Одна часть цитоплазмы находится в состоянии золь (раствора), имеет гомогенную структуру и содержит набор растворимых рибонуклеиновых кислот, белков-ферментов и продуктов метаболизма.

Другая часть представлена рибосомами, включениями различной химической природы, генетическим аппаратом, другими внутрицитоплазматическими структурами.

Р и б о с о м ы — это субмикроскопические гранулы, представляющие собой нуклеопротеиновые частицы сферической формы диаметром от 10 до 20 нм, молекулярной массой около 2-4 млн.

Константа седimentации рибосом 7 OS . **Константой седimentации** называется скорость, с которой эти частицы осаждаются в центрифуге при определенных стандартных условиях. S — символ седimentации, выраженный в единицах Т. Сведберга — изобретателя ультрацентрифуги для определения молекулярной массы белков.

Рибосомы прокариот состоят из 60 % РНК (рибонуклеиновой кислоты), расположенной в центре, и 40 % белка, покрывающего

нуклеиновую кислоту снаружи. У эукариот рибосомы содержат примерно одинаковое количество РНК и белков, поэтому константа седimentации у них составляет 80S. Количество рибосом в клетке бактерий достигает 5000. Они являются местом синтеза белка и поэтому играют важную роль в жизнедеятельности бактерий. Из нескольких рибосом формируются так называемые **полисомы**.

В к л ю ч е н и я ц и т о п л а з м ы представляют собой продукты обмена, а также резервные продукты, за счет которых клетка живет в условиях недостатка питательных веществ.

Включения различны по своей химической природе и неодинаковы у разных видов бактерий. К цитоплазматическим включениям относят молекулы гликогена, крахмала, крахмалоподобного вещества — гранулезы, поли- β -оксимасляной кислоты, а также капли жира, жидкой воды, кристаллы шавелевой кислоты, соли железа, гранулы волотина (метахроматина), состоящие из полифосфатов.

В цитоплазме бактерий имеются также вакуоли (пузырьки), заполненные водными растворами различных веществ и окруженные мембраной (тонопласт) липопротеидного происхождения. Число вакуолей в клетке колеблется в пределах 6-10, а в период активного роста может увеличиваться до 20. Считают, что в них откладываются вредные продукты обмена (экзотоксины), которые впоследствии выводятся за пределы клетки. Возможно, вакуоли представляют собой образования, возникающие при избыточном количестве воды.

Генетический материал прокариот состоит из двойной нити дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) компактной структуры, расположенной в центральной части цитоплазмы и не отделенной от нее мембраной. ДНК бактерий по строению не отличается от ДНК эукариот, но так как она не отделена от цитоплазмы мембраной, генетический материал называют у к л е о и д о м или г е н о ф о р м о м. Ядерные структуры имеют сферическую или подковообразную форму.

Один нуклеоид заключает в себе макромолекулу ДНК с молекулярной массой $2-3 \times 10^9$. Эта молекула в развернутом состоянии представляет собой замкнутую кольцевую структуру длиной минимум более 1 мм.

Молекула ДНК получила название **бактериальной хромосомы**. Концевые участки ДНК всегда находятся в контакте с цитоплазматической мембраной и мезосомами, число участков контакта может достигать 20 и более.

В состав нуклеоида, кроме ДНК, входят также РНК и белки.

Содержание пар оснований в ДНК аденин-тимин (А-Т) и гуанин-цитозин (Г-Ц) у клеток прокариот одного и того же вида является постоянным. Нуклеотиды в молекуле ДНК соединяются при помощи водородных связей.

Водородные связи, соединяющие А с Т и Г с Ц, неодинаково прочны. Связи эти имеют в основном электростатическую природу. В их образовании участвуют ОН и NH₂ группы. О и N — сильно электроотрицательные элементы, они оттягивают электроны и сообщают связанному с ними водороду положительный заряд. Положительно заряженный атом водорода может притягиваться другими электроотрицательными группами с неподеленными парами электронов, и в этом случае образуется водородная связь.

Между гуанином и цитозином имеются три, а между тиминном и аденином — две водородные связи. Из-за малой энергии связи такие воздействия, как повышение температуры, незначительные изменения концентрации магния или добавление мочевины, могут приводить к большому изменению и даже разрыву связи.

При повышении температуры происходят разрыв водородных связей и расхождение полинуклеотидных цепей.

Температуру, при которой происходит разрушение половины максимальной величины ДНК, называют *точкой плавления*. Она тем выше, чем больше в ДНК гуанина и цитозина — оснований, соединенных между собой тремя водородными связями. Поэтому точка плавления выделенной и очищенной ДНК служит показателем, позволяющим определить относительное содержание в ней цитозина и гуанина.

Содержание пар Г-Ц — это отношение суммы молей гуанина и цитозина к сумме молей всех четырех оснований в данной ДНК, выраженное в процентах (моль %).

По содержанию Г-Ц в ДНК бактерии очень сильно различаются между собой. Эта величина может варьировать в пределах 30 % (у стафилококков) до более чем 70 % (у представителей рода *Micococcus*). Содержание Г-Ц видоспецифично и рассматривается как таксономический признак вида.

Как было сказано, при нагревании изолированной ДНК две полинуклеотидные цепи расходятся в результате разрыва водородных связей. Такая денатурация (или «плавление»), приводящая к образованию одиночных цепей, обратима: при очень медленном охлаждении препарата будут происходить спаривание и реассоциация комплементарных участков.

Если смешать короткие фрагменты денатурированных ДНК, полученных из двух различных, но близких между собой видов бактерий, при температуре выше точки их плавления и затем медленно охладить смесь, тоже будет происходить реассоциация.

Двойные спирали, образовавшиеся из одиночных цепей ДНК двух разных организмов, называют *гетеродуплексными* или *гибридными молекулами*, а явление их образования — гибридизацией нуклеиновых кислот.

Реассоциация ДНК/ДНК дает возможность определять степень гомологии ДНК разного происхождения. Степень реассоциации молекул ДНК из различных штаммов выражают в процентах от величины реассоциации в цепочках молекул ДНК одних и тех же бактерий.

Гомологичность ДНК, т.е. совпадение последовательности оснований в молекулах ДНК двух разных штаммов и видов бактерий, тем больше, чем ближе родство этих бактерий между собой.

Метод гибридизации, в основе которого лежит генетическая гомология ДНК, используют для определения генетического родства микроорганизмов, их точной идентификации и классификации.

Деление молекулы ДНК (репликация) в процессе размножения клеток начинается в точке прикрепления кольцевой хромосомы к цитоплазматической мембране, где локализуются ферменты репликации. В зоне репликации под влиянием ферментов происходит разрыв водородных связей в двунитчатой молекуле ДНК, и на каждой из освободившихся связей нити начинается синтез комплементарных вторых нитей ДНК.

Продолжительность удвоения (репликации) нитей ДНК занимает 80 % времени, в течение которого происходит деление клетки. Деление нуклеоида начинается немедленно после завершения синтеза ДНК и заканчивается раньше, чем деление протопласта.

Количество нуклеоидов в одной бактериальной клетке зависит от ее физиологического состояния. Клетки, находящиеся в логарифмической фазе роста, содержат по 4 и более нуклеоида. В клетках покоящихся бактерий содержится один нуклеоид, а в фазе, предшествующей делению, — два.

Нуклеоид выполняет генетическую функцию, т.е. ядерное вещество является материальной основой наследственности и практически вся генетическая информация бактериальной клетки заключена в молекуле ДНК, которая составляет около 3 % сухой массы клетки.

Ядерное вещество имеет такой же коэффициент преломления света, как и цитоплазма, поэтому оно не видно в световом микроскопе. Его можно обнаружить при помощи специальных биохимических реакций, а также путем электронно-микроскопических исследований ультратонких срезов. Соотношение ядерного вещества и цитоплазмы клетки составляет 1:2 или 1:10.

В цитоплазме клеток могут содержаться внеядерные генетические структуры в виде небольших молекул ДНК, осуществляющие генетическую функцию наряду с ДНК нуклеоида. Их называют *плазмидами* бактерий.

Они существуют в бактериальных клетках автономно. Их репликация осуществляется самостоятельно и независимо от

размножения бактерий-носителей. Плазмиды способны к переходу от одних бактериальных клеток к другим (через реснички в виде трубочек - F-пили). Попав к другим видам бактерий, плазмиды могут внести в клетку гены, контролирующие важные свойства. В результате этого бактерии приобретают новые свойства - устойчивость к химическим веществам, способность к синтезу биологически активных веществ и др.

С п о р ы бактерий являются покоящейся, не размножающейся их формой. Они формируются внутри клетки, представляют собой образования круглой или овальной формы. Спорообразование - это генетически обусловленный признак, зашифрованный в генетическом коде микроорганизма. Бактерии, преимущественно грамположительные, палочковидной формы с аэробным и анаэробным типом дыхания в старых культурах, а также в неблагоприятных условиях внешней среды (недостаток питательных веществ и влаги, накопление продуктов обмена в среде, изменение pH и температуры культивирования, наличие или отсутствие кислорода воздуха и др.) могут переключаться на альтернативную программу развития, в результате чего образуются споры. При этом в клетке образуется одна спора. Это свидетельствует о том, что спорообразование у бактерий является приспособлением для сохранения вида (индивидуума) и не является способом их размножения.

Процесс спорообразования происходит, как правило, во внешней среде в течение 18-24 ч. Внешне он начинается с концентрации и уплотнения цитоплазмы и ядерного вещества в какой-то части клетки. Этот уплотненный участок, называемый *спорогенной зоной*, обладает более сильным светопреломлением, чем остальная часть клетки. Одновременно вокруг этого участка дифференцируется зона цитоплазмы, которая, уплотняясь, превращается в оболочку споры. Клетка в этой стадии называется *проспорой*. Проспора, как и вегетативная (размножающаяся) клетка, легко окрашивается анилиновыми красителями.

В процессе образования проспоры ДНК делится на два нуклеоида, цитоплазматическая мембрана врастает внутрь клетки, отгораживая один нуклеоид и небольшое количество цитоплазмы. Вокруг образовавшейся проспоры начинает разрастаться клеточная цитоплазматическая мембрана материнской клетки, развивая два лепестка, из которых в дальнейшем будут формироваться две оболочки: наружная и внутренняя. В промежутке между лепестками мембраны накапливаются мукопептиды, кальциевые соли дипиколиновой кислоты, что обеспечивает споре высокую термоустойчивость.

По мере созревания проспора уменьшается в размерах, становится более плотной. Из лепестков цитоплазматической мембраны формируется две оболочки - *наружная (экзина)* и *внутренняя (интина)*. В дальнейшем сформировавшаяся спора покрывается толстым слоем из

нескольких белков, сходных с кератином, входящих в состав перьев, ногтей, кожи. Происходит обезвоживание споры, вегетативная часть клетки разрушается. Наружная оболочка становится труднопроницаемой для воды и различных веществ. Поэтому зрелая спора утрачивает способность окрашиваться обычными методами. Из внутреннего слоя при прорастании споры формируется клеточная стенка бактерий.

Зрелая спора составляет примерно 0,1 объема материнской клетки. Споры у разных бактерий различаются по форме, размеру, расположению в клетке.

Микроорганизмы, у которых диаметр споры не превышает ширины вегетативной клетки, называют *б а ц и л л а м и*, бактерии, имеющие споры, диаметр которых больше поперечника клетки в 1,5-2 раза, называют *к л о с т р и д и я м и*.

Внутри микробной клетки спора может располагаться в середине - центральное положение, на конце - терминальное и между центром и концом клетки - субтерминальное расположение.

Клостридии с терминально расположенными спорами называют *плектридиями*.

По химическому составу и наличию ферментов споры и вегетативные клетки, из которых они образуются, не отличаются друг от друга. Различие состоит в количественных соотношениях химических соединений. В споре в отличие от вегетативной клетки содержится в два раза меньше воды, которая находится в основном в связанном состоянии. В споре заметно увеличивается концентрация кальция, магния, а также липидов и пиколиновой кислоты, что в значительной степени обуславливает устойчивость спор к воздействию неблагоприятных физических и химических факторов. В результате этого споры могут десятилетиями сохраняться в почве, выдерживать кипячение в течение 60 мин и даже нескольких часов, а также действие высоких концентраций дезинфицирующих веществ. Устойчивость спор затрудняет борьбу со спорообразующими гнилостными, маслянокислыми и другими микроорганизмами, попадающими в молоко и молочные продукты, выдерживающими режимы пастеризации, а иногда и стерилизации молока.

Споры при попадании в питательный субстрат и благоприятные условия существования могут прорасть в исходную вегетативную форму. При этом спора набухает, размеры значительно возрастают, активизируются биохимические процессы. Прорастание споры заканчивается образованием отверстия в оболочке и появлением ростка, вытягивающегося затем в палочку. Прорастающая спора способна окрашиваться обычными анилиновыми красителями.

Росток споры может возникать полярно, экваториально и между полюсом и центром клетки. В первом случае росток появляется на одном

из концов споры, во втором он выходит в средней части, перпендикулярно длинной оси споры. Процесс прорастания споры осуществляется значительно быстрее, чем ее формирование, и заканчивается через 4-5 ч.

Спорообразование постоянный признак, который имеет важное значение при идентификации, т. е. определении вида бактерий.

Жгутики бактерий являются локомоторными органами (органами движения), при помощи которых бактерии могут передвигаться со скоростью до 50-60 мкм/с. При этом за 1 с бактерии перекрывают длину своего тела в 50-100 раз. Длина жгутиков превышает длину бактерий в 5-6 раз. Толщина жгутиков составляет в среднем 12-30 нм.

Жгутики имеют поперечную исчерченность, которая отражает их спиральное строение. Они берут начало от цитоплазматической мембраны и выходят наружу через клеточную стенку. У основания имеются базальные гранулы, состоящие из двух дисков наружного - в клеточной стенке и внутреннего в цитоплазматической мембране.

Жгутики состоят из белковых веществ типа флагеллина, принадлежащего к классу сократимых белков (миозин, фибриноген, кератин).

Число жгутиков, их размеры и расположение постоянны для определенных видов прокариот и поэтому учитываются при их идентификации.

В зависимости от количества и местонахождения жгутиков бактерии подразделяют на монотрихи (монопольные монотрихи) - клетки с одним жгутиком на одном из концов, лофотрихи (монопольные политрихи) - пучок жгутиков располагается на одном из концов, амфитрихи (бипольные политрихи) - жгуттики располагаются на каждом из полюсов, перитрихи - жгуттики расположены по всей поверхности клетки (рис. 4) и атрихи - бактерии, лишённые жгутиков.

Характер движения бактерий зависит от числа жгутиков, возраста, особенностей культуры, температуры, наличия различных химических веществ и других факторов. Наибольшей подвижностью обладают монотрихи.

Подвижные бактерии способны к направленным движениям, или таксисам. В зависимости от химических, световых, атмосферных и



Рис. 4. Расположение жгутиков у бактерий: а — монотрихи; б — лофотрихи; в — амфитрихи; з — перитрихи

температурных факторов соответственно различают положительные или отрицательные хемотаксис, фототаксис, азототаксис, термотаксис.

Жгуттики чаще имеются у палочковидных бактерий, они не являются жизненно необходимыми структурами клетки, так как существуют безжгутиковые варианты подвижных видов бактерий.

Реснички (пили, фимбрии, ворсинки) имеют вид поверхностных нитевидных образований, которыми обладают некоторые виды грамотрицательных бактерий. Длина пилей намного меньше длины жгутиков, толщина около 2-5 нм. Значение пилей до конца не изучено. Предполагают, что они являются органом прикрепления бактерий к субстрату, т. е. выполняют адгезивные функции. Количество пилей достигает 100-400 на одной особи.

Наиболее изучены пили у эшерихий. Различают пили *общие* и *половые*. Общие пили подразделяются, в свою очередь, на два типа. Пили первого типа имеют длину до 1,5 мкм, диаметр до 7 нм, располагаются по всей поверхности клетки (перитрихально). При росте на жидкой среде такие клетки образуют на поверхности пленку за счет прикрепления друг к другу при помощи пилей.

Благодаря пиялям первого типа бактерии прикрепляются к поверхности эукариотических клеток, пили этого типа вызывают агглютинацию (склеивание) эритроцитов.

Общие пили первого типа являются фактором патогенности бактерий, они обеспечивают им прикрепление (адгезию) и быструю колонизацию на клетках хозяина. Эти пили описаны у эшерихий под названием антигенов K88, K99, 98 7P и др.

Общие пили второго типа схожи с пиялями первого типа, но не способны к адгезии, не агглютинируют эритроциты и не образуют пленку на поверхности жидкой среды.

Половые пили участвуют в конъюгации бактерий (обмене генетическим материалом, главным образом плазмидами, через пили между двумя клетками).

Пили, подобные пиялям эшерихий, образуют и другие представители семейства Enterobacteriaceae, а половые пили обнаруживают у вибрионов, пастерелл, бактерий родов *Pseudomonas* и *Aeromonas*.

Пили не являются обязательными и жизненно необходимыми структурами клеток бактерий.

2.4. ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИИ ГРИБОВ

Дрожжевые грибы (дрожжи, аскомицеты) — это одноклеточные организмы, имеющие размеры в поперечнике 3-5 мкм, по длине — 10-15 мкм. Формы клеток дрожжей разнообразны: круглые, овальные, яйцевидные и др. (рис. 5).

Рис. 5. Дрожжи: *Saccharomyces cerevisiae*: а — колонии; б — клетки

Строение дрожжей более сложное, чем строение бактериальных клеток. У них имеются двойная оболочка и дифференцированное ядро, т. е. ядерное вещество окружено оболочкой. В цитоплазме имеются различные включения: капельки жира, зерна гликогена и воллутина, а также вакуоли.

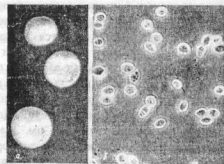
Размножаются дрожжи различными способами: почкованием, спорообразованием. Споры (от греч. *spora* — семья) в количестве от 2 до 16 образуются в цитоплазме клеток при недостатке в среде питательных веществ, накоплении продуктов метаболизма (обмена) при доступе кислорода. Спорообразованию часто предшествует половое слияние клеток.

Дрожжи, обладающие свойством спорообразования, называются истинными дрожжами или сахаромецетами. К ним относятся промышленные дрожжи. Неспорообразующие дрожжи называют несхаромецетами. Они включают дрожжевые организмы, обуславливающие пороки молочных и мясных продуктов.

Плесневые грибы называют нитчатыми грибами или гифомецетами, поскольку тело плесневых грибов (мицелий или грибница) состоит из тонких ветвящихся нитей — гиф. Различают глубинный (субстратный) и верхушечный (воздушный) мицелий (от греч. *mykes, mycetes* — гриб).

В зависимости от строения мицелия плесени бывают одноклеточными и многоклеточными. У одноклеточных грибов мицелий представляет собой сильно разветвленную клетку. У многоклеточных — гифы имеют поперечные перегородки (септы) (от лат. *septum* — перегородка). Мицелиальные клетки плесеней имеют оболочку, цитоплазму, дифференцированное ядро и ядрышко. Кроме того, цитоплазма грибов богата вакуолями и различными включениями (капельками жира, зернами воллутина и гликогена).

Размножаются плесени вегетативным (бесполом) и половым способами, а также почкованием. Вегетативное размножение осуществляется частями мицелия, оидиями, спорами. Споры образуются экзогенно, а также внутри специальных плодовых тел — спорангий. Споры, развивающиеся в спорангиях, называют эндоспорами. Гифы мицелия, на которых расположены спорангии с эндоспорами, называют спорангиеносцами. Плодоносящие гифы, на концах которых



неизолированно от внешней среды развиваются экзогенные споры — конидии, называют конидиеносцами.

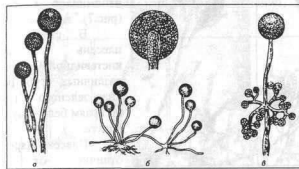


Рис. 6. Одноклеточные плесневые грибы: а — *Mucor*; б — *Rhizopus*; в — *Thamnidium*

К одноклеточным плесневым грибам относят грибы из родов: *Mucor* (головчатая плесень), *Rhizopus*, *Thamnidium* (рис. 6).

Мукор имеет хорошо разветвленный одноклеточный мицелий. От воздушного мицелия отходят плодоносящие гифы-спорангиеносцы, заканчивающиеся шаровидным спорангием (от греч. *spora* — семья + *angion* — сосуд), в котором развиваются тысячи спор. Плесень имеет вид нежного серовато-белого, очень густого пушка, растет на различных продуктах, почве и т. п. При просмотре головчатой плесени в чашке Петри под лупой или под малым увеличением микроскопа обнаруживают спорангии, возвышающиеся над общей массой мицелия в виде головок.

Плесени рода *Thamnidium* в отличие от рода *Mucor* имеют в средней части спорангиеносца так называемые спорангиолы, по виду напоминающие гантели, внутри которых тоже развиваются и созревают споры.

Представители этих родов могут развиваться в холодильниках при минус 9 - минус 11 °С. Под *Rhizopus* характеризуется тем, что его виды имеют ризоиды, т. е. тоненькие волоски, отходящие от мицелия у основания спорангиеносцев.

К многоклеточным плесневым грибам относят следующие роды: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Catenularia*, *Alternaria*, *Geotrichum* (*Oidium*) и др.

Плесени рода *Penicillium* имеют многоклеточные мицелий и конидиеносец. На конце конидиеносца образуется по несколько клеточных выростов (стеригм), а на них — круглые одноклеточные конидии. Плодовое тело, или конидиеносец со стеригмами и конидиями (от греч. *konia* - пыль + *eidosis* - вид) при среднем увеличении микроскопа

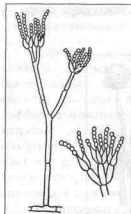


Рис. 7. Плесень рода *Penicillium*

напоминает кисть руки (рис.7).

В связи с этим плесень называют кистевидной. Она растет на различных субстратах в виде зеленого в центре, а по краям белого пушистого налета.

Плесень *Aspergillus* в отличие от других

плесеней имеет многоклеточных неспитированный, очень длинный конидиеносец, который в верхней части заканчивается булавовидным утолщением. От него радиально во все стороны отходят клеточные выросты — стеригмы. От стеригм как бы отшнуровываются конидии, которые располагаются цепочками. Под микроскопом конидиеносец со стеригмами и конидиями напоминает вид садовой лейки в момент, когда из нее выливается вода (рис. 8). Поэтому плесень этого рода называют лейчной. Она образует споры черного цвета. В мицелии пигмент не образуется, поэтому у незрелых плесеней в центре колония черная, снаружи - белая. Растет на различных продуктах.

Гроздевидная плесень (род *Cladosporium*) имеет короткий септированный конидиеносец, от которого в разных местах отходят крупные овальные вытянутые оливково-зеленые конидии. Конидиеносцы с конидиями образуют скопления, напоминающие виноградные грозди (веточки), что и обусловило название плесени (рис. 9). Плесень может развиваться при минусовых температурах. Она образует фермент липазу, которая вызывает гидролиз жиров и их прогоркание, а также пигмент, окрашивающий не только споры, но и мицелий чаще в зеленый цвет.

Шоколадно-коричневая плесень (род *Catenularia*) имеет

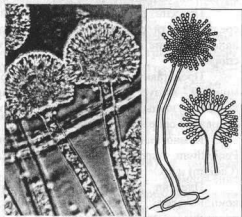


Рис. 8. *Aspergillus*

короткий, часто разветвленный конидиеносец, от которого отходят длинные цепочки конидий, напоминающие бусы (рис. 10). Плесень является микроаэрофилом, поэтому она развивается на сладких молочных консервах в виде коричневатых колоний, вызывая порчу (пороки) продуктов.

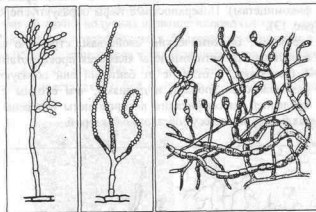


Рис. 9. *Cladosporium*

Рис. 10. *Catenularia*

Рис. 11. *Alternaria*

Плесень рода *Alternaria* отличается от других родов плесеней тем, что от конидиеносца отходят многоклеточные крупные грушевидные конидии, по внешнему виду напоминающие гранату-лимонку (рис. 11). Конидии черного или коричневого цвета, располагаются цепочками или в одиночку. Чаще плесень развивается на сладких фруктах, особенно грушах, в виде черного плотного налета. Поскольку мицелий окрашен в черный цвет, часто плесень называют черной.

Молочная плесень *Geotrichum lactis* (*Oidium lactis*) не имеет специальных гиф плодonoшения. Несовершенные конидии (оидии) (от лат. *oidiae* — яйцо) образуются в результате распада концевых нитей воздушного мицелия и представляют собой прямоугольные или овальные клетки, образующие белый пигмент (рис.12).

Плесень встречается на молочных и других продуктах в виде белого нежного пушка. В мицелии пигмент не образуется, поэтому незрелая плесень имеет вид серого налета.

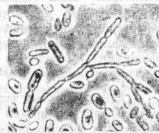


Рис.12. *Geotrichum lactis* (*Oidium lactis*)

2.5. АКТИНОМИЦЕТЫ

Особое положение занимают лучистые грибы — актиномицеты (от греч. *actinos* — луч + *myses* — гриб). Это своеобразные микроорганизмы, сочетающие в себе свойства бактерий и грибов. Клетки актиномицетов представляют собой ветвистый мицелий из несептированных гиф (подобно фикомицетам). Поверхностные гифы образуют спороносцы со спорами (рис. 13).

По структуре, биохимическим свойствам, строению нуклеоида, оболочки и цитоплазмы актиномицеты являются прокариотами и почти аналогичны бактериям. В отличие от бактерий они образуют гифы и мицелий, размножаются спорами и оидиями, чем сходны с грибами. Согласно последней классификации актиномицеты отнесены к отделу хемотрофных бактерий, классу собственно бактерий.

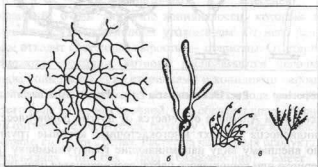


Рис. 13. Актиномицеты:

а — общий вид мицелия; б — прорастание спор; в — строение спороносцев

Актиномицеты широко распространены во внешней среде. Некоторые виды используются как продуценты антибиотиков (стрептомицина, хлортетрациклина и т. д.). Среди этой группы микроорганизмов имеется патогенный вид, вызывающий заболевание (актиномикоз) животных и людей.

2.6. МОРФОЛОГИЯ ВИРУСОВ

Размер вирусных частиц (вирионов) измеряется в нанометрах (нм) и колеблется в широком диапазоне от 10 до 200 нм. Их величину определяют фильтрованием через фильтры с известной величиной пор, по скорости оседания вирусных частиц во время ультрацентрифугирования, фотографированием в электронном микроскопе и др.

По форме вириона вирусы подразделяют на четыре группы

(рис. 14): шаровидные (вирус гриппа), кубовидальные (вирус оспы, энтеровирусы), палочковидные (возбудитель болезни картофеля) и сперматозоидные, к которым относят вирусы бактерий бактериофаги.

Вирион состоит из ДНК или РНК, расположенной в центре вирусной частицы. Вокруг нуклеиновой кислоты располагаются одна или две оболочки (у сложных вирусов).

Первая оболочка получила название капсид (от греч. *capsa* — ящик), которая состоит из повторяющихся белковых субъединиц капсомеров (мономеров). Число капсомеров в капсиде постоянно у каждого вируса и составляет от 60 до 2000. Нуклеиновая кислота с капсидом — нуклеокапсид представляет собой вирусную частицу простых вирусов.

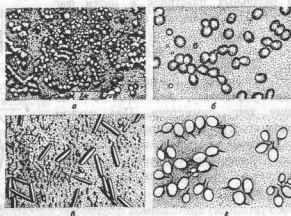


Рис. 14. Основные формы вирусных частиц:

а - шаровидная; б - кубовидальная; в - палочковидная; г - сперматозоидная

Капсомеры располагаются в определенном порядке (симметрия), по характеру которого вирусы делят на три группы: со спиральным, кубическим и комбинированным типом симметрии.

Например, спиральный тип симметрии имеют вирусы палочковидной формы, вирусы с кубической симметрией (изометрические) имеют капсид в виде икосаэдра (двухдцатигранника).

У сложных вирусов нуклеокапсиды покрыты второй наружной липидсодержащей оболочкой — суперкапсидом. На наружной оболочке имеются выступы — шипы, образующиеся из вирусспецифических углеводсодержащих белков — гликопротеидов.

Вирусы являются облигатными внутриклеточными паразитами человека, животных, насекомых, растений, грибов и бактерий, так как они не могут синтезировать белки.

В молочной промышленности среди вирусов наибольшее значение

имеют бактериофаги. Они широко распространены в природе и встречаются в почве, водоемах, молоке, молочных продуктах, сточных водах, содержимом кишечника и др. Большинство фагов состоят из шаровидной головки и удлиненного отростка (рис. 15). В головке фага содержится специфическая нуклеиновая кислота с белковой оболочкой, а в отростке - протеин.

Отросток фага образован полым стержнем диаметром около 8 нм. Снаружи стержень окружен чехлом, представляющим собой полый цилиндр, способный к сокращению. На нижнем конце отростка имеется шестиугольная базальная пластинка, в каждом углу которой располагаются короткие зубцы.

От каждого зубца отходит по одной нити длиной 150 нм. С помощью базальных пластинок и нитей фаг адсорбируется (прикрепляется) на поверхности бактериальной клетки.

Капсид головки фага и чехол отростка построены из упорядоченных полипептидных субединиц (капсомеров), располагающихся в головке по кубическому, а в отростке - по спиральному типу симметрии. Под чехлом нижней части отростка содержится лизоцим. Под действием лизоцима в клеточной стенке бактерий образуется отверстие, через которое впрыскивается нуклеиновая кислота бактериофага в клетку.

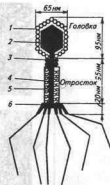


Рис. 15. Схема строения бактериофага:
1 - белковая субстанция; 2 - ДНК; 3 - воронтичник;
4 - чехол; 5 - стержень; 6 - базальная пластинка с шипами

ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Физиология (от греч. *physis* - природа, природные свойства, *logos* - учение, наука) изучает жизнедеятельность различных организмов, их взаимодействие с окружающей средой.

Физиология микроорганизмов изучает вопросы метаболизма у микробов, т. е. обмена веществ и энергии, а также рост и размножение клеток. Знание физиологических процессов у микроорганизмов создает научную основу для проведения культивирования (выращивание), идентификации (распознавание) видов микробов, получения биологических и лечебных препаратов (заквасок, витаминов, ферментов, аминокислот, антибиотиков, вакцин и др.).

3.1. ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА У МИКРООРГАНИЗМОВ

Под метаболизмом (от греч. *metabole* — изменение, превращение) понимают совокупность биохимических реакций и превращений веществ, происходящих в микробной клетке, направленных на получение энергии и дальнейшее использование ее для синтеза органических веществ.

Термин «метаболизм» объединяет два взаимосвязанных, но противоположных процесса — анаболизм и катаболизм. Они присущи всем живым существам и являются основными признаками живого.

Анаболизм (питание; ассимиляция; конструктивный, или строительный, обмен; обмен веществ) сводится к усвоению, т. е. к использованию микроорганизмами питательных веществ, поступивших из внешней среды, для биосинтеза компонентов (веществ) собственного тела. Это достигается чаще восстановительными эндотермическими реакциями, для течения которых требуется энергия.

Катаболизм (дыхание, диссимиляция, биологическое окисление) характеризуется расщеплением (окислением) сложных органических веществ до более простых продуктов с освобождением заключенной в них энергии, которая используется микроорганизмами для синтеза веществ данной клетки. Этот обмен называется также энергетическим.

В большинстве случаев одно и то же вещество используется как в ассимиляции, так и в диссимиляции. Исключением являются углеводы, которые подвергаются расщеплению и не принимают участия в конструктивном обмене.

Метаболизм у микроорганизмов характеризуется интенсивным потреблением питательных веществ. Так, при благоприятных условиях в течение суток одна клетка бактерий усваивает веществ в 30-40 раз

больше величины своей массы.

В обмене вещества принимают участие различные химически вещества. В зависимости от этого различают белковый, углеводный, липидный и водно-солевой обмен.

Белковый обмен. Распад белка вначале происходит до пептонов под действием ферментов экзопротеаз. В дальнейшем пептоны под влиянием эндопротеаз расщепляются до аминокислот, которые поступают в клетку. Здесь аминокислоты могут подвергаться дезаминированию и декарбоксилированию.

В результате дезаминирования образуются аммиак, кетокислоты или оксикислоты, спирт и другие вещества.

Декарбоксилирование аминокислот происходит при развитии гнилостных бактерий с образованием токсичных продуктов «грубых ядов». При декарбоксилировании гистидина образуется гистамин, орнитина - путресцин, лизина - кадаверин, тирозина - тирамин. Некоторые микробы вырабатывают фермент триптофаназу, под влиянием которой аминокислота триптофан распадается с образованием индола. Наличие индола образования используют при идентификации микроорганизмов.

Наряду с реакциями расщепления белков происходят и процессы их синтеза. Для построения белков бактерии используют аминокислоты. Бактериальные клетки удовлетворяют свои потребности в аминокислотах двумя путями: одни микроорганизмы получают аминокислоты при расщеплении белка, другие синтезируют их из простых соединений азота. Важным свойством микробов является способность синтезировать незаменимые аминокислоты (метионин, триптофан, лизин). Синтез белка совершается в рибосомах клетки.

Белковый обмен находится в тесной связи с углеводным обменом. Для построения белковых соединений используется пировиноградная кислота, а дикарбоновые кислоты являются активными посредниками в биосинтезе аминокислот.

Углеводный обмен. Углеводы расщепляются под действием ферментов с образованием глюкозы и мальтозы. Под влиянием ферментов мальтазы, сахаразы, лактазы дисахариды, поступившие внутрь клетки бактерии, подвергаются гидролизу и распаду на моносахариды, которые затем ферментируются с разрывом цепи молекул углевода и освобождением значительного количества энергии.

Расщепление микробами углеводов сопровождается образованием органических кислот, которые могут распадаться до конечных продуктов CO_2 и H_2O .

Синтез углеводов у микроорганизмов происходит фото- и хемосинтетически. При фотосинтезе зеленые и пурпурные бактерии, содержащие пигменты типа хлорофилла, синтезируют глюкозу из

диоксида углерода, содержащегося в воздухе. При этом для течения эндотермических реакций синтеза необходима энергия света.

Процесс фотосинтеза у бактерий (прокариот) отличается от фотосинтеза у зеленых растений (эукариоты). У растений при фотоллизе донором водорода служит вода, в результате чего выделяется молекулярный кислород.

У прокариот, за исключением синезеленых водорослей, донорами водорода являются H_2S , H_2 , другие минеральные и органические соединения, поэтому в результате реакции фотосинтеза кислород не образуется. Главным пигментом фотосинтеза у бактерий является бактериохлорофилл, у зеленых растений - хлорофилл, находящийся в хлоропластах, каждый из которых эквивалентен прокариотической клетке. У бактерий хлоропласты отсутствуют.

Хемосинтез осуществляют микроорганизмы, синтезирующие углеводы из глюкозы, которая предварительно образуется в результате сахаролитических реакций, т. е. расщепления сложных сахаров. Для хемосинтеза используется химическая энергия, освобождаемая при распаде аденозин трифосфорной кислоты (АТФ), т. е. энергия химических реакций.

Липидный обмен включает процессы гидролиза липидов, всасывания жирных кислот и моноглицеридов, биосинтеза специфических липидов, их расщепления и выделения конечных продуктов распада.

Большинство видов бактерий усваивают липиды в виде глицерина, который служит источником энергии. Микроорганизмы используют его также для синтеза липидов, которые в виде включений являются резервными питательными веществами (питательным материалом).

Основные процессы липидного обмена осуществляются при помощи липазы и других липолитических ферментов, прочно связанных с клеточной цитоплазмой.

Водно-солевой обмен включает поступление и выделение воды и минеральных солей, а также превращения, происходящие с ними.

Только небольшое число элементов Периодической системы Д.И. Менделеева требуется микроорганизмам в относительно высоких концентрациях - это десять главных биологических элементов (макроэлементы): С, О, Н, N, S, P, K, Mg, Ca, Fe. Основными компонентами органических соединений являются первые четыре элемента - органогены.

Сера требуется для синтеза аминокислот цистеина и метионина и некоторых ферментов. Фосфор входит в состав нуклеиновых кислот, фосфолипидов, тейхоевых кислот, многих нуклеотидов. Остальные четыре элемента - это ионы металлов, используемые в качестве кофакторов ферментов, а также компонентов металлокомплексов.

Кроме перечисленных главных элементов микроорганизмам требуются еще десять микроэлементов: Zn, Mn, Na, Cl, Mo, Se, Co, Cu, W, Ni, которые участвуют в синтезе ферментов, активизируют их.

Из различных элементов и их соединений микроорганизмы синтезируют белки, нуклеопротеиды, гликолипиднопротеидные комплексы, нуклеиновые кислоты, ферменты, витамины и др.

3.2. ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ МИКРООРГАНИЗМОВ

Для определения потребности микроорганизмов в питательных веществах необходимо знать их химический состав, поскольку он в определенной мере зависит и от питательных веществ, требуемых для роста и размножения микробов.

Клетка микробов состоит из воды и сухих веществ. Вода содержится в основном в цитоплазме клеток. Количество ее для большинства видов бактерий колеблется от 75 до 85 %. В спорах бактерий и клостридий концентрация воды составляет 40-50 %. В молодых клетках количество воды несколько меньше, чем в старых.

Вода в клетке находится в свободном состоянии или связана другими составными частями. Свободная вода служит дисперсионной средой для коллоидов и растворителем для кристаллических веществ, источником водородных и гидроксильных ионов, а также участвует в биохимических реакциях.

Связанная вода является структурным элементом цитоплазмы и не может быть растворителем. Сухие вещества бактерий (15-20 %) состоят из органической части и минеральных элементов. Органическая часть сухого остатка состоит из белков, углеводов, жиров и других соединений.

Б е л о к находится в основном в цитоплазме, нуклеоиде и цитоплазматической мембране, составляет 50-80 % сухого вещества бактериальной клетки. Различают простые (протеины) и сложные (протеиды) белки. Протеины расщепляются при гидролизе на отдельные аминокислоты. Протеиды состоят из простых белков, соединенных с небелковыми (простетическими) группами: с нуклеиновой кислотой (нуклеопротеиды, или ядерные белки), с полисахаридами (гликопротеиды), с жирами и жироподобными веществами (липопротеиды).

Белки микробной клетки, участвующие в образовании клеточных структур, называют структурными белками. Различают также резервные белки, являющиеся запасными веществами клетки. Например, липопротеиды могут находиться внутри клетки в виде включений полужидкой консистенции, а на поверхности цитоплазмы они образуют цитоплазматическую мембрану, регулирующую поступление веществ внутрь бактериальной клетки. Белки входят также в состав ферментов (энзимов).

У г л е в о д ы составляют 15-20 % сухого вещества и содержатся в микробных клетках в основном в виде полисахаридов. К ним относят также многоатомные спирты. Углеводы входят в состав капсул, клеточных мембран и цитоплазмы, а также являются запасными веществами в виде включений гликогена и крахмалоподобного вещества - гранулызы.

Жиры и жироподобные вещества (липиды и липоиды) составляют 3-10 % сухого остатка, входят в состав клеточных оболочек и надежно защищают клетку от воздействия внешней среды. В клеточной стенке возбудителя туберкулеза количество липоидов может достигать 20-40 %, что обуславливает самую высокую устойчивость (среди неспорообразующих бактерий) возбудителя к высоким температурам. Поэтому режимы пастеризации молока считаются эффективными, если они обеспечивают уничтожение возбудителя туберкулеза.

Жир может содержаться в цитоплазме также в виде включений. Бактериальные липиды состоят из свободных жирных кислот (26-28 %), нейтральных жиров (2,5-12,5 %), в состав которых входят эфиры жирных кислот и углеводов, а также восков и фосфолипидов.

Минеральные элементы (зола) составляют 2-14 % сухой бактериальной массы. Среди них в наибольшем количестве содержится фосфор (50 %), калий (25 %), также магний, сера, кальций.

Химический состав микробных клеток в аналогичных условиях является постоянным, однако, он зависит от веществ, которые содержатся в питательной среде, характера обмена и других условий внешней среды.

3.3. ФЕРМЕНТЫ МИКРООРГАНИЗМОВ И ИХ РОЛЬ В ОБМЕНЕ ВЕЩЕСТВ

Метаболизм у микробов осуществляется посредством многочисленных биохимических превращений (реакций), обусловленных биологическими катализаторами-ферментами клетки.

Каждый вид микроорганизмов имеет свой набор ферментов, которые обуславливают его физиологические свойства, что учитывают при идентификации микробов.

Ферменты, определяющие генотипические признаки клетки, называют конститутивными; ферменты, при участии которых проявляются признаки фенотипа, называют адаптивными или индуктивными.

Конститутивные ферменты постоянно находятся в клетке независимо от условий ее существования и наличия катализируемого субстрата. К ним относятся основные ферменты клеточного обмена (липазы, карбогидразы, протеиназы, оксидазы и др.).

Индуктивные ферменты синтезируются только тогда, когда в них возникает потребность. Они появляются в присутствии

соответствующего субстрата (щелочная фосфатаза, аминокислотная декарбоксилаза, пенициллиназа и др.) и способствуют адаптации (приспособлению) клетки к новым условиям обитания.

Различают также экзоферменты и эндоферменты.

Экзоферменты выделяются клеткой в окружающую среду. Они обеспечивают предварительное расщепление питательных веществ путем внешнего переваривания, т. е. внеклеточного пищеварения.

Эндоферменты находятся внутри клетки, они участвуют во внутриклеточных процессах метаболизма и могут освобождаться только после ее разрушения. После отмирания микроорганизмов их эндоферменты некоторое время остаются активными и могут вызвать автолиз, т. е. саморазрушение клетки. Автолиз молочнокислых бактерий и освобождение эндоферментов имеет положительное значение при созревании сыров и производстве других молочных продуктов.

Ферменты, являясь белковыми веществами, весьма чувствительны к действию факторов внешней среды. Они начинают разрушаться и инактивироваться при 45-50 °С, а термостойчивые (термостабильные) - при 70 °С. При температуре 80-90 °С практически все ферменты разрушаются. Минусовые температуры не разрушают ферменты, но при температурах, близких к нулю и ниже, ферментативные реакции резко замедляются, а некоторые полностью прекращаются. Разрушают ферменты ультрафиолетовые лучи и радиоактивные излучения.

На активность ферментов влияют различные химические вещества. Активаторами ферментов могут быть некоторые соли (NaCl), катионы двухвалентных металлов - кальция, марганца, никеля, магния; некоторые органические вещества (витамины). Ингибиторами ферментов являются соли тяжелых металлов, антибиотики и другие вещества.

По характеру вызываемых превращений ферменты разделены на шесть классов: гидролазы, оксидоредуктазы, трансферазы, лиазы, изомеразы, лигазы.

Гидролазы - ферменты гидролитического расщепления. Они катализируют распад белков, углеводов, липидов путем присоединения молекулы воды. В зависимости от веществ, на которые действуют гидролазы, их подразделяют на протеазы, карбогидразы, эстеразы.

Протеазы (протеолитические ферменты) катализируют гидролиз белков и продуктов их гидролитического распада - пептонов и полипептидов. К протеазам относятся протеиназы - ферменты, катализирующие гидролиз натуральных белков; пептидазы, расщепляющие полипептиды до дипептидов и аминокислот; дипептидазы, расщепляющие дипептиды до аминокислот.

Протеолитические ферменты в больших количествах выделяются гнилостными бактериями и плесенями. Они вызывают гнилостную порчу продуктов.

Карбогидразы (гликозидазы) катализируют гидролиз углеводов. Распад крахмала катализирует фермент амилаза, мальтозу расщепляет мальтаза, сахарозу - сахараза, лактозу - лактаза.

Эстеразы катализируют гидролиз сложных эфиров. К ним относятся ферменты липазы, расщепляющие жиры на глицерин и высокомолекулярные жирные кислоты, и фосфатазы, гидролизующие эфироподобные фосфорорганические соединения.

Оксидоредуктазы катализируют окислительно-восстановительные реакции. К ним относятся дегидрогеназы, каталаза и пероксидазы.

Дегидрогеназы катализируют реакции окисления, при которых происходит отщепление водорода (дегидрогенирование) от органических веществ. Отнятый водород передается какому-либо другому веществу, которое называется акцептором водорода, а вещества, отдающие водород, называются донорами водорода. Эти ферменты являются специфичными по отношению к донору и акцептору. Их подразделяют на аэробные и анаэробные дегидрогеназы.

Аэробные (вторичные) дегидрогеназы могут передавать водород от донора непосредственно кислороду воздуха либо через промежуточных переносчиков водорода. Эти ферменты имеют только у аэробных микроорганизмов. Аэробные дегидрогеназы, которые передают водород от субстрата непосредственно кислороду воздуха, называют **оксидазами**.

Анаэробные (первичные) дегидрогеназы катализируют отщепление водорода от донора и передачу его молекулам каких-либо органических веществ. Они имеют как у анаэробных, так и у аэробных микробов.

Каталаза в окислительных реакциях не участвует, она разлагает пероксид водорода (H_2O_2) на воду и кислород. Пероксид образуется при аэробном дыхании и является ядовитым соединением для клетки.

Пероксидазы катализируют окисление органических соединений кислородом, появляющимся при распаде пероксида водорода.

Трансферазы — ферменты, катализирующие перенос групп атомов от одного соединения к другому. Среди этого класса ферментов основными являются фосфоферазы и аминоксиферазы.

Фосфоферазы (фосфокиназы) катализируют перенос остатков фосфорной кислоты. Реакции протекают с участием аденозинтрифосфата (АТФ) и аденозиндифосфата (АДФ), и таким образом осуществляется перенос энергии с одной системы на другую.

Аминоксиферазы катализируют реакции переаминирования, т. е. осуществляют перенос аминогруппы ($-NH_2$) с аминокислот на кетокислоты (например, пировиноградную кислоту).

Лиазы - ферменты, катализирующие реакции негидролитического расщепления веществ, при которых происходит разрыв химических связей между атомами углерода, а также углерода и

кислорода. К лиазам относятся декарбоксилазы.

Декарбоксилазы катализируют отщепление от органических кислот CO_2 , т. е. их декарбоксилирование. Например, при декарбоксилировании пировиноградной кислоты образуется уксусный альдегид.

Декарбоксилированию подвергаются и аминокислоты, при этом реакции катализируются декарбоксилазами аминокислот гнилостных бактерий.

Изомеразы катализируют изомеризацию органических соединений, т. е. распад полимерных соединений на их изомеры. Изомеразы участвуют в расщеплении углеводов на первой стадии аэробного и анаэробного дыхания.

Лигазы (синтетазы) - ферменты, катализирующие реакции соединения молекул. Они отвечают за синтез вещества, который протекает с использованием энергии, освобождающейся при расщеплении АТФ.

Ферменты микробного происхождения нашли широкое применение в сельском хозяйстве, медицине, некоторых отраслях промышленности. Они постепенно вытесняют ферментные препараты, получаемые из высших растений и животных. В последнее время изучается вопрос получения ферментных препаратов молочнокислых бактерий и использования их в молочной промышленности, особенно при производстве сыров.

3.4. АНАБОЛИЗМ (ПИТАНИЕ) МИКРООРГАНИЗМОВ

П и т а н и е - это процесс усвоения микробной клеткой питательных веществ, поступающих из окружающей среды, в результате которого они превращаются в составные части биологических структур клетки или откладываются в ней в виде запасов.

Большинство микроорганизмов, так же как и растения, обладают гололитным способом питания, или внеклеточным (внешним) пищеварением, которое происходит в окружающей среде (субстрате) под действием экзоферментов микроорганизмов.

Существует также голозойный способ питания, так называемое внутриклеточное пищеварение, которое происходит внутри клетки под действием эндоферментов. Оно присуще простейшим и некоторым низкоклеточным многоклеточным организмам и характеризуется заглатыванием (обволакиванием) плотных частиц пищи, перевариванием и превращением их в растворимые соединения (эндоцитоз).

Типы питания. Большинство биологических элементов, кроме углерода и азота, поглощаются микроорганизмами в виде катионов и анионов.

В зависимости от источника усвоения углерода все

микроорганизмы делятся на две группы - автотрофы и гетеротрофы.

Автотрофы (от греч. *autos* - сам, *trophe* - питание, т. е. сами себя питающие) усваивают углерод из диоксида углерода воздуха и из него синтезируют все углеродсодержащие компоненты клетки.

Такой синтез происходит с использованием энергии, поскольку реакции синтеза являются эндотермическими. В качестве источника энергии автотрофные микроорганизмы используют солнечный свет или химическую энергию окисления минеральных веществ и соответственно называются фотоавтотрофами и хемоавтотрофами.

По типу усвоения углерода **фотоавтотрофные микроорганизмы** напоминают зеленые растения, образующие в процессе фотосинтеза углеводы из CO_2 и H_2O .

К фотоавтотрофам относят цветные бактерии, имеющие в цитоплазме своих клеток пигменты типа хлорофилла.

К **хемоавтотрофам** относят нитрифицирующие бактерии, серо- и железобактерии, которые обитают преимущественно в почве.

Гетеротрофы (от греч. *heteros* - другой, питающийся за счет других) не способны усваивать CO_2 , а получают углерод из готовых органических соединений. К наиболее легко усвояемым источникам углерода относятся гексозы и многоатомные спирты. Могут использоваться аминокислоты, органические кислоты и др.

Гетеротрофами являются большинство микроорганизмов: возбудители брожений, гнилостные бактерии, актиномицеты, плесени, болезнетворные (патогенные) микробы и др.

Группу гетеротрофных микроорганизмов подразделяют на две подгруппы: метатрофы и паратрофы.

Метатрофы (от греч. *meta* - между, *tropho* - питание), или сапрофиты (от греч. *sapros* - гниение, *phyton* - растение), для питания используют углерод органических субстратов. К ним относятся возбудители брожений, гнилостные бактерии, ничтчатые грибы, т. е. микроорганизмы, развивающиеся преимущественно во внешней среде.

Паратрофы (от греч. *para* - около, *tropho* - питание), или паразиты (от греч. *para* - около, *sitos* - пища), - преимущественно болезнетворные (патогенные) микроорганизмы, использующие углеродсодержащие органические вещества животных и растений, т. е. паразитирующие в тканях живых организмов. Абсолютными (внутриклеточными) паразитами являются вирусы и риккетсии, которые развиваются в живых клетках людей, животных, растений или бактерий.

В отличие от вирусов и риккетсий многие патогенные микроорганизмы-паразиты могут размножаться на искусственных питательных средах, т. е. по типу питания занимают промежуточное положение между паразитами и сапрофитами. К ним относятся патогенные стафилококки, стрептококки, возбудители бруцеллеза,

туберкулеза, сибирской язвы и других инфекционных болезней.

В зависимости от источника усвоения азота все микроорганизмы можно разделить на две основные группы: **аминоавтотрофы** и **аминогетеротрофы**.

Аминоавтотрофы усваивают азот из неорганических источников. К этой группе относятся азотфиксирующие и нитритно-нитратные микроорганизмы.

Азотфиксирующие бактерии способны усваивать молекулярный азот воздуха - клубеньковые бактерии на корнях растений, почвенные бактерии родов *Azotobacter* и *Clostridium*.

Нитритно-нитратные почвенные микроорганизмы окисляют аммиак до солей азотистой и азотной кислот и усваивают эти окисленные формы азота.

Аминогетеротрофы используют органические источники азотного питания. К ним относятся дезаминирующие, пептонные (пептонизирующие), протеолитические и паратрофные микроорганизмы.

Дезаминирующие микроорганизмы могут усваивать только аминокислоты. К ним относятся некоторые патогенные бактерии.

Пептонные бактерии (пептонизирующие) в качестве источника азота потребляют органические соединения типа пептонов. Они, как правило, не способны расщеплять целую белковую молекулу. К этой группе бактерий относятся молочнокислые, пропионовокислые бактерии, энтерококки, микрококки и кишечные палочки.

Протеолитические микроорганизмы, или гнильные, в качестве источника азота используют натуральные белки, которые предварительно разлагаются их протеолитическими экзоферментами. Протеолитической ферментативной активностью обладают гнильные бактерии, плесени, актиномицеты.

Паратрофные микроорганизмы в качестве источника азота используют белковые вещества живого организма. Это патогенные микроорганизмы.

Промежуточное положение между аминоавтотрофами и аминогетеротрофами занимают микробы, способные усваивать аммиачные соли, а также азот белков, пептонов, аминокислот (почвенные азотфиксирующие клостридии - *Cl. pasteurianum*).

Микроорганизмы, способные синтезировать все соединения из глюкозы как единственного источника углерода и из солей аммония как единственного источника азота, называются **прототрофами**. В отличие от прототрофов микроорганизмы, не способные синтезировать какиелибо соединения из глюкозы и солей аммония, называют **ауксотрофами**. Ауксотрофными микроорганизмами являются многие патогенные бактерии и микробы, входящие в состав нормальной микрофлоры организма животных и человека. Они нуждаются в готовых соединениях,

которые сами не могут синтезировать. Эти соединения для ауксотрофов являются факторами роста.

Проникновение питательных веществ в клетку. Существует четыре различных механизма, с помощью которых вещества окружающей среды проходят через клеточную мембрану в цитоплазму клетки: пассивная и облегченная диффузии, активный транспорт и перенос групп.

При пассивной диффузии переносимое вещество не взаимодействует специфически с компонентами клеточной мембраны. Оно проходит сквозь мембрану до тех пор, пока не установится равновесие между концентрациями внутри и снаружи клетки, т.е. процесс пассивной диффузии осуществляется за счет градиента концентрации компонентов по обе стороны мембраны. При этом внутреннее напряжение бактериальной клетки, так называемый тургор, является одним из основных условий, обеспечивающих нормальное поступление в нее питательных веществ.

Для большинства бактерий тургор наиболее выражен при 0,85 %-ной концентрации солей в окружающей среде. Эта концентрация называется изотонической.

При гипертонической концентрации, т.е. при повышении ее до 2-3 %, наступает плазмолиз - сжатие, сморщивание цитоплазмы и отслаивание ее от клеточной стенки.

При помешении бактерий в гипотонический раствор, например в дистиллированную воду, последняя поступает внутрь клетки. Объем клетки при этом увеличивается и она может даже разрушиться. Это явление получило название плазмолиза.

При плазмолизе и плазмолизе поступление питательных веществ в клетку затруднено или вовсе отсутствует и клетка погибает.

В природе концентрация большинства метаболитов в клетке выше, чем снаружи, поэтому транспорт путем осмоса и пассивной диффузии ограничен небольшой группой веществ, а именно газами, такими, как кислород, водой и ионами натрия, молекулами углеводов и некоторых других веществ.

Второй способ прохождения веществ в клетку - **облегченная диффузия**. Скорость транспорта веществ в клетку в условиях повышения концентрации субстрата возрастает до определенного предела. При облегченной диффузии кроме градиента концентрации функционируют электрические переносчики, находящиеся в мембране: субстрат соединяется с протоном и белком-переносчиком и по электрическому градиенту диффундирует в клетку. Переносчики являются специфичными по отношению к субстрату. Если, например, мембрана содержит только глюкозоспецифический переносчик, то другие углеводы не смогут транспортироваться в клетку. Дрожжевые клетки

поглощают сахара путем облегченной диффузии, а у аэробных бактерий такой механизм транспорта почти отсутствует, у анаэробов этим способом происходит поглощение некоторых соединений и выделение продуктов обмена.

Большинство веществ и соединений независимо от концентрационных и электрохимических градиентов поступают в клетку и выделяются из нее путем активного транспорта с помощью ферментов-переносчиков. В этом случае совместно с белком-переносчиком функционирует специальная система, обеспечивающая процесс переноса с использованием энергии. Система связана с биологическим окислением (дыханием) в клетке, при котором в дыхательной цепи мембраны происходит выброс протонов, обеспечивающий мембранный потенциал. В процессе жизнедеятельности происходит постоянный вынос протонов из клетки в среду, вследствие чего их концентрация в клетке снижается. Таким образом, образовавшийся вне клетки комплекс переносчик - протон-субстрат, проникнув внутрь клетки, распадается за счет отсоединения протона, и субстрат остается в цитоплазме.

Поглощение аминокислот у прокариот происходит путем активного транспорта, однако, некоторые предшественники белков, переносимых в клетку, синтезируются на полисомах, связанных с цитоплазматической мембраной. Активный транспорт обеспечивает движение веществ против градиента концентрации. Необходимая для этого энергия поставляется из АТФ. Наблюдается концентрирование веществ в несколько сот раз. Следовательно, активный транспорт дает возможность клеткам расти на средах, содержащих субстраты в низких концентрациях.

Перенос групп отличается от активного транспорта тем, что субстрат появляется внутри клетки в химической модифицированной форме в виде фосфатного эфира.

Факторы роста. Для развития микроорганизмов помимо питательных веществ необходимы также вещества, которые не служат источником энергии и не являются пластическим материалом. Они называются факторами роста или ростовыми веществами.

При наличии в среде ростовых веществ аукоотрофные бактерии приобретают способность синтезировать все органические соединения, необходимые для роста клетки. Факторы роста можно объединить в три группы: витамины и родственные соединения; аминокислоты; пурины и пиримидины.

Количество и природа факторов роста, которые должны присутствовать в питательной среде, различны для разных микробов. Они требуются в ничтожно малых количествах, обычно в тысячных долях миллиграмма на 1 л питательной среды.

Для роста молочнокислых бактерий требуются практически все

аминокислоты, пурины, пиримидины, витамины. Общим свойством всех микроорганизмов является потребность во многих витаминах и родственных соединениях, к которым относятся *л*-аминобензойная кислота, биотин, фолиевая кислота, гемин, линолевая, никотиновая, пантотеновая кислоты, приридоксин (витамин В₆), рибофлавин (витамин В₂), тиамин (витамин В₁), цианкобаламин (витамин В₁₂), витамин К и др.

Автотрофы не нуждаются в витаминах, они сами их синтезируют. Имеются микроорганизмы, которые нуждаются в витаминах, но все же могут расти и без них. При добавлении витаминов в питательную среду развитие таких микробов ускоряется в сотни раз.

Для многих гетеротрофных микроорганизмов ростовые вещества являются жизненно необходимыми. Их используют в качестве индикаторов в питательных субстратах. Так, *L. helveticum* не растет при отсутствии в среде рибофлавина, *Lactococcus lactis* - при отсутствии фолиевой кислоты.

Потребность в факторах роста изучают на средах известного состава. Ее устанавливают для всех микроорганизмов, поэтому микробиологи часто добавляют в среду дрожжевой экстракт и пептон в качестве полноценных и дешевых источников ростовых факторов. Ростовые вещества содержатся также в молоке, в животных и растительных тканях.

3.5. КАТАБОЛИЗМ (ДЫХАНИЕ) МИКРООРГАНИЗМОВ

Дыхание (биологическое окисление) - сложный процесс окисления различных, преимущественно, органических соединений, сопровождающийся расщеплением их до более простых веществ и выделением энергии.

Сущность дыхания микроорганизмов заключается в совокупности многочисленных биохимических реакций, обуславливающих перенос электронов, окисление субстрата и освобождение энергии, происходящее внутри клетки.

Различают два типа биологического окисления: прямое и непрямое.

При прямом окислении неорганические вещества, такие, как молекулярный водород, оксид углерода, метан, сера, аммиак, соли азотистой кислоты, железо и др., окисляются атмосферным кислородом с помощью ферментов оксидаз. При прямом окислении неорганических веществ получают энергию автотрофные почвенные бактерии.

При непрямом окислении происходит отщепление водорода, точнее, его электрона от донора и присоединение его к акцептору. Поэтому непрямое окисление называют дегидrogenированием. Непрямому окислению путем дегидrogenирования подвергаются органические вещества при помощи дегидrogenаз.

Различают аэробное и анаэробное дегидrogenирование. При

аэробном дегидрогенировании микроорганизмы используют в качестве конечного акцептора водорода атмосферный кислород. Водород отщепляется от донора с помощью фермента дегидрогеназы и передается акцептору не сразу, а проходит ряд промежуточных этапов.

При аэробном дегидрогенировании происходит полное и неполное окисление. В случае полного окисления конечными продуктами являются вода и диоксид углерода, происходит освобождение всей энергии. При неполном окислении высвобождается лишь часть энергии.

При анаэробном дегидрогенировании микробы используют в качестве акцепторов водорода не кислород, а азот, серу, углерод и другие соединения, образуемые при распаде субстрата, например пировиноградной кислоты. При этом водород довольно легко соединяется с азотом, серой, углеродом, которые восстанавливаются до аммиака (NH_3), сероводорода (H_2S), метана (CH_4).

Дегидрогенирование углеводов называют брожением, оно чаще происходит в анаэробных условиях. Конечными продуктами такого окисления являются органические кислоты, этиловый и бутиловый спирты, ацетон и другие продукты.

Таким образом, прямое окисление и дегидрогенирование приводят к одному результату - окислению субстрата, т. е. отщеплению от субстрата водорода, и присоединению его к акцептору (восстановлению).

Перенос электрона всегда сопровождается высвобождением энергии, которая немедленно утилизируется клеткой с помощью особых соединений, получивших название аденозинтрифосфата (АТФ) и аденозиндифосфата (АДФ). В них она накапливается в органических фосфатных (макроэргических) связях и расходуется клеткой по мере необходимости для синтеза клеточного вещества. Процесс этот происходит в клетках бактерий в мезосомах, а в животных клетках - в митохондриях.

По типу дыхания микроорганизмы разделяют на четыре основные группы: облигатные аэробы, облигатные и факультативные анаэробы и микроаэрофилы.

Облигатные (безусловные) аэробы растут при свободном доступе кислорода воздуха, имеют ферменты (цитохромы, цитохромоксидазу и др.), обеспечивающие передачу водорода от донора (электронов субстрата) к конечному акцептору кислороду воздуха. Размножаются при наличии в атмосфере до 20 % кислорода, на питательных средах растут в верхних слоях. К ним относятся уксуснокислые бактерии, возбудитель туберкулеза, пигментные гнилостные бактерии, многие плесени и другие микроорганизмы.

Облигатные анаэробы способны к размножению только в атмосфере, свободной от кислорода, или при его содержании не более 5 %. Эти микроорганизмы не имеют цитохромов, и конечным акцептором

водорода является субстрат (азотсодержащее вещество, углеводы и др.). При свободном поступлении воздуха или в атмосфере, содержащей 5 % и более кислорода, они могут погибнуть. В эту группу входят маслянокислые и пропионовокислые бактерии, гнилостные клостридии, возбудитель ботулизма, бифидобактерии и др.

Факультативные анаэробы развиваются как при доступе кислорода воздуха, так и в отсутствие его. Они имеют набор ферментов, обеспечивающий аэробный и анаэробный тип биологического окисления (дыхания). Это многочисленная группа микроорганизмов, к которым относятся молочнокислые бактерии, стафилококки, бактерии группы кишечных палочек, гнилостные бактерии рода *Proteus* и др.

У молочнокислых бактерий метаболизм протекает по анаэробному типу и поэтому их можно назвать облигатными анаэробами, но в связи с тем, что они могут расти в присутствии кислорода воздуха, их относят к группе, так называемых, аэротолерантных (воздухотерпимых) микроорганизмов.

Микроаэрофилы нуждаются в значительно меньшем количестве кислорода, чем аэробы. Они развиваются при концентрации кислорода в окружающей среде не более 10 %, т. е. у них преобладает аэробный тип дыхания. Такие условия благоприятны для развития актиномицетов, лептоспир, возбудителя бруцеллеза, плесени рода *катулярия* и др.

Одновременно с процессами окисления в бактериальной клетке протекают биохимические реакции восстановления, характер которых во многом зависит от состава среды (см. гл. 4).

3.6. РОСТ И РАЗНОЖЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Сложные процессы метаболизма, происходящие в клетке, отражаются такими явлениями, как рост и размножение микроорганизмов.

Термин «рост» означает увеличение массы клеток микроорганизмов в результате синтеза клеточного материала.

Интенсивность роста микроорганизмов можно определить делением их массы на численность особей в единице объема в отдельные промежутки времени. Рост индивидуальной клетки заканчивается размножением.

Под размножением микробов подразумевают способность их к самовоспроизведению, т. е. увеличению количества особей микробной популяции на единицу объема.

Отдельные группы микроорганизмов размножаются различными способами. У бактерий преобладает деление, может быть почкование. Грибы размножаются при помощи спор, вегетативным способом

(участками мицелия), половым путем и почкованием (дрожжи). Вирусы размножаются путем репродукции вирусных частиц внутри клетки-хозяина.

Прокариотические клетки размножаются путем прямого (поперечного) деления. В процессе роста в клетках начинает нарастать количество общего азота, РНК и ДНК. Нуклеоид увеличивается в объеме, и в точках прикрепления к цитоплазматической мембране двухспочечная ДНК под действием ферментов разрывается по водородным связям. Происходит репликация ДНК и синтез комплементарных вторичных цепочек, которые расходятся по полюсам клетки. Они в дальнейшем станут нуклеоидами дочерних клеток.

После деления нуклеоида начинается образование поперечной двухслойной перегородки, которая формируется за счет цитоплазматической мембраны.

Различают изоморфное и гетероморфное деления клеток. При изоморфном делении перегородка формируется на середине клетки, в результате чего образуются две одинаковые по величине клетки. В некоторых случаях деление носит асимметричный характер, при котором дочерняя клетка отделяется от одного из концов бактерии и новые клетки имеют неодинаковую величину. Такое деление называют гетероморфным. Оно может наблюдаться в старых культурах, после обработки микроорганизмов малыми дозами пенициллина, некоторыми химическими веществами, при ультрафиолетовом облучении и воздействии других факторов. В результате такого воздействия происходит нарушение координации между ростом и делением клетки, в результате чего бактерия увеличивается, а деление ее не осуществляется.

Разделившиеся клетки могут отделяться одна от другой или оставаться рядом, формируя дипло- или стрептобактерии, стрептококки, стафилококки и сарцины. Это зависит от характера распределения слизистого слоя вокруг разделившейся клетки, от свойств питательной среды и др.

У большинства бактерий делящая перегородка располагается, как правило, перпендикулярно длине, у кокков - в любой плоскости. У спирихет в редких случаях перегородка может располагаться и вдоль клетки.

Бактерии характеризуются высоким темпом размножения, который обусловлен небольшим временем генерации, т. е. периодом, в течение которого осуществляется деление клетки. Например, время генерации кишечных палочек в оптимальных условиях составляет около 20 мин. Продолжительность периода зависит от вида бактерии, ее возраста, характера среды, условий культивирования и т. п.

Теоретически вычислено, что при делении клетки через каждые 20-30 мин количество бактерий за 24 ч составило бы 10-15 млрд. клеток,

а через 5 сут. размножения одна клетка дала бы такую живую массу потомства, которая заполнила бы собой бассейны морей и океанов нашей планеты.

Однако в действительности такого быстрого размножения микробов не происходит, так как в естественных условиях отрицательно влияют на размножение накапливающиеся продукты метаболизма, ультрафиолетовые лучи, низкая и высокая температуры внешней среды и др.

Размножение бактерий в ограниченном объеме жидкой питательной среды (в пробирке, колбе) происходит в определенной закономерности, изображаемой в виде типичной кривой размножения (рис. 16). Эта кривая косвенно характеризует также и отмирание клеток, параллельно идущее с размножением.

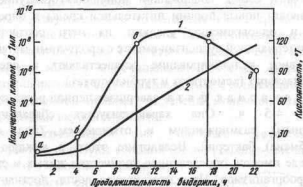


Рис. 16. Кривая роста бактериальной популяции:
1 - количество клеток; 2 - кислотность.
а-б - начальная фаза (лаг-фаза); в-г - фаза логарифмического роста (лог-фаза); г-д - стационарная фаза; д-е - фаза отмирания

На рис. 16 представлены две кривые, одна из которых отражает количество жизнеспособных клеток молочнокислых стрептококков, другая - накопление молочной кислоты, подавляющей их развитие.

На кривой размножения различают четыре основные фазы роста культуры, сменяющие друг друга в определенной последовательности: начальная фаза (лаг-фаза), экспоненциальная, или логарифмическая (лог-фаза), стационарная фаза и фаза отмирания.

Лаг-фаза - период задержки роста микроорганизмов, в течение которого внесенные в питательную среду бактерии адаптируются к новым условиям обитания и начинают размножаться с нарастающей скоростью. В этой фазе размеры клеток в 3-5 раз больше обычных, имеют большую биохимическую и энергетическую активность и повышенную чувствительность к различным бактерицидным факторам. Продолжительность лаг-фазы зависит от видовых особенностей микроорганизмов, количества засеваемого материала, питательных

вещств и др. Для молочнокислых бактерий этот период составляет от 1 до 4 ч.

Л о г - ф а з а характеризуется быстрым и постоянным (через равные промежутки времени) размножением бактерий - логарифмическим ростом их популяции, т. е. количество клеток увеличивается в геометрической прогрессии: за время равное одной генерации - в 2 раза, за два срока - в 4 раза, за три генерации - в 8 раз и т. д. В этот период морфологические свойства типичны для данного вида, вся популяция однородна, устойчивость клеток к неблагоприятным факторам возрастает. Продолжительность этой фазы 5-8 ч.

Для того чтобы клетки длительное время находились в экспоненциальной фазе роста, микроорганизмы выращивают в так называемой непрерывной культуре.

При этом в сосуд, содержащий популяцию растущих клеток, непрерывно вводят новые порции питательной среды в определенных количествах и одновременно удаляют из него соответствующее количество бактериальной суспензии вместе с продуктами метаболизма.

Непрерывное культивирование осуществляют в специальных сосудах-култиваторах (хемостазах и турбидостазах).

С т а ц и о н а р н а я ф а з а завершает период роста культуры и продолжается 4-5 ч. Она характеризуется сбалансированным (уравновешенным) размножением и отмиранием (под действием продуктов обмена) бактерий. Вследствие этого в каждую единицу времени в среде имеется определенное количество живых и столько же мертвых микроорганизмов. При этом кривая роста, достигнув своего максимума, становится параллельной оси абсцисс. В этой стадии наряду с типичными клетками встречаются дегенеративные и инволюционные формы. Эти изменения обусловлены ограничением количества питательного субстрата, большой концентрацией клеток и накоплением токсических продуктов обмена.

Ф а з а о т м и р а н и я (старения культуры) характеризуется превосходством количества погибающих бактерий над количеством образующихся.

Кривая роста приобретает наклонное положение, она соответствует фазе отмирания микроорганизмов, т. е. гибели с постоянной скоростью через равные промежутки времени.

Причиной отмирания клеток являются истощение питательной среды, накопление ядовитых продуктов обмена, изменение физико-химических свойств среды, автолиз, т. е. лизис клеток под действием собственных ферментов. В этой фазе бактерии изменяют свою морфологию - появляются шаровидные, нитевидные, ветвящиеся и другие формы. У спорообразующих видов наряду с отмиранием вегетативных клеток происходит образование спор. Микроорганизмы

могут утрачивать подвижность, способность воспринимать окраску, становятся грамотриабельными (изменяют окраску по Граму), утрачивают часть биохимической активности, вирулентности, антигенных свойств и др.

Продолжительность фазы у разных видов бактерий неодинакова. Для большинства сапрофитных и молочнокислых бактерий она составляет 2-3 сут. Некоторые виды молочнокислых бактерий погибают через 7-10 дней.

Описанные закономерности развития популяции будут правильными при выращивании ее в оптимальных условиях. Так, если поместить посевы в ледяную воду, культура прекратит рост и кривая роста не только не поднимется вверх, но после некоторой протяженности по горизонтали опустится вниз.

Рост микроорганизмов в жидкой питательной среде может проявляться помутнением и изменением цвета среды, наличием или отсутствием пристеночного колыша и поверхностной пленки различного характера, наличием или отсутствием осадка. При выращивании на обезжиренном молоке молочнокислые бактерии вызывают в первые сутки культивирования свертывание молока с образованием однородного плотного сгустка без обильного выделения молочной сыворотки и газа, с кисло-молочными вкусом и запахом.

При размножении на плотных питательных средах микроорганизмы образуют колонии (от лат. *colonia* - поселение), которые представляют собой видимые скопления особой одного вида и формирующиеся в результате размножения, как правило, одной клетки.

Они бывают круглой, розеткообразной, звездчатой, древовидной формы (рис. 17), могут иметь поверхность гладкую, выпуклую, плоскую, куполообразную, вдавленную. Колонии отличаются также по строению края, который может быть ровным (S-форма) и шероховатым (R-форма). По величине колонии подразделяют на крупные (свыше 4 мм) в диаметре, средние (2-4 мм), мелкие (1-2 мм) и карликовые (меньше 1 мм).

Колонии отличаются также по консистенции, плотности, прозрачности, цвету. Они бывают слизистыми, сметанообразными, вязкими, сухими, прозрачными, полупрозрачными и непрозрачными, окрашенными и бесцветными.

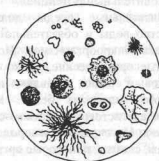


Рис. 17. Колонии бактерий

Различные виды микроорганизмов образуют специфические колонии на плотных питательных средах и дают характерный рост на жидких средах. Особенности роста микробов на питательных средах называют культуральными свойствами. Их учитывают при определении видов микроорганизмов.

3.7. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Для выделения чистой культуры микроорганизмов, изучения их биологических свойств с целью идентификации, а также для получения биомассы необходимо размножить микроорганизмы в условиях лаборатории. Культивирование, или выращивание, микробов возможно лишь при создании определенных условий для их жизнедеятельности. Большинство бактерий, дрожжей, плесеней культивируют на искусственных питательных средах. Вирусы и риккетсии размножаются только в живых клетках, культуре тканей, курином эмбрионе или в организме животного.

Искусственные среды, применяемые для культивирования микроорганизмов, должны соответствовать определенным требованиям: быть легкоусвояемыми, с необходимым составом азотистых и углеводных веществ, витаминов, необходимой концентрацией солей, с определенным водородным показателем (рН среды); обладать буферными свойствами; иметь оптимальный окислительно-восстановительный потенциал.

Питательные среды должны также содержать достаточное количество воды и обязательно быть стерильными, т. е. до посева не содержать микроорганизмов. Источником азота в средах могут быть различные органические, редко - неорганические соединения. Часто к безбелковым средам добавляют пептон, представляющий собой продукт неполного гидролиза белка. Протеолитические микроорганизмы в качестве азотистого вещества могут использовать желатин («животный студень»). Источником углерода в питательных средах чаще служат углеводы, спирты, некоторые органические кислоты.

Для приготовления искусственных питательных сред можно использовать различные естественные продукты: молоко, кровь, сыворотку, мясо, желток куриного яйца, картофель и другие органические вещества и минеральные соли.

Искусственные питательные среды по назначению подразделяют на четыре основные группы: универсальные, специальные, избирательные (элективные) и дифференциально-диагностические.

К универсальным средам относят мясо-пептонный бульон и мясо-пептонный агар, на которых растут многие виды патогенных и непатогенных бактерий.

Специальные среды применяют для выращивания бактерий, не размножающихся на универсальных средах. К специальным относят среды с молоком, сывороткой крови, с добавлением крови животных, глюкозы и др. На них выращивают молочнокислые бактерии, патогенные и другие микроорганизмы.

В избирательных (элективных) средах хорошо развиваются только бактерии определенных видов. К таким средам относятся среды обогащения, в которых интересующий исследователя вид растет быстрее сопутствующих бактерий. Например, среда Кесслер, содержащая в своем составе генцианвиолет и желчь крупного рогатого скота, элективна для устойчивых к этим веществам грамотрицательных кишечных палочек и вместе с тем селективна для чувствительных грамположительных бактерий.

Дифференциально-диагностические среды используют для дифференциации определенных видов бактерий по их культуральным и биохимическим свойствам. К ним относятся:

среды для определения протеолитической активности (мясопептонный желатин - МПЖ, молочный агар и др.);

среды для определения ферментации углеводов (среды Гисса, Эндо, Плоскирева и др.);

среды для определения гемолитической способности (кровяной агар и другие среды с добавлением крови животных);

среды для определения восстановительной (редуцирующей) способности микроорганизмов (среда Вильсон-Блера);

селективные среды, применяемые для дифференциации прототрофных и ауксотрофных бактерий.

По консистенции питательные среды могут быть плотными, полужидкими и жидкими. Для получения сред плотной консистенции к жидким средам добавляют 2-2,5 % агара или 10-20 % желатина. Полужидкие среды получают при добавлении 0,5-1,0 % агара. Агар (по-малайски «желе») - плотное волокнистое вещество, получаемое из красных водорослей и образующее в водных растворах плотный гель (студень). Он состоит в основном из полисахаридов (70-75 %). Основными компонентами агара являются высокомолекулярные вещества агароза и агаропептин, которые не расщепляются и не усваиваются микроорганизмами. В связи с этим агар не является питательным субстратом, его добавляют в среды исключительно для получения плотной консистенции. Агар расплавляется в воде при 100 °С, а застывает при 40-43 °С. Его выпускают в виде желтоватых пластинок или серовато-белого порошка.

Осмотические условия, необходимые для жизнедеятельности микробов, создают в питательной среде добавлением хлорида натрия или определенным сочетанием солей фосфата натрия и фосфата калия.

Для жизнедеятельности микроорганизмов большое значение имеет реакция среды - водородный показатель (рН), который определяется соотношением водородных (H⁺) и гидроксильных (ОН⁻) ионов. Он представляет собой логарифм числа абсолютной концентрации водородных ионов.

Водородный показатель нейтральной реакции соответствует 7,0. В этом случае число водородных ионов равно числу гидроксильных. Показатель ниже 7,0 указывает на кислую реакцию, а выше 7,0 - на щелочную. Микроорганизмы приспособились развиваться в условиях с чрезвычайно широким диапазоном рН - от 2,0 до 8,5. Большинство сапрофитных и патогенных микроорганизмов культивируют при слабощелочной реакции среды с рН 7,2-7,4. Для культивирования молочнокислых бактерий, дрожжей и плесеней необходима кислая реакция среды, рН 5,0-6,5.

В настоящее время многие питательные среды выпускают в виде готовых сухих сред-полуфабрикатов, содержащих все необходимые для жизнедеятельности микроорганизмов ингредиенты. Для приготовления питательной среды порошок разводят водой, полученную смесь кипятят, устанавливают необходимое значение рН и стерилизуют.

Большое значение для роста и размножения микроорганизмов на искусственных питательных средах имеют температурные условия. По отношению к температурному режиму все микроорганизмы делят на три группы: психрофильные (холодолюбивые), мезофильные (средние), термофильные (теплолюбивые). Температурные границы размножения у психрофилов составляют от 0 до 20 °С, у мезофилов - от 20 до 45 °С, у термофилов - от 45 до 70 °С.

При выращивании аэробов посевы культивируют в термостатах при доступе кислорода воздуха, т. е. в обычных условиях. Для культивирования анаэробов создают бескислородные условия, которые можно достичь физическими, химическими и биологическими методами. Используют также анаэробные термостаты.

Физические методы основаны на создании вакуума в специальных аппаратах анаэроаппаратах или в вакуум-эксикаторах, в которые сначала помещают посевы, а затем в аппаратах создают разрежение.

Иногда воздух в анаэроаппаратах заменяют углекислым газом, азотом или другим инертным газом. Доступ кислорода в питательную среду можно затруднить, если культивировать анаэробов в глубине столбика питательного агара или внутри запаянных стеклянных трубок. Анаэробные условия можно создать и более простыми способами: с помощью слоя агара, залитого поверх посевов на плотной питательной среде, или с помощью вазелинового масла, которым покрывают жидкую питательную среду (среда Китта-Тароучи).

Химические методы заключаются в том, что в эксикатор с посевами помещают химические вещества, например пирогаллол и щелочь, реакция между которыми идет с поглощением кислорода.

Биологический метод основан на одновременном культивировании аэробов и анаэробов на плотных питательных средах в герметически закупоренных чашках Петри. При этом кислород поглощается растущими аэробами, посевными на одной половине среды, после чего начинается рост анаэробов, посев которых сделан на другой половине.

3.8. ОБРАЗОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ ПИГМЕНТОВ И АРОМАТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ. СВЕЧЕНИЕ МИКРОБОВ

Пигменты. Некоторые виды бактерий и грибов, обитающих в почве, воде и воздухе, способны вырабатывать красящие вещества, называемые пигментами.

Пигменты подразделяют на растворимые в воде, растворимые в спирте, нерастворимые в воде и спирте. Различают также хромопарные пигменты, которые поступают во внешнюю среду, и хромофорные пигменты, находящиеся в цитоплазме, вакуолях и оболочке.

Образование пигментов происходит при хорошем доступе кислорода, у большинства видов при рассеянном солнечном свете и оптимальной температуре 20-25 °С.

Микроорганизмы выделяют различные пигменты, цвет которых определяют по окраске колоний на плотной питательной среде, а иногда по цвету жидкой питательной среды. Растворимый в воде синий пигмент пиоцианин образует синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*). Пигмент вызывает порок молока, окрашивая его в синий цвет. Зеленый водорастворимый пигмент флюоресцин образуют флюоресцирующие палочки (*Ps. fluorescens*); красный, растворимый в спирте пигмент продигозин продуцирует чудесная палочка (*Serratia marcescens*). Пигменты красного цвета могут выделять также актиномицеты и дрожжи, розовый пигмент - дрожжи и розовый микрококк. Стафилококки образуют пигменты золотистого, белого и желтого цветов. Колонии сарцин окрашиваются в желтый, лимонный или золотистый цвет. Плесневые грибы продуцируют преимущественно нерастворимые в воде и спирте пигменты черного, зеленого, бурого, шоколадно-коричневого цветов. Бурого цвета пигмент образуют некоторые штаммы спорообразующих гнилостных аэробов (грибовидная, капустная палочки).

При отсутствии благоприятных условий пигментобразующие микроорганизмы не продуцируют пигменты и образуют бесцветные (серовато-белые колонии).

Пигментообразование у микробов имеет определенное

физиологическое значение. Пигменты обеспечивают защиту клеток от природной ультрафиолетовой радиации, участвуют в биохимических реакциях, обладают антибиотическим действием.

Ароматические вещества. Некоторые микроорганизмы в процессе жизнедеятельности вырабатывают летучие ароматические вещества, сообщающие молочным продуктам (маслу, сыру) приятные специфические запахи и вкус. Из этих веществ наибольшее значение имеют диацетил, летучие кислоты, этиловый спирт, уксусноэтиловый и уксусноамиловый эфиры и др.

Среди молочнокислых бактерий наиболее интенсивно выражено ароматообразование у гетероферментативных молочнокислых стрептококков *Lactococcus diacetylactis*, *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc dextranicum*.

На интенсивность ароматообразования влияют температура сквашивания молока, реакция и окислительно-восстановительные условия среды. Оптимальными условиями ароматообразования для молочнокислых стрептококков являются: температура 23-25 °С; pH среды около 5,0; окислительно-восстановительный потенциал Eh 6; периодическое перемешивание закваски с целью обогащения ее кислородом.

Ароматические вещества при длительном хранении продукта разрушаются, особенно при высоких плюсовых температурах.

Свечение микроорганизмов. Свечение (люминесценция) представляет собой своеобразную форму освобождения энергии при окислительных процессах. Светящиеся микроорганизмы могут вызывать свечение различных пищевых продуктов (мяса, рыбы, сыра и т. д.). Они проникают в тело мелких ракообразных, обуславливая яркое свечение этих животных ночью у берега моря. У некоторых рыб светящиеся бактерии являются постоянными симбионтами (сожителями), служащими источником света. Светятся некоторые грибы, живущие в старых пнях и корнях деревьев.

Светящиеся бактерии называют фотобактериями. К ним относятся некоторые кокки, вибрионы, палочки, красящиеся по Граму отрицательно, не образующие спор.

Большая часть видов светящихся бактерий являются аэробами, они не вызывают гниения, растут на рыбных и мясных субстратах, культивируются в обычных средах. Оптимальная температура роста и свечения 15-18 °С, содержание хлорида натрия около 3 %. Типичным представителем фотогенных микробов является *Photobacterium phosphoreum* - неподвижная кокковидная палочка, развивающаяся при 28 °С, при температуре выше 30 °С рост прекращается. Протеолитические свойства не выражены, желатин не разжижает.

Подавляется развитие фотогенных микробов при уменьшении

концентрации солей в среде, под действием сульфаниламидных и других химических препаратов, звуковых колебаний, механического растирания, при экстракции различными растворителями, медленном автолизе и др.

3.9. ОСОБЕННОСТИ ФИЗИОЛОГИИ ВИРУСОВ

Как уже было отмечено, вирусы представляют собой отдельное царство доклеточных живых существ внутриклеточных паразитов, жизненные функции которых проявляются только внутри живых клеток других организмов. В связи с этим физиологические свойства вирусов существенно отличаются от других микробов.

Химический состав вирусов представлен двумя основными компонентами – нуклеиновой кислотой и белками, содержащимися в различных соотношениях. В отличие от всех других организмов, в состав которых входят обе нуклеиновые кислоты, вирусы содержат, как правило, только ДНК или РНК.

Нуклеиновые кислоты в вирусных частицах содержатся в неодинаковых количествах: в вирусах человека и животных - от 4 до 9 %, в вирусах растений - от 5 до 17 % и бактериофагах - до 45 %.

По составу азотистых оснований нуклеиновые кислоты вирусов не отличаются от нуклеиновых кислот других организмов, за исключением бактериофагов, у которых вместо цитозина имеется 5-оксиметилцитозин.

ДНК в и р у с о в имеет двунитчатую структуру с молекулярной массой до 1×10^8 . Выявлена особая группа мелких бактериальных вирусов, имеющих однострчатую ДНК.

РНК в и р у с о в имеет преимущественно однострчатую структуру с молекулярной массой 2×10^6 со значительными колебаниями к общей массе вируса.

Белки в и р у с о в составляют 50-90 % массы вириона. Они состоят из тех же аминокислот, что и белки других организмов. Свойства вирусов зависят от количества, состава и последовательности расположения аминокислот. Молекулярная масса белков колеблется в значительных пределах – от 17 000 до 70 000.

Кроме нуклеиновых кислот и белков, в некоторых вирусах содержатся также углеводы и липиды.

Углеводы представлены галактозой, маннозой и гексозамином, а липиды – холестерином, нейтральными эфирами, фосфатидами. Они входят в состав нуклеиновой кислоты и оболочек. Количество и состав углеводов и липидов у различных вирусов колеблется в значительных пределах.

Взаимодействие вируса с поражаемой клеткой отличается характером взаимодействия и конечным результатом.

В зависимости от свойств вируса и поражаемой клетки, а также условий окружающей среды могут проявляться три основных типа

последствий взаимодействия вируса с клеткой: 1) размножение вирусных частиц в клетке приводит к ее гибели и разрушению - такой тип взаимодействия называют *продуктивной инфекцией*, а вирусы, вызывающие этот процесс, - *вирулентными*; 2) пораженные клетки не разрушаются, так как вирусные частицы в них не образуются. Такое взаимодействие называется *абортной инфекцией*, а вирус - *латентным*; 3) геном вируса объединяется (интегрирует) с геномом клетки и при клеточном делении передается в дочерние клетки. Через несколько поколений в клетке может начаться размножение вируса, приводящее клетку к гибели. Такой тип взаимодействия назван *виrogenей* (при внедрении бактериофага - *лизогенией*), при этом вирус называется *авирулентным* (бактериофаг-умеренным).

Процесс взаимодействия вируса с клеткой осуществляется в несколько фаз, протекающих последовательно одна за другой. При продуктивной инфекции выделяют следующие фазы: 1) адсорбция вируса на поверхности клетки; 2) проникновение вируса в клетку; 3) скрытый период (эclipse); 4) репродукция вируса; 5) освобождение вирусных частиц из клетки.

Адсорбция вируса осуществляется на рецепторах клетки, вследствие электростатического взаимодействия поверхностей вируса и клетки.

Рецепторы представляют собой белковые молекулы, располагающиеся на поверхности клетки или в цитоплазме и связывающие специфические вещества. Рецепторы клеток, на которых происходит адсорбция вирусов, могут иметь липопротеидную или мукопротеидную природу. Рецепторы клетки комплементарны рецепторам вируса, поэтому вирус поражает только определенные клетки организма хозяина, т.е. он обладает специфичностью действия.

Проникновение вируса в клетку наступает только в том случае, если он адсорбируется на чувствительной, восприимчивой для него клетке. Это обусловлено биологическими особенностями вируса и клетки. Проникновение вирусов в клетку происходит неодинаково. Наиболее подробно изучен процесс проникновения бактериофагов (см. гл. 10, рис. 26).

После проникновения вируса в клетку наступает **скрытый период**, который называется *эclipseм* (в переводе затемнение, исчезновение). В этой фазе нуклеиновая кислота вируса освобождается от белковых оболочек, проходит через цитоплазму до оболочки ядра, проникает через нее и вступает в сложные генетические взаимоотношения с нуклеиновыми кислотами хромосомы клетки. У разных вирусов скрытая фаза может продолжаться от нескольких минут до нескольких часов.

В eclipse начинается внутриклеточное размножение -

репродукция вируса.

Размножение вирусов отличается от размножения одноклеточных организмов. У вирусов не происходит увеличения размера вириона с последующим его делением на две особи. Важнейшей особенностью размножения вирусов является то, что компоненты вирусных частиц потомства синтезируются в различных участках клеток раздельно и только после этого соединяются в зрелую вирусную частицу.

В связи с этим процесс размножения вирусов обозначается термином «репродукция», следствием которого является увеличение количества вирионов со свойствами родительского вируса.

В начале репродукции под влиянием нуклеиновой кислоты вируса нарушается процесс нормального функционирования генетического аппарата клетки и происходит синтез ферментов, необходимых для репликации (удвоения) нуклеиновой кислоты вируса. В этой стадии вирусы максимально используют компоненты клеток и ее энергетические ресурсы для синтеза собственных компонентов.

Синтез нуклеиновых кислот и белков протекает неодновременно и в разных структурных частях инфицированной клетки, однако эти процессы взаимосвязаны: они совершаются в определенной последовательности и представляют собой единый процесс.

Синтез вирусной ДНК протекает так же, как и синтез нуклеиновых кислот клетки, - по принципу комплементарности, т.е. в процессе репликации на каждой раскрученной нити ДНК достраивается новая комплементарная (недостающая) нить и образуются две молекулы ДНК с последовательностью расположения нуклеотидов, характерной родительской ДНК.

При синтезе РНК РНК-содержащих вирусов матрицей является собственная РНК (репликативная форма). Синтез вирусной РНК осуществляется как в цитоплазме, так и в ядре с помощью фермента РНК-полимеразы.

Субстратом для синтеза вирусных нуклеиновых кислот являются нуклеотиды пораженной клетки.

Субстратом для синтеза вирусных белков используются аминокислоты, тождественные аминокислотам белков клетки.

Матрицей при синтезе белков у ДНК-содержащих вирусов является информационная РНК, которая формируется на вирусной ДНК. Процесс синтеза белков у РНК-содержащих вирусов происходит без участия ДНК. Функцию вирусинформационной РНК выполняет вирусспецифическая РНК.

Считают, что синтез белков у большинства вирусов происходит в цитоплазме.

Вирусная частица формируется из молекул нуклеиновой кислоты и

белковых субъединиц. В состав вируса могут входить липопротеидные мембраны и другие компоненты.

Процесс «сборки» вируса осуществляется в результате полимеризации компонентов вирусной частицы или вследствие формирования более сложных структур, в котором принимает участие и инфицированная клетка.

После завершения формирования вирусных частиц наступает фаза выхода вируса из клетки, которая является результатом полного разрушения пораженной клетки.

В некоторых случаях вирус может длительное время сохраняться в клетке в латентном (скрытом) состоянии. При этом клетка внешне функционирует нормально, воспринимает питательные вещества и продуцирует в окружающую среду продукты своего метаболизма. О наличии вируса в клетке можно судить на том основании, что она становится резистентной (иммунной) к повторному заражению тем же вирусом и процессы метаболизма в ней протекают более медленно. Если такую клетку подвергнуть ультрафиолетовому облучению или вызвать в ней нарушение процессов метаболизма, то она может продуцировать полноценный вирус.

При формировании вирусов иногда образуются дефектные (неполные) вирусы, отличающиеся по своему составу и функциям от стандартного вириона. Такие вирусы содержат несколько меньшее количество, примерно 1/3 нуклеиновой кислоты и такое же количество белков и липидов.

Неполные вирусы образуются при заражении клеток, устойчивых к вирусу, при заражении их массивными дозами вирусов, а также под влиянием физических и химических агентов, обладающих высоким мутагенным действием (ультрафиолетовые и рентгеновы лучи, азотистая кислота и др.).

Дефектные вирусы формируются также при заражении клеток двумя вирусами. В этих случаях генетический материал одного вируса вступает во взаимодействие с нуклеиновой кислотой другого, в результате чего продуцируются гибридные вирионы, обладающие свойствами обоих исходных вирусов.

Процесс формирования полноценного, латентного, а также неполного вируса зависит как от вирусной нуклеиновой кислоты, так и от наличия в клетке многочисленных ферментных систем, различных сложных химических соединений, называемых ингибиторами, которые могут ослаблять биологическую активность вируса и тормозить процесс формирования полноценных вирусных частиц.

ВЛИЯНИЕ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА МИКРООРГАНИЗМЫ

Жизнедеятельность микроорганизмов неразрывно связана с условиями окружающей среды. Влияние внешних факторов на развитие микроорганизмов зависит от их биологических особенностей и особенностей воздействующего фактора, который может иметь как благоприятное, так и губительное действие. Факторы, влияющие на микроорганизмы, делят на три группы: физические, химические, биологические.

4.1. ФИЗИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Различают следующие физические факторы: температуру, высушивание, концентрацию растворенных веществ и осмотическое давление среды, лучистую энергию, ультразвук и др.

Температура. Несмотря на то, что микроорганизмы обладают по сравнению с высшими организмами значительно большей приспособляемостью к температурным условиям, они могут развиваться только при определенных температурах.

Различают три основные, или кардинальные, температурные границы, обуславливающие интенсивность развития микроорганизмов: минимальную, оптимальную и максимальную. Минимальная - самая низкая температура, при которой могут размножаться микроорганизмы; оптимальная - температура наиболее интенсивного развития микроорганизмов; максимальная - самая высокая температура, при которой еще возможно размножение микробов.

По отношению к температуре (приспособленности к жизни при определенных температурах) микроорганизмы условно подразделяют на три физиологические группы: психрофилы (холодолюбивые), мезофилы (развивающиеся при средних температурах) и термофилы (теплолюбивые).

Примерные границы температур для различных групп микроорганизмов представлены в табл. 1.

1. Температуры для различных групп микроорганизмов, °С

Микроорганизмы	Минимальная	Оптимальная	Максимальная
Психрофилы	-8 - 10	10 - 15	15 - 20
Мезофилы	5 - 10	30 - 37	40 - 45
Термофилы	15 - 20	40 - 55	60 - 70

Вышеуказанные температурные границы приведены для размножения микроорганизмов. Для других процессов жизнедеятельности (спорообразования, образования токсинов, пигментов, продуктов обмена и др.) значения температур для тех же групп микробов могут быть другими.

Психрофилами называют микроорганизмы, область температур роста которых лежит в пределах от 0 (или ниже) до 20 °С, тогда как оптимальная температура роста составляет 15 °С. Психрофильные микроорганизмы являются обитателями холодных источников, глубоких озер и океанов. Они хорошо развиваются на продуктах, хранящихся в холодильниках при низких плюсовых температурах. Наиболее сильной устойчивостью к низким температурам обладают плесени. Некоторые из них (*Cladosporium*, *Thamnidium*, *Rhizopus*) могут развиваться при -9 °С и даже -12 °С. Гниlostные бактерии родов *Achromobacter* и *Pseudomonas* способны размножаться при -3 - (-5) °С. Среди психрофильных микроорганизмов различают группу психротрофных микробов.

Психротрофными считаются все микроорганизмы, способные размножаться при температуре 5 °С и ниже независимо от оптимальной температуры для их роста. Из-за практикуемого хранения сырого молока и молочных продуктов в охлажденном виде многие микроорганизмы адаптировались к низким температурам. Поэтому почти во всех важных для молочного производства группах микробов найдены психротрофные штаммы. Среди патогенных бактерий психротрофами являются листерии и персинии.

Способность психрофилов размножаться в условиях низких температур связывают с особенностями ферментов и липидов цитоплазматической мембраны. В липидах психрофилов содержится повышенное содержание ненасыщенных жирных кислот, вследствие чего цитоплазматическая мембрана постоянно находится в жидкокристаллическом состоянии даже при низких температурах.

Мезофилы живут при средних температурах. К ним относятся большинство распространенных в средних широтах бактерий, плесневых грибов и дрожжей. Мезофильными микроорганизмами являются многие молочнокислые бактерии, кишечные палочки, все патогенные и условно-патогенные микроорганизмы и большинство сапрофитных микробов.

Термофилы развиваются при высоких температурах. Они в большом количестве встречаются в почве, в теплых минеральных источниках, сточных водах, навозе. Термофильные микроорганизмы имеются среди молочнокислых и гниlostных бактерий, актиномицетов и др. Термофилы подразделяются на три основные группы:

- строгие, или облигатные, термофилы, у которых оптимум роста лежит в пределах от 65 до 70 °С (не растут при температурах ниже 40-42 °С);

- факультативные термофилы, имеющие максимальную температуру роста между 50 и 65 °С и способные к размножению при комнатной температуре;
- термотолерантные бактерии, имеющие максимальную температуру роста 45-50 °С, растущие при комнатной температуре.

Способность термофильных микроорганизмов размножаться при высоких температурах объясняется тем, что мембранные и клеточные липиды термофилов имеют более высокие температуры плавления, чем липиды мезотермофилов. При этом цитоплазматическая мембрана действует как изолятор, препятствующий переносу тепла из внешней среды и предотвращающий тепловую денатурацию клеточных ферментов.

Термофилия объясняется также способностью облигатных термофилов синтезировать макромолекулы белков с достаточной внутренней молекулярной стабильностью, позволяющей этим микроорганизмам выдерживать усиленный тепловой стресс. Для обеспечения стабильности белков внутри клетки нет необходимости в необычных факторах, поскольку природные клеточные компоненты, такие, как ионы металлов, метаболиты и ионная сила, способствуют повышению термостабильности.

Влияние высоких температур. При температуре, превышающей оптимальную, наблюдается замедление размножения микроорганизмов, а при температуре выше максимальной их развитие полностью прекращается и микробные клетки погибают. Стойкость микроорганизмов к высоким температурам называют **термоустойчивостью** или **терморезистентностью**. Она неодинакова для различных групп микроорганизмов. Наибольшую термоустойчивость обладают споры бацилл и клостридий. Они выдерживают кипячение от нескольких минут (*Bac. subtilis*) до 6 ч (*Cl. botulinum*) и более. Споры не обезвреживаются при режимах пастеризации молока (65-90 °С). Vegetативные формы и бесспорные бактерии являются термолабильными, они погибают при 65 °С в течение 5-30 мин. Среди неспорообразующих бактерий наиболее устойчивым является возбудитель туберкулеза, однако он уничтожается при режимах пастеризации молока.

Дрожжи и плесени нетермоустойчивы. При нагревании во влажной среде вегетативные клетки дрожжей гибнут при 50-60 °С в течение 5 мин, а спорные формы за это же время отмирают при 70-80 °С. Споры плесени уничтожаются при 80 °С в течение 30 мин, а вегетативные формы погибают за это же время при температуре 62 °С.

Термоустойчивость одних и тех же микроорганизмов не является постоянной, она зависит от многих факторов, особенно от возраста

культуры, состава и свойств среды, в которой происходит нагревание. Наибольшей термостойчивостью обладает культура микроорганизмов в конце логарифмической фазы развития. Наличие солей, белков и жиров в среде повышает термостойчивость микроорганизмов. В связи с этим при тепловой обработке они дольше сохраняются в молоке, чем в воде, а в сливках более продолжительное время, чем в молоке. В связи с этим сливки пастеризуют при более высокой температуре, чем молоко.

Снижают термостойчивость кислая реакция среды (снижение pH) и увеличение количества воды в субстрате. Высокая термостойчивость спор бактерий объясняется незначительным содержанием в них свободной воды, поскольку температура денатурации белков, обуславливающих гибель клеток, повышается с понижением содержания в них воды. Отмирание микроорганизмов при высоких температурах обусловлено также инактивацией клеточных ферментов и другими необратимыми изменениями, происходящими в клетках. Губительное действие высоких температур на микроорганизмы используют в молочной промышленности, где применяют две разновидности тепловой обработки продуктов: пастеризацию и стерилизацию (см. гл. 14).

Низкие температуры. При температуре ниже оптимальной процессы жизнедеятельности микроорганизмов постепенно замедляются, а ниже минимальной - приостанавливаются, но жизнеспособность клеток сохраняется. Однако при длительном воздействии температуры ниже 0°C микроорганизмы постепенно отмирают, что объясняется неблагоприятным воздействием на клетки повышенного осмотического давления в результате вымерзания воды в цитоплазме клетки. В связи с тем, что снижение температуры тормозит развитие микроорганизмов, охлаждение используют в качестве способа консервирования молока, молочных и других пищевых продуктов. Различают две формы холодильного хранения молочных продуктов: в охлажденном состоянии при температуре от 2 до 10°C и в замороженном виде при температуре от -15 до -25°C и даже до -45°C .

Высушивание. Питательные вещества поступают в бактериальную клетку в виде водных растворов, и в таком же виде продукты жизнедеятельности выделяются из клетки. Минимальная предельная влажность среды, при которой еще возможно развитие бактерий, 20-30 %, а плесени - около 15 %. В связи с этим высушивание, приводящее к обезвоживанию, замедляет жизненные процессы в бактериальной клетке и процесс размножения приостанавливается. Устойчивость микроорганизмов к высушиванию различна и определяется их физико-химическими свойствами. Дизентерийные бактерии отмирают в течение 7 дней после высушивания, стафилококки и микобактерии туберкулеза погибают лишь к девятому дню. Высушенные культуры молочнокислых бактерий сохраняют жизнеспособность в течение

нескольких месяцев. Наиболее устойчивыми к высушиванию являются споры бактерий, которые сохраняют способность к прорастанию при хранении в высушенном состоянии в течение десятков лет.

При необходимости для сохранения микробных культур широко применяют метод лиофилизации (сублимации), т. е. процесс высушивания из замороженного состояния под вакуумом. Этим методом высушивают бактериальные концентраты, закваски, вакцины, антибиотики и другие биопрепараты. Сушка широко используется в качестве метода консервирования молока, молочных и других пищевых продуктов.

Концентрация растворенных веществ и осмотическое давление среды. Внутриклеточное осмотическое давление обусловлено концентрацией растворенных веществ в цитоплазме клетки. Оно у разных микроорганизмов колеблется в широких пределах. Этим объясняется тот факт, что различные микроорганизмы могут обитать в пресной воде и в соленых водах морей, отличающихся различным осмотическим давлением. Высокие концентрации осмотически активных веществ способствуют плазмолизу микробных клеток, в результате чего клетка отдает воду, сморщивается и лизируется, т. е. растворяется. Явление плазмолиза используют как один из методов консервирования пищевых продуктов.

В качестве осмотически деятельных веществ, применяемых для консервирования молочных и других пищевых продуктов, используют поваренную соль и сахар. При концентрации соли в субстрате 20-30 % размножение микроорганизмов почти полностью прекращается. Особенно чувствительны к соли молочнокислые и гнилостные бактерии, развитие которых прекращается при концентрации соли 10 %.

Известны микроорганизмы, которые развиваются в субстратах с высоким осмотическим давлением. Осмофильные микроорганизмы, развивающиеся при высоких концентрациях поваренной соли, называют галофилами (сололюбивыми). Различают экстремально галофильные бактерии и умеренные галофилы. Экстремально галофильные бактерии способны к росту в насыщенном растворе, содержащем концентрацию NaCl около 32 % (нижний предел - 12-15 %). К экстремально галофильным микроорганизмам относят бактерии родов *Halobacterium* и *Halococcus*. Среди умеренных галофилов встречаются дрожжи, плесени, стафилококки, микрококки, они растут при 3-10%-ном содержании NaCl.

Между экстремально галофильными бактериями и всеми остальными микроорганизмами существуют значительные генетические различия, поэтому попытки превращения экстремальных галофилов в умеренные и наоборот оказываются неудачными.

Клетки галофилов имеют высокую внутриклеточную концентрацию растворенных веществ, поэтому большая часть

ферментов этих организмов активизируется высокими концентрациями солей.

Рибосомы галофилов содержат большое число кислых белков, и для поддержания их стабильности требуются высокие солевые концентрации. В связи с этим экстремальные галофилы нечувствительны к антибиотикам, действующим на рибосомы клеток.

Белки экстремальных галофилов (рибосомные, РНК-полимеразы, цитоплазматические белки и белки клеточной стенки) содержат значительно меньшие количества неполярных аминокислот, чем аналогичные белки мезофильных бактерий.

Снижение количества неполярных аминокислот способствует ослаблению гидрофобных (водоотталкивающих) взаимодействий, которые возможны лишь в присутствии очень высоких концентраций солей, т.е. высокие солевые потребности белков обусловлены наличием в их молекулах очень слабых гидрофобных взаимодействий.

Микроорганизмы, которые могут существовать при невысоком осмотическом давлении и в средах с повышенным содержанием соли или сахара, называют осмотолерантными (от лат. *tolerantia* — терпеливость). Среди них чаще встречаются плесени и другие микроорганизмы, которые более приспособлены к изменению концентрации растворенных веществ в среде. Консервирующее действие концентрированных растворов соли используется для посола сыров, масла, мясных, рыбных и других продуктов.

Надежное консервирующее действие сахара проявляется при содержании его в субстрате в концентрации не менее 60-70 %. Сахар используется при изготовлении таких продуктов, как варенье, джем, повидло, стуженное молоко с сахаром, и др. При этом наибольшая часть микроорганизмов сохраняет свою жизнеспособность, но не развивается.

Лучистая энергия. Излучения в окружающей среде подразделяются на неионизирующие и ионизирующие. Оба вида опасны для микроорганизмов. К неионизирующим источникам относится солнечный свет. Ионизирующие излучения существуют в виде природных источников (космические лучи) и искусственной радиации.

Солнечный свет обладает наибольшим потенциалом вредного воздействия на микроорганизмы. Способностью использовать энергию видимого света обладают лишь пигментобразующие формы бактерий. Микроорганизмы, не имеющие пигмента, погибают под действием прямых солнечных лучей, а рассеянный свет постепенно подавляет их развитие.

Под влиянием солнечных лучей происходят внутриклеточные химические реакции с образованием гидроксильных радикалов и других высокоактивных веществ, действующих губительно на микробную клетку.

Наиболее выраженное летальное действие оказывают на микроорганизмы световые волны, лежащие в ультрафиолетовой области спектра (длина волны менее 400 нм).

Ультрафиолетовые лучи (УФ-лучи) обладают либо бактерицидным, либо мутагенным действием, что обусловлено изменениями в структуре ДНК, повреждением рибонуклеиновых кислот. Из всех микроорганизмов наиболее чувствительны к УФ-лучам являются вегетативные формы бактерий. Споры бацилл в 4-5 раз более устойчивы, чем вегетативные клетки. Очень чувствительны к УФ-лучам патогенные микроорганизмы.

В молочной промышленности применяют ртутно-кварцевые бактерицидные ультрафиолетовые лампы для дезинфекции воздуха микробиологических боксов, холодильных камер и производственных помещений. Их также используют для дезинфекции поверхности оборудования, аппаратуры, тары молочных продуктов, а также молока, которое при этом обогащается витамином D. УФ-лучи обладают слабой проникающей способностью, поэтому их действие проявляется только на поверхности облучаемых объектов.

Космические и рентгеновские лучи представлены ионизирующими излучениями с длиной волны от 0,006 до 10 нм. Они оказывают летальное или мутагенное действие на микроорганизмы. К действию таких лучей наиболее чувствительны ядерные структуры, в частности нуклеиновые кислоты, хотя повреждаются и цитоплазматические структуры клеток. К действию ионизирующих излучений наиболее чувствительны микроорганизмы в присутствии кислорода. Разрушающее действие ионизирующих излучений усиливают также повышенная температура и кислая реакция среды.

Искусственное ионизирующее излучение (α -частицы, β -частицы, γ -лучи) возникает в результате испытаний ядерного оружия, работы атомных электростанций, применения радиоактивных изотопов в научных целях.

Эффект бактерицидного действия радиоактивных излучений обусловливается ионизацией внутриклеточных веществ.

При прохождении ионизирующих излучений через клетку некоторые атомы в результате поглощения энергии испускают электроны и превращаются в положительно заряженные ионы. Свободный электрон присоединяется к нейтральному атому, который превращается в отрицательно заряженный ион. Такое изменение электронной структуры атомов приводит к изменению химических связей и разрушению структур молекул.

Микроорганизмы значительно более устойчивы к излучениям, чем высшие животные и растительные организмы. Дрожжи и плесени более устойчивы, чем бактерии. Споры бацилл и клостридий выносливее их

вегетативных форм. Искусственные ионизирующие излучения используют для стерилизации лечебных препаратов и пищевых продуктов. Однако следует иметь в виду, что при этом могут ухудшаться вкус и пищевые качества продуктов.

Ультразвук – высокочастотные (20 кГц и более) механические колебания упругой среды, не воспринимаемые ухом человека. Одно колебание в секунду составляет единицу измерения – герц (Гц). Килогерц (кГц) составляет 10^3 Гц/с, мегагерц (МГц) – 10^6 Гц/с.

Ультразвуковые волны с частотой колебания более 20 000 Гц обладают бактерицидными свойствами, так как имеют большую механическую энергию и могут вызывать в озвучиваемой среде ряд механических и электрохимических явлений.

Механизм бактерицидного действия ультразвука объясняется двумя теориями: кавитационной механической и кавитационной электрохимической.

Сущность первой заключается в том, что ультразвуковые волны, распространяясь в упругой среде, вызывают в ней сжатия и разрежения. В момент прохождения ультразвука через жидкость образуются субмикроскопические и микроскопические полости, которые, увеличиваясь в размерах, «втягивают» в себя молекулы газа и паробразную жидкость. В полостях создается огромное давление, достигающее десятков и сотен мегапаскалей, что обуславливает механическое разрушение (дезинтеграцию) цитоплазматических структур и гибель клетки.

Образование и разрыв полостей и изменения, происходящие при этом в среде, называют **кавитацией**.

Кавитационная электрохимическая теория объясняет ионизацию паров жидкости и присутствующих в ней газов при образовании кавитационного пузырька. При разрыве пузырька происходит электрический разряд, сопровождающийся резким повышением температуры и образованием в кавитационной полости электрического поля высокого напряжения. При этом пары жидкости и высокомолекулярные соединения в кавитационной полости расщепляются на водород и гидроксильную группу с образованием активного кислорода, пероксида водорода, азотистой и азотной кислот, в результате чего происходят инактивация ферментов и коагуляция белков, что обуславливает гибель микробной клетки.

Бактерицидное действие ультразвука зависит от интенсивности звука и кавитации, состава дисперсной среды, а также концентрации микробных клеток. При высокой интенсивности звука распад микробных клеток происходит чрезвычайно быстро. Наличие в составе среды липидов, углеводов и особенно белков, а также увеличение концентрации микробных клеток

снижают бактерицидный эффект ультразвука.

Устойчивость микроорганизмов к действию ультразвука зависит от их биологических свойств. Вегетативные клетки бактерий более чувствительны, чем споры, кокковые формы погибают медленнее, чем палочковидные, более крупные клетки микроорганизмов отмирают быстрее, чем мелкие.

Ультразвук применяют для стерилизации пищевых продуктов, дезинфекции предметов, изготовления вакцин, а также при извлечении внутриклеточных ферментов, токсинов, витаминов, нуклеиновых кислот и других компонентов клетки.

4.2. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

К химическим факторам, влияющим на жизнедеятельность микроорганизмов, относят химический состав питательной среды, реакцию среды, окислительно-восстановительный потенциал среды и действие ядовитых (антисептических) веществ.

Состав питательной среды является основным показателем развития микроорганизмов. Он определяет ее питательную ценность, реакцию (рН) и окислительно-восстановительный потенциал (Eh).

Реакция питательной среды, или концентрация водородных ионов (рН), играет роль фактора, определяющего границы существования живой материи. рН среды воздействует на ионное состояние, а следовательно, и на доступность для организма многих метаболитов и неорганических ионов.

Ионы водорода влияют на электрический заряд коллоидов клеточной стенки. При сдвиге рН в кислую или щелочную сторону изменяется знак заряда поверхности клетки, что приводит к изменению проницаемости клеточной стенки для различных молекул и ионов питательного субстрата и нарушению нормального процесса обмена веществ.

Изменение рН также влияет на степень дисперсности коллоидов цитоплазмы, активность ферментов, интенсивность и направление биохимических реакций. Так, например, дрожжи, развиваясь в кислой среде, образуют в основном этиловый спирт, а в щелочной среде – глицерин.

Большинство организмов живет при рН от 4 до 9, причем их оптимальный рост наблюдается в среде, близкой к нейтральной. Однако, многие микроорганизмы обладают способностью развиваться или выживать при значениях рН, лежащих за пределами этого интервала (от рН 1 до 11).

Ион водорода (H^+) представляет собой протон, лишенный электронов. В водных растворах он быстро гидратируется и образует ион гидроксония H^+O^+ . В кислой среде преобладают ионы гидроксония, а в

щелочной - гидроксильные ионы (ОН⁻).

Концентрация гидроксоневой или гидроксильной форм воды играет важную роль в регулировании водно-солевого обмена, ионного состояния питательных веществ, равновесия электрических зарядов на поверхности клетки и коллоидных свойств микроокружения.

При низких значениях pH ионы водорода адсорбируются на частицах вещества и замещают другие катионы. В связи с этим в кислых субстратах возрастает количество ионов Al³⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Mo⁶⁺ и может достигать таких уровней, которые токсичны для большинства микроорганизмов.

При высоких значениях pH, т.е. в щелочных субстратах, необходимы для микроорганизмов элементы, такие, как Fe²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ и Mn²⁺, осаждаются в виде карбонатов, гидроксидов или фосфатов.

Эти резкие изменения влияют на стабильность и проницаемость клеток, а также на их способность взаимодействовать с необходимыми для них метаболитами.

Микроорганизмы, существующие при экстремальных значениях pH, должны противостоят всем этим неблагоприятным воздействиям.

Изменения pH окружающей среды могут вызвать у многих микроорганизмов компенсаторные ферментативные сдвиги. Например, *Escherichia coli* реагирует на повышение кислотности среды синтезом декарабоксила аминокислот, под действием которых образуются амины, снижающие кислотность среды. Повышение щелочности стимулирует образование дезаминаз аминокислот, что приводит к снижению pH.

Следовательно, устойчивость клеток к высокой кислотности объясняется их структурными и метаболическими особенностями, поддерживающими внутриклеточную pH на уровне, близком к нормальным физиологическим величинам.

В зависимости от отношения клеток микробов к кислотности среды их подразделяют на *нейтрофилы*, *ацидофилы* (кислотолюбивые) и *алкалофилы* (щелочелюбивые). Микроорганизмы, обладающие способностью выживать при значениях pH, лежащих за пределами 4-9, рассматриваются как кислото- и щелочотолерантные.

Оптимальная pH для нейтрофильных микроорганизмов находится в пределах 7,0 (нейтральная зона). Типичными представителями нейтрофилов являются бактерии группы кишечных палочек, стрептококки, бациллы, сальмонеллы и большинство других патогенных бактерий.

Кислотолюбивые микробы, растущие при чрезвычайно низком значении pH (3 или менее), встречаются довольно редко. Еще меньше примеров щелочелюбивых организмов, требующих для своего роста pH 10 и выше.

К ацидофильным микроорганизмам относятся уксуснокислые,

молочнокислые и другие бактерии, дрожжи, плесени. Представители уксуснокислых бактерий растут в пределах pH от 3 до 5, молочнокислые бактерии развиваются при pH от 3 до 8. Оптимальный pH роста дрожжей находится в области 5,5-6. Однако они способны развиваться в более кислой среде - вплоть до pH 2 (*Saccharomyces cerevisiae*, *S. elipsoides*, дрожжи рода *Rhodotorula*).

К самым устойчивым к кислоте организмам относятся плесневые грибы. Многие из них характеризуются ацидотолерантностью и способностью к росту в широких пределах pH. Разные виды родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* могут расти при значениях pH, близких к 2, тогда как их верхние границы роста близки к pH 10.

Среди бактерий, устойчивых к щелочной среде, выделяются некоторые виды клубеньковых бактерий рода *Rhizobium*, активно развивающихся при pH 10-12. Среди бацилл, чрезвычайно устойчивых к щелочной среде, отмечают штаммы *Bac. cereus*, *Bac. circulans*, способные к росту при pH 10-11. Энтéroкокки также толерантны к щелочной реакции среды. Получены штаммы *Enterococcus faecalis*, растущие в средах с pH 9-11.

Многие микроорганизмы, развиваясь в питательной среде, выделяя продукты обмена, сильно изменяют реакцию субстрата. Это является одним из факторов, обуславливающих антагонизм между различными группами микробов. Так, молочнокислые бактерии в процессе жизнедеятельности образуют молочную кислоту, которая подавляет развитие большинства гнилостных бактерий, что используется при хранении кисломолочных продуктов, сыров, при консервировании силоса, квашении капусты и других продуктов.

Окислительно-восстановительный потенциал. Транспорт водорода и электронов при биологическом окислении являются процессами эквивалентными. При этом дыхательная цепь может рассматриваться как цепь переноса электронов. Компоненты дыхательной цепи переходят попеременно из окислительного состояния в восстановленное и обратно, т.е. они обладают определенным окислительно-восстановительным потенциалом.

Окислительно-восстановительный потенциал служит количественной мерой способности тех или иных соединений или элементов отдавать электроны. Этот потенциал отсчитывается относительно потенциала молекулярного водорода.

Окислительно-восстановительные условия питательной среды выражаются величиной окислительно-восстановительного потенциала, который принято обозначать Eh (rH₂).

Окислительно-восстановительный потенциал среды представляет собой взятый с обратным знаком логарифм числа, выражающего

давление (в МПа) молекулярного водорода. При давлении H_2 0,1 МПа окислительно-восстановительный потенциал среды равен нулю. Величина Eh минимальна при насыщении среды водородом и максимальна при насыщении ее кислородом. Она колеблется соответственно от 0 до 42 единиц.

Присутствие в среде окисляющих веществ (метиленового синего, резазурина, кислот, перманганата калия и др.) повышает значение потенциала, наличие же соединений, обладающих восстановительными свойствами (цистеин, тиоловая кислота), снижает потенциал. Окислительно-восстановительный потенциал также резко уменьшается при отмирании культуры бактерий, лизисе ее бактериофагом, действии на нее лизоцимом. Изменяя окислительно-восстановительный потенциал среды, можно повлиять на интенсивность размножения различных групп микроорганизмов и направленность вызываемых ими биохимических процессов.

Так, облигатные анаэробы развиваются при низком значении Eh (от 0 до 14), факультативные анаэробы – при Eh от 0 до 30, аэробные микроорганизмы – Eh от 11 до 35.

Ароматобразующие молочнокислые бактерии при Eh, близком к 0, образуют молочную кислоту, а при Eh, равном 6-8, наряду с молочной кислотой образуют и ароматические вещества.

Так как окислительно-восстановительные процессы связаны с переносом электронов, то окислительно-восстановительный потенциал можно выразить в вольтах. Для его измерения составляют гальваническую цепь и величину потенциала определяют при помощи потенциометра.

Влияние антисептических веществ на микробную клетку может проявляться в виде бактериостатического или бактерицидного действия. При бактериостатическом воздействии химические вещества обуславливают прекращение размножения бактерий.

Бактерицидным действием называют способность различных химических или других факторов вызывать гибель бактерий. Временное прекращение или замедление размножения бактерий называется **бактериостазом**. Одни и те же химические препараты могут оказывать как бактериостатическое, так и бактерицидное действие, что зависит от концентрации вещества, экспозиции его воздействия, условий применения и т. п.

Из неорганических соединений сильными ядами для микробов являются соли тяжелых металлов (свинца, меди, цинка, серебра, золота, ртути), различные оксиды (хлор, хлорная известь, хлорамин, йод, бром, перманганат калия, пероксид водорода, озон, диоксид углерода, аммиак и др.), минеральные кислоты (борная, серная, хлористоводородная, азотная и др.), щелочи (гидроксид натрия,

гидроксид калия и др.).

Среди органических соединений губительное воздействие на микроорганизмы оказывают органические кислоты – молочная, салициловая, масляная, уксусная, бензойная и др., диэтиловый эфир, спирты жирного и ароматического ряда – этиловый, бутиловый, амилловый, пропиловый и др., эфирные масла, смолы, дубильные вещества, органические красители, а также формалин, фенол, крезол и их производные.

В очень малых дозах почти все химические яды (кроме солей тяжелых металлов) сначала обладают бактериостатическим действием, а затем вызывают гибель микробных клеток (бактерицидное действие).

Ионы серебра и золота обладают олигодинамическим действием (от греч. *oligos* – малый и *dynamic* – действие, сила). В ничтожно малых концентрациях, не поддающихся химическому обнаружению, они губительно действуют на микробные клетки. На олигодинамическом действии ионов серебра основан метод дезинфекции воды с помощью фильтров из посеребренного песка. Посуда из серебра при контакте с водой сообщает ей бактерицидные свойства, этим объясняется длительное хранение «святой» воды.

Химические вещества, бактерицидно действующие на микроорганизмы в небольших концентрациях, называют антисептическими или дезинфицирующими.

Механизм бактерицидного действия антисептических веществ заключается в том, что в результате взаимодействия химического яда с веществами цитоплазмы в ней происходят необратимые изменения, нарушающие нормальное течение процессов жизнедеятельности и приводящие к гибели клеток.

Соли тяжелых металлов вызывают коагуляцию белков клетки. Олигодинамическое действие серебра и других тяжелых металлов заключается в том, что положительно заряженные ионы металлов адсорбируются на отрицательно заряженной поверхности бактерий и изменяют проницаемость их цитоплазматической мембраны. При этом нарушаются процессы питания и размножения микроорганизмов.

Оксидители действуют на сульфгидрильные группы активных белков, влияют на другие группы (феноловые, тиоэтиловые, индолные и аминные).

Неорганические кислоты и щелочи гидролизуют белки клетки. Диоксид углерода, сероводород, цианистые соединения инактивируют ферменты клетки.

Органические спирты, диэтиловый эфир, ацетон разрушают полипептидную оболочку клетки. Формалин (40%-ный раствор формальдегида) присоединяется к аминокетам белков и вызывает их денатурацию.

Споры обладают большей устойчивостью к действию многих химических ядовитых веществ, чем вегетативные формы бактерий. Из неспорообразующих микробов ко многим химическим ядам менее чувствительны стафилококки и возбудитель туберкулеза.

Антисептические вещества в молочной промышленности используют в качестве дезинфицирующих и моющих средств. Чаще применяют хлорную известь, хлорамин, гипохлорит натрия, карбонат натрия, сульфанол, тринатрийфосфат и др.

4.3. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Под биологическими факторами понимают влияние на жизнедеятельность микроорганизмов других видов и групп микробов, а также животных и растений, состоящих в природных условиях специфической биоценоз, т. е. совокупность живых организмов, населяющих участок определенной среды обитания.

Микробы находятся в природе в ассоциациях, между которыми происходит постоянная борьба за существование. В связи с этим различают несколько типов взаимоотношений (симбиоза) между организмами: мутуализм, синергизм, комменсализм, паразитизм, метабиоз и антагонизм (антибиоз).

М у т у а л и з м представляет собой сожительство организмов разных видов, приносящее взаимную пользу: они совместно развиваются лучше, чем каждый из них в отдельности. Например, молочнокислые бактерии в кефирных грибах продуцируют молочную кислоту и создают среду, благоприятную для роста дрожжей, а дрожжи, выделяя витамины группы В, стимулируют развитие молочнокислых бактерий.

С и н е р г и з м характеризуется усилением физиологических функций у членов микробной ассоциации. При совместном развитии молочнокислых стрептококков - активных кислотообразователей *Lac. lactis*, *Lac. cremoris* и ароматобразующих лактококков быстро увеличивается кислотность молока, интенсифицируются жизнедеятельность ароматобразующих лактококков и образование ими ароматических веществ.

К о м м е н с а л и з м - тип взаимоотношений между двумя организмами, при котором один живет за счет другого, не принося ему заметной пользы и не причиняя вреда. Такие взаимоотношения наблюдаются между молочнокислыми бактериями, а также кишечными палочками и организмом человека или животного. При развитии в толстом отделе кишечника бактерии получают от макроорганизма необходимые питательные вещества, не причиняя ему вреда и даже принося известную пользу тем, что подавляют развитие гнилостных и некоторых патогенных бактерий.

П а р а з и т и з м представляет собой тип взаимоотношений между

организмами, когда один из них (паразит) живет за счет другого (хозяина), причиняя ему вред. Паразитами являются все патогенные микроорганизмы по отношению к восприимчивым видам животных и растений. Абсолютными паразитами являются риккетсии и вирусы, в том числе и бактериофаги, развивающиеся внутри клеток бактерий и вызывающие их гибель и разрушение.

М е т а б и о з - такой вид взаимоотношений, когда один организм продолжает процесс, вызванный другим, т. е. в результате жизнедеятельности одних микробов создаются условия для развития других. Так, дрожжи, сбраживая сахар в этиловый спирт, создают условия для развития уксуснокислых бактерий, а образуемая последними уксусная кислота используется плесенью, которая ее окисляет до CO_2 и H_2O .

А н т а г о н и з м (антибиоз) - тип взаимоотношений между микроорганизмами, при котором одни организмы подавляют развитие других. Антагонистическое действие может обуславливаться различными факторами: истощением питательного субстрата вследствие более быстрого развития одного из видов микроорганизмов; изменением физико-химических свойств среды вследствие накопления продуктов жизнедеятельности микробов-антагонистов (например, молочная кислота, подавляющая развитие гнилостных бактерий); выделением в среду микробами-антагонистами антибиотиков.

Антибиотики (от греч. *anti* - против, *bios* - жизнь) - вещества биологического (микробного, животного и растительного) происхождения, подавляющие развитие и биохимическую активность чувствительных к ним микробов. По происхождению антибиотики подразделяются на следующие группы: антибиотические вещества, продуцируемые актиномицетами, плесневыми грибами, бактериями, организмом животного или человека; антибиотики растительного, синтетического и полусинтетического происхождения.

Антибиотики актиномицетного происхождения - стрептомицин, тетрациклины, неомицин, нистатин - обладают широким антибактериальным спектром действия. Они активны в отношении грамположительных бактерий, возбудителей туберкулеза, брюшного тифа, туляремии, бруцеллеза, сальмонеллезов и др.

Наиболее активными продуцентами антибиотиков являются плесневые грибы. Плесень рода *Penicillium* продуцирует широко используемый пенициллин. Он обладает бактерицидным действием главным образом на грамположительные стафилококки и стрептококки. Плесени рода *Aspergillus* выделяют антибиотики - фумигацин и аспергиллин, а *Mucor* продуцирует клавидин.

К антибиотикам, продуцируемым бактериями, относят грамицидин-С (*Bac. brevis*), пиоцианин (*Ps. aeruginosa*), субтилин (*Bac. subtilis*),

полимиксин (Вас. polymixa). Молочнокислые бактерии *Lbm. plantarum* выделяют антибиотик лактолин, *Lac. lactis* - низин, *Lac. cremoris* - диплококцин и др. Эффективность бактериальных антибиотиков ниже, чем антибиотиков грибного и актиномицетного происхождения, однако они способны подавлять развитие возбудителя туберкулеза, маслянокислых бактерий, кишечных палочек, стафилококков, а также жизнедеятельность других видов и штаммов молочнокислых бактерий.

К антибиотическим веществам животного происхождения относят лизоцим, эритроин и экмолин. Лизоцим содержится в яичном белке, в слезах, слюне, молозиве, молоке. Он убивает и растворяет (лизует) многие виды бактерий. Эритроин получен из красных кровяных шариков (эритроцитов) крови животных, проявляет бактериостатическую активность. Экмолин получен из тканей рыб. Он активен в отношении стафилококков и стрептококков.

Антимикробные вещества высших растений называют **фитонцидами**. Наиболее сильной бактерицидностью обладают фитонциды лука, чеснока, хрена, горчицы, алоэ, крапивы, можжевельника, почек березы, листьев черемухи и др. Антимикробное действие фитонцидов обусловлено продуктами жизнедеятельности растительных организмов: эфирных масел, глюкозидов, органических кислот, дубильных веществ, смол и др.

Полусинтетические антибиотики получают химическим путем. Они имеют широкий спектр действия, активны в отношении не только грамположительных, но и грамотрицательных микроорганизмов (исключение составляет синегнойная палочка *Pseudomonas aeruginosa*).

Синтезированы полусинтетические пенициллины (оксациллин, ампициллин, карбенициллин), цефалоспорины (цефалоридин), тетрациклины (метациклин, гидрохлорид) и др.

К синтетическим антибиотикам относится левомицитин — синтетическое вещество, идентичное антибиотику хлорамфениколу, являющемуся продуктом жизнедеятельности лучистого гриба *Streptomyces venezuelae*.

Химическая природа антибиотиков разнообразна. Они отличаются химической структурой и биологическими свойствами. Антибиотики, выделенные из актиномицетов и грибов, относятся к сложным циклическим соединениям, антибиотические вещества из бактерий являются полипептидами.

МИР МИКРООРГАНИЗМОВ В ПРИРОДЕ

Объекты окружающей среды, такие, как почва, вода, воздух, корма, растения, а также организмы животных и человека, являются основными источниками обсеменения продуктов различными микроорганизмами.

5.1. МИКРОФЛОРА ПОЧВЫ

Почва является главным резервуаром и естественной средой обитания многих микроорганизмов в природе. Микрофлора почвы принимает активное участие в процессах формирования и самоочищения почвы, а также в круговороте веществ в природе (азота, углерода, серы, железа и других соединений). Разнообразные микроорганизмы почвы обитают в водных и коллоидных пленках, которые как бы обволакивают почвенные частицы.

В почве всегда имеются необходимые питательные вещества, влага, кислород, она хорошо защищает микробы от губительного воздействия прямых солнечных лучей и от высыхания.

Бактериальный состав почвы, как правило, возрастает с увеличением содержания в ней органических веществ. Количество микроорганизмов в почве измеряется обычно сотнями и тысячами миллионов особей и может достигать 1-5 млрд в 1 г. Максимальное количество бактерий содержится в почве на глубине 10-20 см. Начиная с глубины 1-2 м количество микроорганизмов резко уменьшается.

Качественный состав микрофлоры почвы очень разнообразен и состоит из множества видов бактерий, актиномицетов, спирохет, простейших, синезеленых водорослей, микоплазм, грибов, вирусов. Состав и соотношения между различными группами микроорганизмов изменяются в зависимости от вида почвы, способа ее обработки, содержания органических веществ, влаги, климатических условий и других причин.

Микроорганизмы почвы находятся в сложном биоценозе, характеризующемся антагонистическими и симбиотическими взаимоотношениями как между собой, так и с растениями. Из бактерий постоянно обнаруживаются в почве гнилостные спорообразующие и неспорообразующие, азотфиксирующие, нитрифицирующие, серо- и железобактерии. Из сапрофитных кокков чаще выявляются микрококки. В почве непрерывно совершаются процессы, обусловленные жизнедеятельностью этих микроорганизмов: гниение, нитрификация, денитрификация, разложение клетчатки и т. д. Происходящие в почве процессы распада и минерализации органических веществ имеют большое санитарное значение.

Болезнетворные микроорганизмы попадают в почву с трупами животных, испражнениями, сточными водами. Некоторые из них выживают определенные сроки, другие могут размножаться. К типичным патогенным почвенным микроорганизмам относят возбудителей столбняка, ботулизма, газовой гангрены. Возбудитель сибирской язвы может выживать в почве десятилетиями. Долго могут жить в почве плесени, неспорообразующие бактерии: палочка туберкулеза - до 5 мес и более, бруцеллы - до 3 мес.

Показателем санитарного состояния почв является содержание в них термофилов, так как в незагрязненных почвах они практически отсутствуют. Термофилы - это в основном спорообразующие грамположительные палочки и актиномицеты.

Установлена прямая связь между загрязненностью почвы фекалиями и содержанием в ней бактерий группы кишечных палочек. В почве, загрязненной фекалиями, в течение первых двух недель преобладает *E. coli* (61,6 %). Через 21 день происходит значительное уменьшение числа *E. coli* и возрастание числа цитратположительных сапрофитных кишечных палочек родов энтеробактер и шитробактер.

Термофилов, кишечных палочек и некоторых других микроорганизмов принимают за санитарно-показательных микробов при исследовании почвы, т. е. по присутствию их в почве судят о ее санитарном состоянии.

Установлено, что даже сильно загрязненные почвы самоочищаются от бактерий группы кишечных палочек и некоторых патогенных микроорганизмов по истечении нескольких месяцев. На процессы самоочищения влияют следующие факторы: механический состав и pH почвы, состав постоянной почвенной микрофлоры, растительный покров почвы, температура окружающей среды, интенсивность солнечной радиации и др.

Процессы самоочищения почвы положены в основу наиболее распространенных и эффективных методов обезвреживания жидких и твердых отходов, обеспечивающих полную их минерализацию и гибель патогенной микрофлоры. При этом органическое вещество отходов, обезвреживаясь, превращается в ценное удобрение. Твердые отходы запахивают, а чаще обезвреживают в так называемых компостах вдали от колодцев и водоемов.

Решающая роль в разогревании компостов принадлежит термофилам. Почвенный метод обезвреживания применяют и для очистки сточных вод на специальных полях орошения. Процесс обезвреживания сточных вод состоит в том, что вода, попадая в почву, соприкасается с почвенной микрофлорой, которая минерализует органические вещества сточных вод.

5.2. МИКРОФЛОРА ВОДЫ

Вода наряду с почвой является естественной средой обитания для многих микроорганизмов.

В основном они попадают в воду из почвы, некоторые — из воздуха с оседающей пылью. Значительное количество микроорганизмов попадает с хозяйственно-бытовыми сточными водами, которые содержат миллионы и даже миллиарды бактерий в 1 см³. Со сточными водами поступает в водоемы большое количество и органических веществ, стимулирующих размножение, особенно сапрофитных микроорганизмов (флуоресцирующих палочек — род *Pseudomonas*, бактерий рода *Aeromonas*, микрококков, саршин и др.). В чистых водоемах до 80 % всей аэробной сапрофитной микрофлоры приходится на кокковые формы, остальные 20 % составляют палочковидные. Кроме сапрофитных в воде могут находиться и переживать определенные сроки различные патогенные микроорганизмы.

Источником патогенной микрофлоры в воде являются больные люди и животные, с выделениями которых в воду попадают патогенные микроорганизмы. Через воду часто передаются так называемые водные инфекции, или болезни грязной воды, — это холера, брюшной тиф, дизентерия, лептоспироз, который раньше называли «водной лихорадкой», полиомиелит, эпидемический гепатит, Ку-лихорадка и другие инфекции.

Обнаружить патогенные микроорганизмы в воде крайне сложно ввиду их малой концентрации и плохого роста на искусственных питательных средах. Выявлению патогенных микроорганизмов мешают также сапрофиты, присутствующие в воде в больших количествах.

В качестве объективных показателей загрязнения воды патогенными микроорганизмами используют так называемые санитарно-показательные микроорганизмы, постоянно обитающие в организме человека и животных. По их присутствию в воде косвенно судят о возможном инфицировании воды патогенными микроорганизмами.

В качестве санитарно-показательных микроорганизмов при исследовании воды предложены представители нормальной микрофлоры тела человека или животных: бактерии группы кишечных палочек рода *Escherichia*, энтерококки и др.

В естественных условиях в сильно загрязненных водоемах количество микроорганизмов в воде резко снижается, т. е. происходит самоочищение воды.

Самоочищению воды способствуют следующие факторы: оседание микроорганизмов и органических веществ; течение, способствующее уменьшению концентрации органических веществ в воде, что отрицательно влияет на размножение микроорганизмов; бактерицидное действие ультрафиолетовых лучей на микрофлору воды, проникающих

на глубину до 3 м; развитие бактериофага; бактерицидное действие бактерий-антагонистов, а также растений, выделяющих во внешнюю среду антибиотические вещества, задерживающие развитие сапрофитных микроорганизмов.

Степень загрязнения водоема характеризуют сапробностью водоема. Условно различают следующие зоны сапробности:

полисапробная зона - вода сильно загрязнена, богата органическими веществами, бедна кислородом. Количество микроорганизмов в 1 см^3 достигает десятков миллионов. В воде активно идут процессы гниения и брожения;

мезосапробная зона характеризуется интенсивной минерализацией органических веществ. Преобладают процессы окисления и нитрификации. Количество микроорганизмов достигает нескольких сот тысяч в 1 см^3 воды;

олигосапробная зона - зона относительно чистой воды, содержит мало органических веществ. Количество бактерий составляет десятки тысяч в 1 см^3 воды. Минерализация органических веществ закончена.

Сточные воды предприятий молочной промышленности образуются из воды, используемой для мойки технологического оборудования, трубопроводов, тары (цистерн, флагов, бутылок и т. д.), мытья полов, панелей производственных помещений, из воды, используемой для охлаждения молока и молочных продуктов, для работы технологических установок, а также для хозяйственно-бытовых нужд.

Количество сточных вод предприятия составляет 80-85 % расхода потребляемой свежей воды.

Биологическую очистку сточных вод молочных заводов осуществляют на собственных или общих очистных сооружениях совместно с бытовыми стоками населенных пунктов.

Очистное сооружение в принципе представляет собой проточный водоем, в котором при участии грибов и бактерий (аэробных и анаэробных) происходит разложение органических веществ. Цель очистки сточных вод состоит в освобождении их от твердых и жидких минеральных и органических веществ, прежде чем эти воды попадут в ручьи и реки.

Содержание органических веществ, разлагаемых микробами, оценивают по так называемому «биологическому потреблению кислорода» (БПК). Это количество кислорода, необходимое микроорганизмам для окисления органического материала в процессе дыхания. Например, БПК-5 - это количество кислорода (мг), которое будет потреблено микроорганизмами в процессе разложения органических веществ за 5 дней. «Химическое потребление кислорода» (ХПК) означает количество кислорода, необходимое для полного

химического окисления тех же веществ до CO_2 и H_2O .

Для очистки сточных вод в очистных системах используются различные технические приемы, однако, при этом осуществляются в принципе одни и те же основные этапы:

1) удаление относительно легко осаждаемых твердых частиц в пескоуловителе и в первичном отстойнике;

2) микробиологическое окисление растворенных органических веществ с применением активного ила либо с использованием биофильтра;

3) инкубация осадка, удаленного из первичного и вторичного отстойников, в анаэробных условиях в метантенке, где в результате образуется метан и выпадает осадок. После обезвоживания из этого осадка можно получать компост и использовать его в качестве удобрения или сжигать.

Затем очищенная, осветленная вода сбрасывается в реки непосредственно или через водоприемник. Эта вода содержит продукты минерализации - ионы фосфата, нитрата, аммония и др. Для того, чтобы избежать загрязнения водоемов такой водой, ее можно использовать для орошения полей или удобрения лесных почв либо добавить к обычной процедуре очистки еще один этап и путем денитрификации освобождать сточные воды хотя бы от связанного азота. Дополнительно сточные воды можно очищать путем химического осветления, а именно осаждением ионов фосфата с помощью солей железа. Возможно проведение и других мероприятий по очистке сточных вод.

Биологическая очистка обусловлена развитием активного ила, в состав которого входят бактерии, мелкие и крупные инфузории, брохоресничные, коловратки, нитчатые, молочнокислые и другие организмы, обуславливающие распад различных веществ, входящих в сточные воды. Количество различных групп микроорганизмов в сточных водах до очистки и после нее приведено в табл. 2.

2. Количество микроорганизмов различных групп в 1 см^3 сточных вод молочного завода

Аэробы	Анаэробы	Грибы	Молочнокислые бактерии	Аммонифицирующие (гиплостные)	Денитрифицирующие
<i>Загрязненные сточные воды</i>					
$1,2 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$5,5 \times 10^7$	$2,1 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^5$
<i>Очищенные сточные воды</i>					
$2,1 \times 10^7$	$1,0 \times 10^4$	-	$1,2 \times 10^2$	$6,0 \times 10^4$	$6,0 \times 10^2$

Для уничтожения возможных болезнетворных микроорганизмов сточные воды перед выпуском в водоем необходимо обеззараживать. С этой целью применяют хлорирование хлорной известью, газообразным хлором или гипохлоритом.

Степень микробного обсеменения воды имеет большое значение в производстве пищевых продуктов. Вода, используемая на предприятиях пищевой промышленности, по микробиологическим показателям должна соответствовать требованиям Санитарных правил и норм (СанПиН 2.1.4.559-96), представленным в табл. 3.

3. Нормативы качества питьевой воды по микробиологическим показателям

Показатели	Единицы измерения	Нормативы
Термотолерантные колиформные бактерии	Число бактерий в 100 мл. 1)	Отсутствие
Общие колиформные бактерии 2)	Число бактерий в 100 мл. 1)	Отсутствие
Общее микробное число 2)	Число образующих колонии бактерий в 1 мл	Не более 50
Колифаги 3)	Число фагообразующих единиц (БОЕ) в 100 мл	Отсутствие
Споры сульфитредуцирующих клостридий 4)	Число спор в 20 мл.	Отсутствие

Примечания:

1. При определении проводится трехкратное исследование по 100 мл отобранных проб воды.
2. Превышение норматива не допускается в 95 % проб, отбираемых в точках водозабора наружной и внутренней водопроводной сети в течение 12 мес при количестве исследуемых проб не менее 100 за год.
3. Определение проводится только в системах снабжения из поверхностных источников перед подачей воды в распределительную сеть.
4. Определение проводится при оценке эффективности технологии обработки воды.

5.3. МИКРОФЛОРА ВОЗДУХА

Воздух является неблагоприятной средой для развития многих микроорганизмов. В нем нет питательных веществ, постоянной оптимальной температуры, часто отсутствует влага, губительно действуют на микроорганизмы солнечная энергия и другие факторы.

Источником микрофлоры воздуха является в основном почвенный покров, а также человек, растительный и животный мир. Видовой состав микрофлоры воздуха определяется местными источниками загрязнения, в первую очередь поступлением пыли с почвы. Воздух помещений, имеющих плохую санитарно-техническую характеристику, может содержать до 45-60 тыс. микробных клеток в 1 м³, а с хорошей характеристикой — 5-6 тыс.

В воздухе содержится значительное количество сапрофитных микробов - гнилостных бактерий, кокков, спор дрожжей, плесеней, лучистых грибов; молочнокислые бактерии и др.; могут находиться также и патогенные микроорганизмы: возбудители туберкулеза, вирусы

гриппа, коклюша; возбудители катаров верхних дыхательных путей и др. Микроорганизмы находятся в воздухе в виде капельного или пылевого микробного аэрозоля.

Санитарно-показательными микроорганизмами воздуха принято считать постоянных обитателей верхних дыхательных путей человека - телящихих и гемолитических стрептококков и гноеродных стафилококков. По количеству этих микроорганизмов, находящихся в воздухе, можно судить о степени обсеменения его носоглоточной микрофлорой человека и, следовательно, косвенно о санитарном состоянии воздуха.

В молочной промышленности в воздухе заводских помещений определяют общее количество бактерий, количество дрожжей и плесеней не реже одного раза в месяц; в расфасовочных цехах сгущенного молока с сахаром - не реже 3 раз в месяц. Примерные микробиологические показатели оценки воздуха приведены в табл. 4.

4. Примерные микробиологические показатели для оценки воздуха помещений

Объект анализа	Оценка								
	отлично			хорошо			удовлетворительно		
	количество колоний, выросших на чашках Петри (осаждение 5 мин)								
	бактерий	плесеней	дрожжей	бактерий	плесеней	дрожжей	бактерий	плесеней	дрожжей
Воздух цеховых помещений предприятий	До 20	-	-	20-50	До 5	До 5	50-70	До 5	До 5
Воздух остальных помещений предприятий	До 30	До 5	-	30-70	5-10	До 5	70-100	До 15	5-10

* Для молочнокислых заводов при обнаружении дрожжей и плесеней в любом количестве ставится неудовлетворительная оценка.

Способы очистки и обеззараживания воздуха можно разделить на физические и химические.

К физическим относят вентиляцию, фильтрацию, ультрафиолетовое облучение.

Очистка поступающего воздуха путем фильтрации повышает эффективность вентиляции. Фильтры, пропитанные специальной пылесвязывающей жидкостью, устанавливают в вентиляторах. Они задерживают до 95 % микроорганизмов и частиц пыли. Для обеззараживания воздуха производственных и других цехов ультрафиолетовыми лучами применяют бактерицидные увиолетовые лампы (БУВ) разной мощности.

В качестве химического способа используют дезинфекцию.

Дезинфицирующие препараты должны быть безвредными для людей, не должны вызывать порчу оборудования, сырья и продуктов. Этим требованиям отвечают триэтленгликоль, молочная кислота, хлорсодержащие препараты, которые распыляют в воздухе.

Часто комбинируют физические и химические способы очистки и дезинфекции воздуха.

5.4. МИКРОФЛОРА РАСТЕНИЙ И КОРМОВ

На растениях постоянно присутствует разнообразная микрофлора, называемая эпифитной. Наиболее часто встречаются неспоровые виды микроорганизмов: *Bact. herbicola* составляет до 40 % всей эпифитной микрофлоры, *Ps. fluorescens* - до 40, молочнокислые бактерии - 10, бифидобактерии - 2, дрожжи, плесневые грибы, маслянокислые, целлюлозные, термофильные бактерии - 8 %.

После скашивания растений эпифитная микрофлора, особенно гнилостная и термофильная, интенсивно размножаясь, проникает в толщу растительных тканей и вызывает их разложение. Поэтому продукцию растениеводства (зерно, грубые и сочные корма) предохраняют от разложения различными методами консервирования - высушиванием, силосованием и др. Сущность силосования состоит в том, что в измельченной зеленой массе интенсивно размножаются молочнокислые бактерии, разлагающие сахара с образованием молочной кислоты, количество которой накапливается до 1,5-2,5 % от массы силоса.

Одновременно размножаются уксуснокислые бактерии, превращающие спирт и другие углеводы в уксусную кислоту, накапливающуюся в количестве 0,4-0,6 % от массы силоса.

Силос сохраняется в хорошем состоянии до трех лет, пока в нем содержится не менее 2 % молочной и уксусной кислот, а рН составляет 4,0-4,2. Если размножение молочнокислых и уксуснокислых бактерий ослабевает, то начинают размножаться дрожжи, плесени, гнилостные, маслянокислые бактерии и силос портится.

5.5. МИКРОФЛОРА ТЕЛА ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

Наиболее важное значение в обсеменении молока имеет микрофлора кожи и желудочно-кишечного тракта, так как она является источником основных санитарно-показательных микроорганизмов.

Микрофлора кожи животных и человека представлена стафилококками, стрептококками, микрококками, сарцинами, спорами плесневых грибов и некоторыми патогенными или условно-патогенными микроорганизмами. На коже животных при плохом уходе может находиться до сотен тысяч клеток на 1см^2 . При ослаблении организма, повреждениях кожи данная микрофлора может вызывать гнойничковые

заболевания - фурункулы, абсцессы и др.

Микрофлора желудочно-кишечного тракта неодинакова в различных его участках. Микрофлора желудка относительно бедна из-за бактерицидного действия желудочного сока, имеющего высокую кислотность. В желудке выживают споровые и кислотоустойчивые бактерии, энтерококки, молочнокислые бактерии, дрожжи, споры плесневых грибов и актиномикетов.

Микрофлора рубца жвачных животных играет важную роль в разложении клетчатки, являющейся основным компонентом грубых кормов. Разложение клетчатки происходит под действием целлюлозолитических бактерий. Рубцовое брожение грубых кормов обуславливают также простейшие инфузории, *Bact. amylophilus*, молочнокислые бактерии *Lbm. acidophilum*, *Lbm. fermentum*, а также бифидобактерии, энтерококки, руминококки и др.

Микрофлора рубца в основном обеспечивает расщепление белков, углеводов, липидов, минеральных веществ, потребность жвачных животных в витаминах групп В и К.

В тонком отделе кишечника, несмотря на щелочную реакцию среды, количество видов микроорганизмов невелико. В этом отделе кишечника чаще всего находятся устойчивые к действию желчи энтерококки, кишечные и споровые палочки, дрожжи и молочнокислые бактерии. В толстом отделе кишечника основную массу микрофлоры составляют *E. coli*, энтерококки, *Cl. perfringens*, ацидофильные палочки, бифидобактерии, кишечные вирусы.

Количество микроорганизмов в содержимом толстого отдела кишечника составляет несколько миллиардов клеток в 1 г. Микробная масса испражнений составляет 30-40 % сухого вещества.

Микроорганизмы толстого отдела кишечника подразделяют на три основные группы: аутохтонные, автохтонные и контаминанты.

Аутохтонные микроорганизмы являются постоянными обитателями толстого отдела кишечника. Это бифидобактерии, кишечные палочки, энтерококки, кишечные вирусы, молочнокислые бактерии и др.

Автохтонные бактерии способны заселять (колонизировать) кишечник организма хозяина в определенные периоды, что обусловлено возрастом, типом питания макроорганизма и другими факторами. Это гнилостные бактерии, дрожжи, анаэробные клостридии и др. В это время могут приобретать доминантное положение определенные группы аутохтонных микроорганизмов.

Контаминанты называют микроорганизмы, которые находятся в кишечнике непродолжительный период времени. К этой группе относится большинство патогенных микроорганизмов, часто вызывающих тяжелые диарейные заболевания.

РОЛЬ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПРЕВРАЩЕНИИ ВЕЩЕСТВ

В соответствии с выполняемой функцией организмы в природе разделяются на три группы.

Зеленые растения синтезируют органические вещества, используя энергию солнца и углекислоту воздуха, поэтому их называют *продуцентами*.

Животные являются потребителями (*консументами*); они расходуют значительную часть первичной биомассы для построения своего тела.

Тела животных и растений в конце концов подвергаются разложению, при котором органические вещества превращаются в минеральные. Этот процесс, называемый *минерализацией*, осуществляют грибы и бактерии; в балансе природы они служат деструкторами.

Таким образом, во внешнюю среду - в почву и воду - постоянно поступают сложные органические вещества, которые непрерывно разлагаются различными микроорганизмами. При этом одновременно происходит два взаимно противоположных процесса: превращение менее сложных химических соединений в более сложные, из которых строится живая материя, и, наоборот, распад сложных соединений на более простые химические элементы.

Единство этих диалектически противоположных процессов лежит в основе биологической роли микроорганизмов в круговороте веществ в природе. Среди различных процессов превращения веществ в природе важнейшее значение для жизни растений, животных и человека имеет круговорот азота и углерода в природе.

6.1. КРУГОВОРОТ АЗОТА

Под круговоротом понимают цикл различных превращений веществ, благодаря которым запасы их в природе не уменьшаются и являются неисчерпаемыми. Азот входит в структурную формулу аминокислот и является необходимой частью белковой молекулы, поэтому он имеет исключительно важное значение для жизни на Земле. Без азота не может быть белка, а без белка — живого организма.

Запасы азота в природе неисчерпаемы, он составляет 78 % объема воздуха. Однако ни растения, ни животные не могут усваивать газообразный азот атмосферы.

Растения усваивают так называемый связанный азот почвы в виде растворов солей азотной кислоты (нитратов), используемых для синтеза белков и других органических соединений. Животные усваивают азот в

форме органических соединений, т. е. в виде растительного или животного белка.

Связанный азот почвы мог бы быстро израсходоваться (в течение 100-200 лет), если бы запасы его постоянно не пополнялись за счет круговорота.

Круговорот азота в природе складывается из трех основных процессов, каждый из которых осуществляется в почве определенной группой бактерий:

- фиксация (усвоение) атмосферного азота;
- восстановление азота, включающее процессы аммонификации (гниение);
- окисление азота (нитрификация).

Фиксация атмосферного азота. Только прокариоты способны использовать запасы азота, содержащиеся в атмосфере, фиксировать молекулярный азот. Они самостоятельно или в симбиозе с высшими растениями переводят инертный азот (N_2) в органические соединения и включают его (непосредственно или через растения) в белок, который в конечном счете попадает в почву и подвергается минерализации (гниению).

Усвоение молекулярного азота атмосферы (азотфиксация) возможно с помощью двух групп азотфиксирующих микроорганизмов: свободноживущих и клубеньковых бактерий, обитающих на корнях бобовых растений. Эти микроорганизмы при помощи ферментов нитрогеназ связывают свободный азот с другими химическими элементами и синтезируют из него органические соединения своей клетки. Значение азотфиксирующих микроорганизмов очень велико, они обогащают почву связанным азотом и способствуют повышению ее плодородия.

Свободноживущими азотфиксирующими микроорганизмами являются крупные грамположительные анаэробные клостридии - *Cl. pasteurianum*, *Cl. butyricum*, *Cl. felseium* и др., а также бактерии рода *Azotobacter*.

Развиваясь на средах, содержащих углеводы, клостридии разлагают их с образованием масляной и уксусной кислот, углекислого газа и водорода. В связи с этим их называют маслянокислыми бактериями.

Бактерии рода *Azotobacter* представляют собой мелкие коккоподобные, подвижные, грамтрикатальные аэробные палочки. В качестве источника азота могут усваивать соли аммония, нитриты, нитраты и аминокислоты. При отсутствии связанных форм азота фиксируют молекулярный азот.

Кроме перечисленных родов свободноживущих бактерий способностью связывать молекулярный азот обладают многие цианобактерии, что имеет существенное значение на рисовых полях, а

также сульфатредуцирующие и метанообразующие бактерии.

Свободноживущие азотфиксирующие микроорганизмы вносят в почву 1-3 кг азота на 1 га в год.

Большую часть азота связывают клубеньковые бактерии, которые развиваются в утолщениях (клубеньках) на корнях бобовых растений. Эти микроорганизмы ежегодно обогащают почву азотом в количестве 100-300 кг на 1 га.

Клубеньковые бактерии относят к роду *Rhizobium*. Это граммотрицательные, подвижные, неспорообразующие, аэробные палочки. Бактерии питаются органическими соединениями бобовых растений, а растения получают из клубеньков связанное соединение азота.

Гниение. Гниение — это микробиологический процесс, при котором под воздействием гнилостных микробов происходит гидролитическое расщепление белка с образованием промежуточных соединений (альбумоз, пептонов, аминокислот), а также дурнопахнущих веществ (индоля, скатола, сероводорода, меркаптана, летучих жирных кислот и др.).

Конечным продуктом этого гидролиза и дезаминирования аминокислот является аммиак. Таким образом, в результате аммонификации белковых веществ осуществляется превращение «органического азота» в аммиачный.

Процесс распада белков называют протеолизом, так как он начинается под действием протеолитических ферментов, выделяемых микроорганизмами в окружающую среду.

Глубина расщепления белковых веществ и направление гнилостного процесса зависят от микроорганизмов и условий их жизнедеятельности, основными из которых являются температура, влажность, доступ кислорода воздуха.

При широком доступе кислорода происходит полная минерализация белковых веществ и в качестве конечных продуктов гниения образуются аммиак, углекислый газ, вода, сероводород, соли фосфорной кислоты и др. Такой процесс называют *тлением*.

Гниение в отличие от тления является анаэробным процессом, при котором полного окисления белковых продуктов не наступает, в результате чего помимо аммиака и углекислого газа накапливаются различные органические кислоты, спирты, амины и другие органические соединения. Одни из них придают гниющему субстрату неприятный запах, другие могут быть ядовитыми, ранее их называли *птомаинами*, т. е. трупными ядами.

Особенно энергично гнилостные процессы проходят в верхних слоях почвы. При этом гниение остатков растений, трупов животных и различных органических отходов ведет к обогащению почвы азотистыми продуктами. Кроме того, этот процесс имеет большое

санитарное значение, так как сопровождается естественной очисткой почвы и воды.

На процесс гниения влияет реакция среды. В кислых субстратах гнилостные микроорганизмы не развиваются и гниения не происходит.

Для сохранения продуктов от гнилостной порчи их консервируют, используя холод, посол, копчение, вяление, молочнокислое брожение, высушивание, стерилизацию, засахаривание и другие способы консервирования.

Гнилостные микроорганизмы широко распространены в природе: в почве, воде, воздухе, в кишечнике человека и животных, в молоке, мясе, на других пищевых продуктах. К ним относят бактерии, плесени, актиномицеты, обладающие способностью продуцировать протеолитические ферменты и разлагать белки.

Нитрификация. Центральное место в круговороте азота занимает аммиак. Он является продуктом разложения белков и аминокислот, попадающих вместе с остатками животного и растительного происхождения в почву. В хорошо аэрируемых почвах аммиак подвергается нитрификации.

Нитрификацией называется процесс окисления аммиака и аммиачных солей, образующихся при гнилостном разложении органических веществ, до солей азотистой, а затем азотной кислоты. Она осуществляется в два этапа.

На первом этапе нитрозные бактерии родов *Nitrosomonas*, *Nitrososoccus*, *Nitrosospira* окисляют аммиачные соли до солей азотистой кислоты, получая при этом энергию, необходимую для их жизни.

На втором этапе нитратные бактерии рода *Nitrobacter* окисляют соли азотистой кислоты в соли азотной кислоты (нитраты), которые усваиваются растениями и используются для синтеза растительного белка.

В природных условиях возможны также процессы *денитрификации*, при которых нитраты восстанавливаются до нитритов, аммиака и молекулярного азота. Эти процессы происходят в результате жизнедеятельности бактерий родов *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Microsoccus* и др. Денитрификация ведет к понижению плодородия почвы, так как образовавшийся азот улетучивается в атмосферу.

6.2. КРУГОВОРОТ УГЛЕРОДА

Углерод является структурной основой молекул всех органических веществ. Он составляет до 50 % зольной массы клеток.

Основным источником углерода служит углекислый газ (CO_2), который содержится в атмосфере в количестве 0,03 %. Поэтому, если бы содержание его постоянно не восполнялось, такого количества не хватило бы и на 100 лет, так как ежегодно растениями поглощаются

сотни миллионов тонн CO_2 .

Все зеленые растения для фотосинтеза органических веществ используют CO_2 в качестве источника углеродного питания. Атмосферный углерод могут усваивать также некоторые автотрофные микроорганизмы. Животные, люди и многие микроорганизмы (гетеротрофы) усваивают углерод в виде органических соединений растительного или животного происхождения.

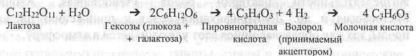
Атмосфера пополняется углекислым газом при вулканических извержениях, при сжигании и окислении различных веществ, а также в результате дыхания людей и животных. Однако этого количества CO_2 было бы недостаточно для развития растений и поддержания постоянной концентрации углекислого газа в атмосфере.

Поступление углекислого газа в атмосферу обеспечивается главным образом микроорганизмами, осуществляющими ферментацию (сбраживание) различных углеводов, при которой углерод органических соединений возвращается в воздух в виде углекислого газа.

Брожение — это метаболический процесс, при котором регенерируется АТФ, а продукты расщепления углеводов могут служить одновременно и донорами, и акцепторами водорода. При этом основным этапом биологического окисления является дегидрогенирование, при котором водород переносится не на кислород, а на промежуточные продукты расщепления субстрата, служащие акцепторами водорода. От окисленного углерода клетка избавляется, выделяя углекислый газ. Таким образом, брожением называют дегидрогенирование углеводов, протекающее преимущественно в анаэробных условиях.

Существует несколько видов (типов) брожения. Для молочной промышленности наибольшее значение имеют следующие виды брожения: молочнокислое, спиртовое, уксуснокислое, пропионовокислое и маслянокислое.

Молчнокислое брожение. В процессе молочнокислого брожения молочный сахар (лактоза) и другие сахара молочнокислыми бактериями превращаются в молочную кислоту:



При этом вначале под воздействием фермента лактазы происходит гидролиз лактозы на две частицы гексоз: глюкозу и галактозу. Затем они через ряд промежуточных продуктов превращаются в пировиноградную кислоту, а потом в молочную.

Различают гомо- и гетероферментативное молочнокислое брожение. Брожение, в результате которого в качестве основного

продукта брожения образуется молочная кислота (не менее 90 %), называют гомоферментативным брожением.

При гетероферментативном брожении наряду с молочной кислотой образуются уксусная кислота, этиловый спирт, углекислый газ, ацетон, диашетил и другие ароматические вещества.

Молчнокислое брожение широко используется в пищевой промышленности при производстве кисломолочных продуктов, сыра, при квашении капусты, посоле огурцов, мочении яблок, а также при силосовании кормов. Молочную кислоту применяют в кондитерском производстве и в производстве безалкогольных напитков.

Молчнокислому брожению подвержены не только гексозы (глюкоза, галактоза), дисахариды (лактоза, сахароза, мальтоза), пентозы (арабиноза), но также многоатомные спирты, многоосновные кислоты и даже белки. Расщепление сахаров при молчнокислом брожении происходит без участия кислорода.

Известно большое количество молочнокислых бактерий, отличающихся друг от друга как морфологически, так и по физиологическим свойствам.

Молчнокислое брожение, обусловленное молочнокислыми бактериями, называют типичным. Возбудителями нетипичного молчнокислого брожения являются *E. coli*, сапрофитные кишечные палочки рода *Enterobacter*, другие микроорганизмы, сбраживающие лактозу и образующие наряду с молочной кислотой янтарную и уксусную, этиловый спирт, углекислый газ, водород и другие вещества.

Спиртовое брожение. Характеризуется распадом сахаров, чаще гексоз, до этилового спирта и углекислого газа с выделением энергии.

Наряду с этиловым спиртом и CO_2 при спиртовом брожении образуются побочные продукты, такие, как уксусный альдегид, глицерин, янтарная кислота и высшие спирты (бутиловый, изобутиловый, амилвый, изоамиловый и др.), получившие название сивушных масел. Их возникновение связано с разложением аминокислот, используемых возбудителями брожения в качестве источника азота.

Спиртовое брожение известно человечеству очень давно, однако, его природа была раскрыта в 1858 г. Пастером, который доказал, что спиртовое брожение сахаристых веществ зависит от жизнедеятельности дрожжевых клеток, способных вырабатывать специальные экзоферменты. Основным и наиболее активным ферментом дрожжей является зимаза, впервые выделенная Бухнером в 1897 г.

Способностью вызывать спиртовое брожение обладают также некоторые виды муковых плесневых грибов и бактерий (*Sarcina ventriculi*).

Каждый вид дрожжей подразделяют на расы. Расой называют разновидность микроорганизмов, которые, сохраняя все основные

пропионовая, валериановая, капроновая, янтарная, муравьиная и другие кислоты, этиловый, амиловый, бутиловый спирты и ацетон.

Маслянокислое брожение иногда происходит в молоке, сыре и других молочных продуктах, причем эти продукты приобретают прогорклый вкус и неприятный запах. Результатом маслянокислого брожения иногда являются вспучивание сыра, бомбаж жестянобаночных консервов и другие пороки.

В то же время сама масляная кислота находит широкое техническое применение. Эфиры ее употребляются в качестве ароматизирующих веществ в ликероводочном, кондитерском и парфюмерном производствах. В кожевенном деле масляная кислота с успехом заменяет молочную для удаления из кожи извести.

ОСНОВЫ ГЕНЕТИКИ МИКРООРГАНИЗМОВ

7.1. ПОНЯТИЕ О НАСЛЕДСТВЕННОСТИ И ИЗМЕНЧИВОСТИ

Генетика - биологическая наука, изучающая закономерности и материальные основы наследственности и изменчивости организмов.

Наследственность - это свойство организмов передавать своему потомству присущие им признаки строения, физиологические особенности и специфический характер индивидуального развития. Другими словами, это процесс воспроизведения организмами в последующих поколениях сходного типа обмена веществ, признаков и свойств.

Изменчивость - явление противоположное наследственности. Она заключается в возникновении различий между особями по ряду признаков или свойств, а также в варибельности их проявлений в процессе развития организмов при взаимодействии с окружающей средой, т.е. это свойство организмов приобретать новые признаки в процессе индивидуального развития.

Наследственность и изменчивость взаимно обусловлены. Они обеспечивают относительное постоянство видов микроорганизмов (живых существ) в природе и их непрерывное совершенствование. Новые свойства организмов появляются только благодаря изменчивости, но она лишь тогда может играть роль в эволюции, когда появившиеся изменения сохраняются в последующих поколениях, т.е. наследуются. Таким образом, наследственность и изменчивость тесно связаны с эволюцией.

Наука, изучающая явление наследственности и изменчивости на основе молекулярных структур клетки, называется молекулярной генетикой.

Явления наследственности и изменчивости играют особенно важную роль в жизни микроорганизмов, которые отличаются интенсивным обменом веществ, быстрым темпом размножения и сменой поколений, а также чрезвычайно высокой способностью приспосабливаться к новым условиям обитания.

В связи с этим вопрос наследственности и изменчивости привлекал внимание ученых-микробиологов на протяжении всей истории развития науки.

Одни исследователи (К.Негели и др., 1874) считали, что бактерии обладают свойствами неограниченной изменчивости, т.е. одни и те же микробы в зависимости от условий внешней среды могут приобретать различные морфологические и физиологические свойства. Это учение получило название плеоморфизма. Плеоморфисты объясняли, что в природе существует только несколько чрезвычайно изменчивых видов

бактерий. Антинауочность этих утверждений заключалась в том, что биоморфисты отрицали возможность познания и систематизации микроорганизмов ввиду их непрерывной и хаотической изменчивости.

Другая группа ученых (Ф. Кон, 1879; Р. Кох, 1881) утверждала, что в природе существует множество видов микробов, свойства которых неизменны. Это течение в микробиологической науке получило название мономорфизма. Мономорфисты считали, что изменения свойств микробов временны и имеют второстепенное значение. Антинауочность этого направления состояла в том, что мономорфисты отрицали возможность направленной изменчивости свойств микроорганизмов и практического использования явления изменчивости для получения штаммов микробов с полезными для человека биологическими свойствами.

Работами многих ученых (Л. Пастер, И. И. Мечников, Л. С. Ценковский и др.) было доказано, что в природе существует множество видов микроорганизмов, обладающих определенными биологическими свойствами, которые могут изменяться под влиянием физических, химических и биологических воздействий внешней среды.

Явление изменчивости с успехом используется в молочной промышленности для получения заквасочных штаммов микроорганизмов с заданными производственно-ценными свойствами.

7.2. МАТЕРИАЛЬНАЯ ОСНОВА НАСЛЕДСТВЕННОСТИ. ГЕНОТИП И ФЕНОТИП

Генетическим материалом бактерий, как и других организмов, являются нуклеиновые кислоты - ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) и РНК (рибонуклеиновая кислота).

Нуклеиновые кислоты - это высокомолекулярные вещества, биополимеры, хранящие и передающие у всех организмов наследственную информацию. Состоят из нуклеотидов, последовательность расположения которых определяет синтез специфических белков.

Первичным генетическим материалом, или материальным основой наследственности, является ДНК, которая служит носителем генетической информации, из ДНК построены непосредственно генетические структуры - хромосомы и гены, бактериальные плазмиды и бактериальные вирусы (бактериофаги).

Молекула ДНК состоит из двух полинуклеотидных цепей (двунитчатая структура), свернутых в спираль. В состав отдельных нуклеотидов ДНК входят четыре азотистых основания: аденин (А), гуанин (Г) - пуриновые основания; цитозин (Ц), тимин (Т) - пиримидиновые основания, а также сахар дезоксирибоза и остаток фосфорной кислоты.

ДНК бактерий локализуется в ядерной зоне, где ее молекула часто прикрепляется к мезосомам и цитоплазматической мембране. Если бактерии имеют плазмиды, то ДНК располагается и в цитоплазме клетки.

Плазмидами называют внехромосомные, внеядерные молекулы ДНК, способные к самостоятельной репликации и передающиеся в дочерние клетки при делении бактерий.

Под репликацией ДНК понимают удвоение молекул ДНК. Двойная цепь ее сначала разделяется на две, и на каждой из образовавшейся цепей под действием фермента ДНК - полимеразы достраиваются новые комплементарные (недостающие) дочерние цепи нуклеотидов.

В каждой нити ДНК закодирована генетическая (наследственная) информация. Отдельные участки молекулы ДНК представляют собой функциональные генетические единицы - гены, которые являются основным материальным элементом наследственности.

Специфическая информация, содержащаяся в гене, определяется последовательностью оснований в цепи ДНК. «Алфавит», с помощью которого записана эта информация ДНК, включает четыре «буквы» - основания аденин (А), гуанин (Г), тимин (Т) и цитозин (Ц). В и-РНК тимин заменен урацилом (У).

Специфичность ферментных белков, синтез которых контролируют гены, определяется последовательностью аминокислот в полипептидных цепях. Эта же последовательность определяет и пространственную структуру белка, так называемую *конформацию*.

Гены входят в состав хромосом и контролируют определенную степень обмена веществ в организме, тем самым оказывают специфическое действие на развитие одного или нескольких признаков, т.е. обладают элементарной биохимической функцией, например, определяют структуру одного фермента.

Хромосомами называют элементы клеточного ядра, состоящие из ДНК и белков. Они являются основными носителями наследственной информации организма.

Участок хромосомы, в котором локализован ген, называется *локусом* хромосомы, а хромосомный аппарат ядра или аналогичной ему структуры составляет *геном* клетки.

Гены подразделяются на структурные, гены-регуляторы и гены-операторы. Различают также модификационные гены, самостоятельно не проявляющиеся и активизирующиеся под действием регуляторных генов.

Наиболее важными являются *структурные гены*, в которых кодируется информация о первичной структуре контролируемого геном белка, т.е. о последовательности расположения аминокислот, входящих в состав белка.

Гены-регуляторы, ответственные за синтез специфических продуктов белковой или небелковой природы, выполняющих роль регуляторов биохимической активности других генов, контролируют синтез белков-репрессоров, подавляющих функцию структурных генов. **Гены-операторы** выполняют роль посредников между генами-регуляторами и структурными генами.

Генетический код обуславливает последовательность расположения азотистых оснований в ДНК, что определяет и последовательность расположения аминокислот в синтезируемом белке.

Полный набор генов, которым обладает клетка, представляет собой **генотип**, определяющий развитие признаков и свойств микроорганизмов.

Гены принято обозначать строчными начальными буквами, соответствующими названию синтезируемого под их контролем соединения. Например, arg^+ - аргининовый ген, his^+ - гистидиновый ген и т.д. Аналогичным образом обозначают гены, контролирующие другие генетические признаки. Так, гены, контролирующие расщепление углеводов, обозначают по названию того или иного вещества (lac^+ , mal^+ - гены контролирующие расщепление соответственно лактозы и мальтозы).

Совокупность наблюдаемых признаков и свойств микроорганизмов, сформировавшихся на основе генотипа и проявляющихся в тех или иных условиях их существования, принято называть **фенотипом**. Например, при выращивании эшерихий в среде, лишенной лактозы, не вырабатывается фермент лактаза, а при культивировании их в лактозной среде этот фермент синтезируется; патогенные стафилококки синтезируют фермент пенициллиназу при длительном их выращивании на средах с пенициллином.

Фенотип бактерий обозначается теми же символами, что и генотип, но первая буква пишется прописная (Arg^+ , His^+ , Lac^+ , Mal^+).

РНК является вторичным генетическим материалом и участвует в разных этапах генетической информации, так как существуют различные типы этой нуклеиновой кислоты: информационная или матричная (и-РНК), транспортная (т-РНК) и рибосомная (р-РНК). У РНК-содержащих бактериофагов РНК является первичным генетическим материалом.

Рибонуклеиновая кислота представляет собой биологический полимер, участвующий в биосинтезе белка. Состоит из нуклеотидов, соединенных в виде спиралевидной цепочки. В состав каждого из них входят: азотистые основания (аденин, гуанин, цитозин, урацил), сахар рибоза и фосфорная кислота, т.е. состав оснований аналогичен ДНК, только вместо тимина содержится урацил и вместо дезоксирибозы - рибоза.

Информационная РНК (и-РНК) играет роль переносчика информации от кода ДНК к рибосоме. На и-РНК, как на матрице, происходит синтез белка из аминокислот. При этом каждый белок клетки кодируется специфической и-РНК.

Транспортная РНК (т-РНК) играет роль переносчика аминокислот к рибосоме, где они связываются в полипептидную цепь. Она присоединяет только одну определенную кислоту (например, лизин) к рибосоме - месту синтеза белка. Следовательно, существует немного больше двадцати т-РНК, которые различаются по своей первичной структуре (имеют различную последовательность нуклеотидов).

Рибосомная РНК (р-РНК) входит в состав рибосом, выполняя тем самым структурную функцию. Кроме того, р-РНК участвует в формировании активного центра рибосомы, где происходит образование пептидных связей между молекулами аминокислот в процессе биосинтеза белка.

Таким образом, все типы РНК представляют собой функционально объединенную систему, направленную на осуществление синтеза специфических для клетки белков.

7.3. ФОРМЫ ИЗМЕНЧИВОСТИ

Изменчивость микроорганизмов подразделяют на **наследственную** и **ненаследственную**, или модификационную.

Наследственная изменчивость обусловлена изменениями в генетическом аппарате клетки. Она проявляется в виде генетических рекомбинаций и мутаций.

7.3.1. Генетические рекомбинации

В связи с тем, что у бактерий имеется только один набор генов (хромосом), они почти всегда гаплоидны. Зиготы (оплодотворенные клетки) могут образовываться и у бактерий, но они никогда не бывают продуктом объединения целых клеток.

Как правило, из клетки-донора в клетку-реципиент переносится лишь часть генетического материала, т.е. образуется неполная зигота (мерозигота). Хромосома реципиента соединяется с фрагментом хромосомы донора и они обмениваются отдельными участками, т.е. в клетке-реципиенте происходит рекомбинация генов, которая обуславливает одну из форм наследственной изменчивости бактерий.

В связи с вышесказанным передачу генетического материала от одних микробов другим рассматривают как элементы полового процесса, при котором количество особей остается прежним, но происходит обмен их наследственным материалом, т.е. осуществляется генетическая рекомбинация.

При генетических рекомбинациях в хромосому бактериальной клетки-реципиента (от лат. *receptio*- беру, получаю) встраиваются фрагменты хромосомы микроба-донора (от лат. *dono*- дарю).

Образующиеся рекомбинанты в основном сохраняют генотип микроба-реципиента, приобретаются только отдельные свойства микроба-донора.

Передача генетического материала от одних микробов другим происходит путем трансформации, конъюгации (полового скрещивания бактерий) и трансдукции с помощью бактериофагов.

Т р а н с ф о р м а ц и я - изменение наследственного свойства штамма-реципиента, в ДНК которого включается фрагмент ДНК штамма-донора. Передача генетического материала от донора реципиенту происходит в форме изолированных фрагментов ДНК.

Наиболее эффективно трансформация проявляется у бактерий одного и того же вида, имеющих различный генотип, реже наблюдается у бактерий близкородственных видов.

Трансформирующему воздействию подвергается до 10 % клеток бактериальной популяции. Клетки, способные воспринимать донорскую ДНК, называют компетентными. Состояние компетентности непродолжительно и чаще совпадает с концом экспоненциальной (логарифмической) фазы роста культуры.

Для проникновения донорской ДНК необходимо появление особого фактора компетентности и специального фермента, которые вызывают образование односторонних разрывов в ДНК реципиента. После проникновения в клетку участка двунитчатой донорской ДНК одна нить распадается, а вторая встраивается в ДНК реципиента.

При трансформации возможна передача не только независимых (несцепленных), но и сцепленных генов.

Для получения трансформантов очищенный препарат ДНК донора вносят в среду культивирования клеток реципиента или выращивают бактерии реципиента с убитыми клетками донора.

К о н ь ю г а ц и я б а к т е р и й - это передача генетического материала от одной клетки другой путем непосредственного контакта.

При конъюгации происходит односторонний перенос генетического материала от донора реципиенту. Необходимым условием для конъюгации должно быть наличие у донора специфического фактора плодovitости (фактор фертильности), обозначаемого буквой F (fertility).

У грамотрицательных бактерий имеются половые реснички (F-пили) - тонкие белковые трубочки, контролируемые F-фактором, через которые при конъюгации происходит перенос генетического материала.

Клетки, играющие роль донора (мужские), обозначаются F⁺, а клетки, выполняющие функции реципиента (женские, лишённые F-фактора), обозначаются F⁻.

При конъюгации между клетками образуется цитоплазматический мостик, через который передается вся хромосома или определенные гены от одной бактерии к другой только в одном направлении - от клеток-доноров (F⁺) к клеткам-реципиентам (F⁻).

Конъюгация бактерий напоминает редуцированный половой процесс.

Посредством конъюгации могут передаваться такие свойства, как способность продуцировать токсины, устойчивость к антибиотикам и дезинфицирующим средствам, и др.

Т р а н с д у к ц и я - перенос генетической информации из одной бактериальной клетки в другую, осуществляемый посредством бактериофагов. В процессе репродукции некоторых умеренных фагов небольшие фрагменты ДНК бактерий-доноров встраиваются в геном фага, который переносит их к клеткам-реципиентам. Трансдукция обуславливает формирование так называемых атипичных вариантов микроорганизмов, обладающих измененными биологическими свойствами (потребности в питательных веществах, ферментативная активность, устойчивость к антибиотикам, дезинфицирующим веществам и др.).

7.3.2. Мутации

В природе имеет место изменчивость организмов, связанная с нарушением структуры генов (ДНК) данной клетки. Приобретенные при этом новые свойства передаются дочерним клеткам. Такая наследственная изменчивость называется мутацией.

М у т а ц и я - это новые стойкие наследственные изменения свойств микроорганизма (морфологические, культуральные, биохимические и др.), обусловленные необратимыми изменениями в структуре ДНК генов и хромосом и не связанные с рекомбинационным процессом. Клетки, в которых происходят мутации, называют **мутантами**, а различные варианты гена, проявляющиеся в результате мутаций, - **его аллелими**.

В отношении генетической структуры различают три класса мутантов со следующими дефектами:

- 1) одна пара оснований заменена другой, например, вместо АТ может быть ГЦ или наоборот;
- 2) включена дополнительная пара оснований в нуклеотидную последовательность или утрачена из существующих пар;
- 3) группа оснований или даже генов может быть утрачена (делеция), перемещена в пределах хромосомы (транспозиция), наблюдается поворот участка ДНК на 180° (инверсия), повторение какого-нибудь фрагмента ДНК (дупликация).

Для мутаций класса 1, называемых также *точечными мутациями*, характерна высокая частота реверсии (восстановления), для мутаций класса 2 реверсии редки, а после мутаций класса 3 реверсии не бывает.

Бактериальные мутации делят на спонтанные и индуцированные.

С п о н т а н н ы е м у т а ц и и возникают в естественных условиях под влиянием внешних факторов, без вмешательства экспериментатора (при изменении температуры и рН среды, под действием ультрафиолетовых лучей, продуктов обена и др.). Частота спонтанных мутаций в популяции у бактерий находится в пределах от 1×10^{-5} (одна мутантная клетка на 100 тысяч) до 1×10^{-10} (один мутант на 10 миллионов клеток). Клетки, в которых возникли спонтанные мутации, называют *спонтанными мутантами*.

Следовательно, в любой чистой бактериальной культуре в процессе ее выращивания, хранения и пересевов происходит спонтанное образование мутантов, которые можно выделить рассевом на плотную питательную среду или с помощью селекционирующих факторов.

И н д у ц и р о в а н н ы е м у т а ц и и появляются вследствие обработки микробной популяции искусственными мутагенными факторами (мутагенами). Это могут быть физические мутагены (ультрафиолетовые лучи, температура, радиоактивные вещества) и воздействия химическими веществами (N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидин, этил- и метилметасульфонат, этиленмин, азотистый или серный иприт, нитрит, гидроксилламин и др.).

Процесс возникновения мутации под влиянием естественных и искусственных факторов называют мутагенезом, а мутантные клетки, так же как и мутации, соответственно называют *спонтанными индуцированными мутантами*.

Мутации, затрагивающие только один ген, называют *генами мутациями*, несколько генов - *хромосомными*. Если мутации происходят в ДНК ядерного вещества, их называют *нуклеотидными мутациями*, а мутации, возникающие в ДНК цитоплазмы, называют *цитоплазматическими мутациями*.

Мутанты дифференцируют по морфологическим, культуральным и ферментативным свойствам.

В молочной промышленности производственно-ценные индуцированные мутанты отбирают чаще по активности кислотообразования, при этом в качестве мутагенных факторов чаще используют ультрафиолетовые лучи.

7.3.3. Модификация

М о д и ф и к а ц и е й называют ненаследственную изменчивость, которая возникает под воздействием факторов внешней среды и, как правило, не оказывает влияния на развитие последующих поколений, т.е.

модификация не передается по наследству и утрачивается при восстановлении обычных для микроорганизма условий. Например, добавление к питательной среде солей лимонной кислоты увеличивает интенсивность ароматообразования у гетероферментативных молочнокислых стрептококков; недостаток кальция в среде вызывает повышение спорообразования и слизистый рост у бацилл сибирской язвы; неорганическое железо стимулирует образование токсинов микроорганизмами; глицерин и аланин обуславливают полиморфизм у холерных вибрионов и др. Микробы могут также временно изменять свою ферментативную способность.

Диапазоны модификационной изменчивости ограничиваются совокупностью фенотипов, которые создаются на основе определенного генотипа.

Изменения, появляющиеся в результате модификации, могут сохраняться в течение нескольких поколений.

При модификации не нарушается нормальное равновесие физиологических процессов в клетке и соответствие между клеткой и средой.

В связи с этим модификации также называют адаптивными реакциями на внешние раздражения, которые регулярно повторяются в нормальных условиях жизни.

У микроорганизмов особенно резко выражены процессы приспособления к непродолжительным, повторяющимся отклонениям от обычных условий среды обитания.

Подобные отклонения бывают циклическими при сезонных климатических изменениях и чисто случайными. Они приводят к подавлению или активации контролируемых генами процессов, которые не могли протекать при прежних условиях среды. Изменение структуры генетического аппарата при этом не происходит.

7.4. ОСНОВНЫЕ ТИПЫ ИЗМЕНЧИВОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Типы изменчивости включают изменчивость основных биологических свойств микроорганизмов: морфологических, культуральных, ферментативных, в потребностях метаболитов и др. Подразделение типов изменчивости является в какой-то мере условным, так как изменение одних признаков часто сопровождается изменением и других.

И з м е н е н и е м о р ф о л о г и ч е с к и х п р и з н а к о в. Под влиянием физических, химических и биологических факторов некоторые микроорганизмы принимают форму удлиненных и утолщенных нитей, ветвлений, напоминающих мицелий грибов; коккобактерий, колбовидных образований, форму шаров и др. Это явление называют **п о л и м о р ф и з м о м** (гетероморфизмом). Оно часто

наблюдается при старении культуры, когда могут появляться удлиненные формы кокков, нитевидные формы кишечных палочек и возбудителя туберкулеза. Уксуснокислые бактерии при культивировании их при 41 °С легко образуют очень длинные разбухшие нити; культивирование таких бактерий при оптимальной температуре сопровождается появлением типичных палочковидных форм.

Изменение культуральных свойств. Наряду с изменениями морфологических признаков у микроорганизмов изменяются также культуральные свойства, и наоборот.

Установлено, что культуры одного и того же вида бактерий могут различаться между собой. При посеве на плотную питательную среду чистой культуры образуются колонии двух основных типов: гладкие S-формы (от англ. *smooth* - гладкие) с ровным краем и шероховатые R-формы (от англ. *rough* - шероховатый) с ворсинчатым краем.

Между этими двумя типами колоний существуют промежуточные O-формы. Различия между формами колоний не ограничиваются только структурой колоний, они охватывают и другие признаки. Такая изменчивость колоний получила название *диссоциации*.

В некоторых случаях наблюдается образование дочерних и карликовых колоний, которые возникают соответственно на краю или на поверхности нормальных колоний.

Изменчивость ферментативных свойств. Добавление определенного вещества в питательную среду может вызвать активацию или синтез фермента, который до этого не продуцировался или находился в неактивном состоянии. Так, биосинтез фермента β-галактозидазы у эшерихий можно воспроизвести культивированием этих бактерий в присутствии лактозы.

Действием некоторых ядовитых веществ на бактерии удается лишить их способности продуцировать различные ферменты. Культивирование *Cl.perfringens* в среде с низким содержанием железа приводит к уменьшению ферментативной активности этого микроба.

Таким образом, под влиянием соответствующего метаболита (вещества) происходит активация или замедление синтеза определенного фермента. Эти процессы подчиняются генетическому контролю, благодаря чему клетка путем включения и исключения синтеза ферментов регулирует свою физиологическую активность соответственно с условиями окружающей среды.

Изменчивость в потребностях метаболитов. Под влиянием антибиотиков, дезинфицирующих и других химических веществ, ультрафиолетовых лучей, радиоактивных излучений и других воздействий у некоторых микробов псаляется потребность в определенных аминокислотах, факторах роста, в которых не нуждались исходные культуры.

Такие штаммы, или варианты, микроорганизмов, которые для своего развития нуждаются в специальных веществах, называются *ауксотрофами* в отличие от исходных штаммов *прототрофов*.

Ауксотрофы отличаются от прототрофов тем, что у них часть метаболических процессов блокирована и они лишены возможности синтезировать необходимые им метаболиты.

Так, например, после воздействия на кишечные палочки рода эшерихия гамма-лучей они начинают нуждаться для своего роста в гидролизате казеина или экстракте дрожжей, в то время как исходный штамм мог развиваться в минимальной среде, в которой отсутствовали аминокислоты и витамины.

Физические и химические факторы могут вызывать различные изменения способности синтеза важных метаболитов в бактериальных культурах. Эти изменения происходят под влиянием механизмов генетической информации.

7.5. СЕЛЕКЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ. СУЩНОСТЬ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Знание закономерностей модификационной и мутационной изменчивости позволяет проводить целенаправленную селекцию (отбор) особей из популяции бактерий с нужными свойствами с целью получения новых ценных для молочной промышленности штаммов микроорганизмов.

Селекцию микроорганизмов осуществляют несколькими путями: поиск и отбор полезных форм микроорганизмов из природных источников; адаптация микроорганизмов путем выращивания их при постепенно меняющихся условиях культивирования; повторное выделение чистых культур из производственных штаммов; отбор индуцированных мутантов; использование явлений трансформации, конъюгации и трансдукции для получения штаммов с новыми свойствами.

При селекции ценных производственных штаммов молочнокислых бактерий обращают внимание на высокую энергию кислотообразования, протеолитическую активность, способность накапливать ароматические вещества, учитывают также специфические свойства продукта, которые будут вырабатываться с использованием селекционированного штамма. Например, для кисломолочных продуктов и кисломолочного масла отбирают штаммы *Lac.lactis* и *Lac.cremoris*, обладающие высокой активностью кислотообразования, а также штаммы *Lac.diacetylactis* с интенсивным ароматообразованием. В закваски для творога отбирают штаммы мезофильных молочнокислых стрептококков, образующие густки, легко отделяющие сыворотку, а в закваски для сметаны, наоборот, селекционируют штаммы, образующие густки вязкой

консистенции без отделения сыворотки; в состав заквасок для сыров вводят штаммы молочнокислых бактерий, обладающие относительно высокой протосолитической активностью, и т.д.

Большие перспективы для биотехнологии, сельского хозяйства, медицины и биологии открываются в связи с разработкой и совершенствованием методов геной инженерии, которая является новым направлением в генетике.

Генная инженерия - это целенаправленное изменение генетических программ клеток для придания исходным клеткам новых свойств или создание принципиально новых форм организмов. Осуществляется это путем введения в клетку чужеродной генетической информации различными приемами.

При помощи геной инженерии стало возможным производить пересадку генов из одной клетки в другую, что позволяет в определенной мере управлять наследственностью путем замены одних генов другими. При этом доказана возможность передачи не только естественных генов живых существ, но и искусственно синтезированных.

В настоящее время вне организма синтезированы гены инсулина, гемоглобина, яичного альбумина, иммуноглобулина и других веществ, которые встраивают (имплантируют) в ДНК различных клеток, что обуславливает в них синтез соответствующих белков.

ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

8.1. ПОНЯТИЕ ОБ ИНФЕКЦИИ И ИНФЕКЦИОННОЙ БОЛЕЗНИ

Под понятием «инфекция» (от лат. *inficio* — заражать, загрязнять, вносить что-либо извне) подразумевают совокупность биологических процессов, развивающихся в организме человека или животного при внедрении и размножении в нем микроорганизмов, которые способны вызывать изменение его нормальных физиологических функций. Другими словами, под инфекцией понимают взаимодействие патогенных микроорганизмов с организмом человека или животного (макроорганизмом) в определенных условиях внешней среды, в результате которого может возникнуть патологический процесс - инфекционная болезнь.

Инфекционными называют болезни, возбудителями которых являются микроорганизмы.

Понятие «инфекция» неравнозначно понятию «инфекционная болезнь», так как инфекционная болезнь - это наиболее яркое проявление инфекционного процесса, устанавливаемое по определенным признакам болезни, т. е. симптомам. Нельзя также отождествлять понятие «инфекция» с возбудителем заболевания, так как это только один из факторов, обуславливающих нарушение внутренней среды организма, его болезненное состояние. Вне организма не может быть инфекционного процесса и инфекционного заболевания, так же как и без микроба не возникает этот процесс.

Явление инфекции отражает общебиологический закон симбиоза, возникший и сформировавшийся в процессе эволюции. В данном случае симбиотические взаимоотношения носят паразитический характер, так как симбионт - микроорганизм приносит вред своему сожителю - организму хозяина.

Микробы-паразиты, обладающие способностью вызывать заболевания, называются **патогенными**, а их способность вызывать заболевание - **патогенностью** (от греч. *pathos* — страдание и *geneo* - рождаю).

Однако, заболевания могут вызывать не только паразиты, в некоторых случаях этой способностью обладают и сапрофиты. Возбудитель ботулизма, по существу, является сапрофитом: он сохраняется в почве, но, попадая в макроорганизм и пищевые продукты, развивается в них и вырабатывает токсин, который вызывает тяжелое заболевание. Такой гнилостный микроорганизм, как вульгарный протей (*Proteus vulgaris*), при массовом размножении в кишечнике человека может также

оказывать патогенное действие.

Следовательно, патогенность, т.е. способность вызывать заболевание, более широкое понятие, чем паразитизм, а группа патогенных микробов более обширна, чем группа микробов-паразитов.

Возникновение инфекционных болезней, их течение и исход зависят не только от количества поступающего в макроорганизм возбудителя и его биологических свойств, но в решающей степени от устойчивости и сопротивляемости макроорганизма к заражению, т.е. от состояния его иммунитета.

8.2. РОЛЬ МИКРО- И МАКРООРГАНИЗМОВ В ИНФЕКЦИОННОМ ПРОЦЕССЕ

Патогенность характеризует видовые генетические особенности микроба, его взаимоотношения с определенным видом или видами других организмов. Это свойство микроорганизмов характеризуется выраженной специфичностью, т.е. способностью одного вида микробов вызывать определенные клинические и патоморфологические изменения.

В процессе эволюции взаимоотношений между видами ряд патогенных микробов приобрел способность вызывать болезни только у человека (антропонозы), у животных (зоонозы) или общие болезни для животных и человека (зооантропонозы).

Степень проявления патогенности, ее количественное и качественное значение проявляются по-разному: одни штаммы возбудителя вызывают гибель лабораторных животных при введении им 5-6 клеток, другие — при введении доз, содержащих сотни тысяч или миллионы клеток. Для характеристики степени патогенности и ее количественного выражения применяют термин «вирулентность». Под ним понимают способность возбудителя проникать и размножаться в макроорганизме, подавлять его защитные свойства, образовывать токсины и воздействовать ими на макроорганизм.

Вирулентность — это фенотипическое выражение патогенного генотипа, так же как и его другие свойства, например способность сбраживать углеводы, синтезировать аминокислоты, и т.д.

Вирулентность микроба не является стабильным признаком. Изменение вирулентности может носить временный характер или являться результатом наследственных мутационных процессов. Так, временное фенотипическое *снижение вирулентности* наблюдается у старых культур микробов, культур, выращенных при низких температурах, при изменении pH среды.

Повышение вирулентности микробов в искусственных условиях достигается с большим трудом, чем ее ослабление. Наилучшим методом для этого являются пассажи через организм чувствительных животных. Изменения вирулентности и патогенности можно получить с помощью

генетического обмена в бактериальной клетке в процессе трансформации, транскрипции и конъюгации.

Вирулентность как мера патогенности представляет собой совокупность болезнетворных свойств микроорганизмов. Эти особенности возбудителей объединяют в два понятия: агрессивность (инвазивность) и токсигенность, или токсичность. В инфекционном процессе эти свойства неразрывно связаны.

Под **агрессивностью** микроорганизмов понимают их способность проникать в естественных условиях заражения внутрь тканей и органов макроорганизма, жить и размножаться в них, противостоять и подавлять защитные приспособления организма человека или животного. Это свойство микробов называют также **инвазивностью**, или **инвазивностью**.

Агрессивность микробов обуславливается их биологическими особенностями, в частности, способностью образовывать капсулу, продуцировать различные вещества, например ферменты гиалуронидазу, фибринолизин, коллагеназу и др. Биологическое действие этих компонентов неодинаково. В одном случае они парализуют фагоцитоз и другие защитные функции организма, в другом — обеспечивают распространение возбудителя в органах и тканях.

Токсигенностью называют способность микроорганизмов продуцировать в процессе обмена веществ ядовитые продукты — токсины. Среди токсинов, вырабатываемых микроорганизмами, различают экзо- и эндотоксины.

Экзотоксины являются продуктами метаболизма микробов и выделяются за пределы клетки в окружающую среду. Экзотоксины представляют собой белки с высокой молекулярной массой. Так, в состав токсина возбудителя ботулизма входит 19 аминокислот, молекулярная масса его составляет 1×10^6 . Аминокислотный состав столбнячного токсина характеризуется высоким содержанием аспарагиновой кислоты, изолейцина и лизина.

Экзотоксины обладают высокой ядовитостью. Так, у столбнячного экзотоксина на 1 мг кристаллического токсина приходится 75 млн минимальных смертельных доз для белых мышей, а в 1 мг очищенного токсина возбудителя ботулизма содержится до 100 млн смертельных доз.

Действие экзотоксинов наблюдается через определенный инкубационный период (время от попадания токсина в организм до появления первых признаков болезни). Токсины поражают определенные ткани и органы, что обуславливает специфическую клиническую картину соответствующего заболевания. Токсин возбудителя столбняка поражает двигательные нейроны спинного мозга, дифтерийный токсин поражает мышцу сердца и надпочечники. Энтеротоксины патогенных стафилококков и стрептококков поражают кишечник и обуславливают

пищевые токсикозы у людей.

Экзотоксины, будучи белками, малоустойчивы к высокой температуре (термолабильны), они разрушаются при 60 °С в течение 20-60 мин.

Очень важным свойством экзотоксинов является потеря токсичности. При обработке токсинов формалином и некоторыми другими химическими веществами они теряют свои ядовитые свойства; но сохраняют способность при введении в макроорганизм стимулировать образование антитоксинов (антител). Такие обезвреженные препараты токсинов называют **анатоксинами**.

Экзотоксины иногда называют **истинными**, или **классическими, токсинами**.

Эндотоксины отличаются от экзотоксинов своей прочной связью с телом бактериальной клетки. Получение эндотоксинов возможно лишь при разрушении бактериальной клетки специальными методами.

Эндотоксины менее ядовиты, чем экзотоксины. Их действие не отличается специфичностью. Вне зависимости от того, из какого микроба получен эндотоксин, при введении в организм он вызывает более или менее однотипную картину патологического процесса. У животных после введения смертельных доз эндотоксинов почти без инкубационного периода развиваются слабость, одышка, расстройство со стороны кишечника (диарея). При введении небольших доз эндотоксина наблюдается повышение температуры тела, а в случае применения массивных доз – понижение ее. Гибель животного наступает в течение нескольких часов.

Большинство эндотоксинов не удается перевести в анатоксины. В химическом отношении эндотоксины являются сложными глицидо-липидо-полипептидными комплексами. В отличие от экзотоксинов эндотоксины термостабильны, т.е. устойчивы к высоким температурам.

В возникновении инфекционного процесса исключительно важное и даже решающее значение имеет **состояние макроорганизма**, его видовые и физиологические особенности и **условия внешней среды**, при которых макроорганизм взаимодействует с патогенными микробами.

Один из основных факторов, определяющих возможность проявления патогенного действия микроба, – это восприимчивость макроорганизма. Инфекция не может возникнуть, если патогенный микроб попадает в резистентный (устойчивый) организм. В этом случае микроб не находит необходимых условий для своего размножения и погибает под влиянием защитных сил организма.

Важное значение для возникновения инфекционного процесса имеют, так называемые, **входные ворота** (ворота инфекции), т.е. те органы и ткани, через которые микроб внедряется в макроорганизм, к

которым он адаптировался в процессе эволюции и находит в них наиболее благоприятные условия для своего размножения. Гонококк вызывает заболевание только в том случае, если он попадает на слизистую оболочку половых органов, возбудитель дизентерии – при попадании на слизистую толстого кишечника, возбудитель сибирской язвы – чаще при проникновении через кожу. Если же эти микроорганизмы попадают в организм через другие входные ворота, они, как правило, погибают, не вызывая инфекционного процесса.

В числе причин, ослабляющих организм и способствующих развитию инфекционного процесса, играют роль внешние и внутренние факторы: болезни, недостаточное питание, чрезмерное утомление, ряд физических факторов – охлаждение, перегревание, действие радиации, травмы, а также хроническое отравление химическими веществами и др.

8.3. СПОСОБЫ ПЕРЕДАЧИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ. ТЕЧЕНИЕ И РАСПРОСТРАНЕНИЕ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Источниками инфекции являются больные и переболевшие люди и животные, выделяющие болезнетворные микробы во внешнюю среду. Ворота инфекции могут являться кожа, слизистые оболочки, пищеварительный тракт, дыхательные пути, мочеполовой аппарат.

Различают два основных **способа передачи** возбудителей инфекционных болезней: путем прямого контакта с источником инфекции и путем непрямого контакта через посредников.

При непрямом контакте возбудитель может передаваться через пищу (корм) и воду (алиментарные инфекции), почву (почвенные инфекции), воздух (аэрогенные инфекции), насекомых-переносчиков (трансмиссивные инфекции), а также через зараженные предметы (подстилку и др.).

После проникновения возбудителя в макроорганизм признаки заболевания появляются не сразу, а через определенное время, которое называется **инкубационным (латентным) периодом**. Продолжительность инкубационного периода при различных болезнях неодинакова. Он может продолжаться несколько часов, дней, недель и даже месяцев.

После инкубационного периода наступает **продромальный период**, когда появляются первые симптомы заболевания – повышение температуры, угнетенное состояние, слабость и др. Он длится 2-3 сут, после чего наступает **период основных клинических симптомов** заболевания. В дальнейшем при восстановлении нормальных физиологических функций организма наступает **период выздоровления (реконвалесценции)**.

В некоторых случаях инфекция протекает без видимых признаков. Такие инфекции называют **бессимптомными, латентными, скрытыми**,

дремлющими или немыми.

По длительности течения различают *молниеносные, острые, подострые* и *хронические формы* инфекционного процесса. Молниеносные продолжают несколько часов, острые - несколько дней, подострые - несколько недель, хронические могут длиться месяцами и годами.

Инфекционные болезни могут проявляться в виде единичных спорадических случаев или поражать значительное количество людей и животных.

По степени и характеру распространения инфекционных болезней различают эндемии (у животных энзоотии), эпидемии (эпизоотии) и пандемии (панзоотии).

Эндемии (энзоотии) - сравнительно небольшие вспышки заболевания с характерным распространением, ограничивающимся определенным пунктом или хозяйством.

Эпидемией (эпизоотией) - называют довольно широкое распространение инфекционной болезни, охватывающее в определенный промежуток времени несколько населенных пунктов, область или даже страну.

Пандемии (панзоотии) - сильно распространяющиеся заразные болезни, поражающие людей или многие виды животных на громадном пространстве - страны и материка (грипп, яшур и др.).

8.4. ПОНЯТИЕ ОБ ИММУНИТЕТЕ

Иммунитет (от лат. *immunitas* - освобождение от дани, избавление от чего-либо) - это система защиты, т. е. совокупность факторов и механизмов, направленных на сохранение генетического постоянства внутренней среды макроорганизма. Для животных и человека генетически чужими являются все микробы и клетки другого организма, даже матери. С точки зрения инфекционной патологии иммунитет - это невосприимчивость организма к заражению патогенными микроорганизмами.

Наука, изучающая системы распознавания организмом генетически чужеродного фактора и разрабатывающая меры практического использования выявленных закономерностей, называется *иммунологией*.

Защитные факторы макроорганизма, направленные на охрану биологической индивидуальности, подразделяются на специфические (антитела) и неспецифические (факторы естественной резистентности).

У млекопитающих сформировалась специализированная *система лимфоидных элементов*, которую в настоящее время и называют *иммунной системой*, поскольку она обеспечивает строгую специфичность иммунного ответа.

Очень тесно связана с лимфоидной системой система фагоцитов

(лейкоцитов), которые считают неспецифическими факторами защиты.

Особенностями иммунной системы является то, что она генерализована (рассеяна) по всему организму, ее клетки постоянно циркулируют благодаря току крови, она способна продуцировать специфические молекулы-антитела, направленные конкретно против определенной мишени.

Основной функцией системы иммунитета является обеспечение генетически определенного постоянства внутренней среды организма, не допуская появления чужеродных или изменившихся собственных клеток.

8.5. СТРОЕНИЕ СИСТЕМЫ ИММУНИТЕТА

Иммунная система состоит из центральных и периферических органов. К центральным органам относят: тимус - вилочковую железу, находящуюся в грудной полости около сердца; костный мозг; у птиц - бурсу Фабрициуса - лимфоидный узелок, расположенный в стенке клоака.

К периферическим органам иммунной системы относят лимфатические узлы, селезенку, небные миндалины, кожу, лимфатические скопления под слизистой кишечника, гортани, бронхов, мочеполовых органов, в почках и коже.

Основными клетками, участвующими в формировании специфического иммунного ответа, являются лимфоциты. Различают две основные популяции: Т- и В-лимфоциты, которые получили свое название от органов, в которых происходит их окончательное созревание. Т-лимфоциты проходят этот процесс в тимусе, а В-лимфоциты - в бурсе Фабрициуса или в органах, ее заменяющих (костном мозге и др.). Третьим важным типом клеток, принимающих самое активное участие в формировании специфического иммунного ответа, являются макрофаги (моноциты).

Свое происхождение все эти клетки (так же как и все клетки белой крови) ведут от общей гемопоэтической (кроветворной) стволовой клетки, которая, дифференцируясь, определяет все их многообразие.

От общей стволовой клетки происходит лимфоидная стволовая клетка (ЛСК) - общий предшественник Т- и В-лимфоцитов. В зависимости от того, в каком центральном органе иммунной системы окажется эта клетка (ЛСК), в такой лимфоцит она и превращается.

Попавшая в тимус, ЛСК обрабатывается его гормонами и превращается сначала в предшественника Т-лимфоцита, а затем в зрелый Т-лимфоцит. Среди Т-лимфоцитов различают несколько основных субпопуляций: Т-хелперы (от англ. *helper* - помощник) - помогающие формированию иммунного ответа; Т-супрессоры (от англ. *supress* - подавлять) - подавляющие развитие иммунного ответа; Т-эффекторы, индуцирующие реакции гиперчувствительности замедленного типа и

обеспечивающие накопление клеток – киллеров (от англ. *killer* – убийца).

Если же лимфоцит попадает в бурсу Фабрициуса или органы, которые ее заменяют, то он превращается в предшественника В-клетки, а затем в зрелый В-лимфоцит. Основная функция В-лимфоцитов состоит в том, чтобы при наличии соответствующих сигналов превращаться в плазматическую клетку, которая вырабатывает специфические антитела.

8.6. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КЛЕТОК В ИММУННОМ ОТВЕТЕ

Чужеродная клетка (антиген), проникнув в макроорганизм, вначале подвергается фагоцитозу со стороны макрофага, который убивает ее и переваривает в своих фаголизосомах. Для того чтобы произошел акт фагоцитоза, чужеродная клетка-мишень должна быть адсорбирована (прикреплена) к мембране фагоцита, это происходит в основном за счет сил электростатического взаимодействия между поверхностями фагоцита и микроба-мишени.

В месте прикрепления (адсорбции) мембрана макрофага прогибается, формируется, так называемая, фагоцитарная чаша, края которой смыкаются, отделяются от поверхности мембраны, и таким образом, формируется фагосома, внутри которой заключена клетка-мишень. Этот механизм получил название *фагоцитоза*.

Образовавшаяся фагосома передвигается в глубь клетки фагоцита, где происходит ее слияние с лизосомами-пузырьками, наполненными различными пищеварительными (гидролитическими) ферментами. В результате формируется фаголизосома, где материал мишени подвергается ферментативному расщеплению.

Те вещества, которые остаются в фагосоме после переваривания, удаляются из цитоплазмы клетки. Мембрана фагосомы и внешняя мембрана фагоцита сливаются, в результате чего весь материал оказывается как бы вывернутым на внешнюю поверхность макрофага. Этот процесс получил название «презентации» (т.е. представления) антигена. Такие обработанные макрофагом компоненты мишени приобретают новые свойства, делающие их очень иммуногенными. Поэтому их называют *суперантигенами*. Они группируются на мембране макрофага в виде специфических образований, называемых *КЭП* (от англ. *cap* – шапочка).

Впоследствии с макрофагом соприкасаются лимфоциты (до 20 лимфоцитов вокруг одного макрофага). После определенного периода контакта лимфоцит отходит, а его место занимает другой. Считается, что таким образом лимфоциты получают от макрофага сигнал-команду для ускоренного роста и размножения. Благодаря этому в организме происходит накопление именно таких лимфоцитов, которые направлены против структур (антигенов), презентированных макрофагом на своей

поверхности, т.е. происходит накопление антигенспецифических лимфоцитов, обусловленное селекцией лимфоцитов с наиболее комплементарными рецепторами.

Для дальнейшей дифференциации В-лимфоциты должны получить сигнал-медиатор от Т-хелпера с такой же специфичностью (Т-хеллер контактировал с тем же суперантигеном).

После контакта с Т-хелпером В-лимфоцит дифференцируется в плазматическую клетку, которая и вырабатывает антитела определенной специфичности.

Плазматическая клетка продуцирует на протяжении своей жизни антитела только одной специфичности.

Имеется довольно много различных теорий, объясняющих процессы и сущность иммунного ответа. В настоящее время наиболее популярной теорией иммунитета является клонально-селекционная теория. Согласно ей в организме всегда существует определенная гетерогенность (разнообразие) лимфоидных клонов. К л о н – это популяция генетически однородных клеток, возникших от одного предшественника. Поэтому для любого вещества-антигена, имеющегося в природе (или даже не имеющегося, т.е. который будет еще когда-либо синтезирован в будущем), в организме найдутся более или менее комплементарные (подходящие по своей специфичности) клоны клеток.

Макрофаг с макромолекулярным комплексом презентированного суперантигена на мембране подает команду к размножению только таким более или менее подходящим клоном, которые могут фиксироваться на его мембране благодаря комплементарным рецепторам. Клоны, обладающие большей специфичностью к данному антигену, чаще с ним связываются и получают от макрофага сигналы к размножению, т.е. происходит селекция, отбор лимфоцитов с наиболее комплементарными рецепторами.

В связи с тем, что для реализации реакций иммунного ответа необходимо участие трех типов клеток (макрофаги, Т- и В-лимфоциты), эта теория иммунитета получила название *трехклеточной*.

8.7. СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ИММУНИТЕТА (АНТИТЕЛА)

Специфическую защиту в организме осуществляют антитела, т.е. особые, обладающие защитными свойствами гамма-глобулины, образующиеся в макроорганизме под влиянием антигенов.

Важнейшим свойством антител является их способность специфически реагировать с антигенами, вызвавшими их образование.

Антитела, возникающие под влиянием токсинов, называются *антитоксинами*. Они нейтрализуют ядовитые свойства токсинов. Реакция между этими антителами и антигенами (токсинами) называется

реакцией нейтрализации.

Антитела к растворимым антигенам называются **преципитинами**, а реакция между ними – **преципитацией**.

Антитела к микроорганизмам, эритроцитам и другим антигенам, имеющим корпускулярное (клеточное) строение, оказывают на них различное действие. Под влиянием антител может произойти склеивание антигенов. Такие антитела называют **агглютиницинами**, а вызывающую их реакцию – **реакцией агглютинации**. Если под действием антител происходит лизис (растворение) антигена, то такие антитела называются **лизинами**.

Антитела, активирующие фагоцитарную активность лейкоцитов, называются **опсонинами** и **тропинами**.

Специфические антитела появляются в крови, молозиве, молоке и тканевой жидкости животных и людей после перенесения ими инфекционной болезни, а также после иммунизации их живыми или убитыми бактериями, вирусами, токсинами и другими антигенными веществами.

Антитела, вырабатываемые в ответ на проникновение в лимфоидную систему микроорганизмов из желудочно-кишечного тракта и других открытых полостей, называют нормальными антителами. Наряду с другими факторами они обуславливают бактерицидную фазу молока, т. е. подавляют развитие в молоке микроорганизмов, попадающих из желудочно-кишечного тракта и других участков тела животного.

По химическому строению антитела представляют собой иммуноглобулины крови и тканевых жидкостей животных и человека. И м м у н о г л о б у л и н ы, или гамма-глобулины, – это класс структурно связанных белков, содержащих два вида парных полипептидных цепей: легкие (L) с низкой молекулярной массой, состоящие из двух цепей, и тяжелые (H) с высокой молекулярной массой, которые содержат четыре цепи, связанные дисульфидными связями.

На основании структурных и антигенных признаков тяжелых цепей иммуноглобулины разделяют на пять классов: IgG, IgM, IgA, IgE, IgD.

Основную массу антител в крови составляют IgG (70-80 %), иммуноглобулинов А содержится – 10-15 %, IgM – 5-10 %, IgE и IgD – 0,2-0,3 %. Биологические и иммунозащитные различия между классами иммуноглобулинов имеют большое практическое значение, так как ими определяется характер реакции антигена с антителом.

Антитела класса М отличаются способностью склеивать микробные и другие клетки. Иммуноглобулины класса G нейтрализуют токсины бактерий и вирусов, они способны осаждать растворенный антиген, но не участвуют в лизисе клеток.

Все классы иммуноглобулинов являются термолabileными

(чувствительными к воздействию высокой температуры) белками. Они денатурируют и утрачивают активность при нагревании до 70 °С. На их активность влияет также pH среды.

Иммунологические реакции макроорганизма на введение антигена характеризуются не только образованием иммуноглобулинов, но и возникновением состояния аллергии, т.е. повышенной чувствительности организма на повторное введение антигена. Вещества, вызывающие аллергию, называют аллергенами. Ими могут быть продукты жизнедеятельности микробов, различные белковые вещества животного и растительного происхождения.

8.8. АНТИГЕНЫ

Антигены (от греч. *anti* - против, *genos* - род, происхождение) - генетически чужеродные для организма сложные органические вещества, которые при введении в организм вызывают в нем образование антител и изменяют его иммунологическую реактивность.

Антигены характеризуются двумя основными свойствами: вызывают в организме образование антител (иммуногенность) и вступают во взаимодействие с соответствующими антителами (антигенная специфичность).

Антигенными свойствами обладают микробы и их токсины, яды растительного и животного происхождения, различные ферменты, нативные чужеродные белки (яичный белок, белки молока, кровь), различные клеточные элементы тканей и органов, смеси белков с липидами, полисахаридами и нуклеиновыми кислотами.

Антигены, содержащиеся в различных структурах бактериальных клеток, в продуктах жизнедеятельности, называют антигенами бактерий. Антигены, содержащиеся в вирусной частице и связанные с белком и полисахаридом вирусного капсида и суперкапсида, называют **антигенами вируса**.

У различных микроорганизмов имеются общие групповые и специфические (типовые) антигены. Общие антигены в отличие от типовых характеризуют видовые свойства микроорганизмов, а индивидуальные особенности отдельных штаммов микробов в пределах одного и того же вида обуславливаются типовыми антигенами.

У подвижных микроорганизмов имеются жгутиковые антигены (H-антигены), содержащиеся в жгутиках бактерий. H-антигены разрушаются фенолом, а также при температуре от 30 до 80 °С, т.е. они термолabileны.

Бактерии имеют также соматические O-антигены, которые локализованы в клеточной стенке. У грамотрицательных бактерий O-антигены высокотоксичны и рассматриваются как эндотоксины бактерий.

У капсулообразующих бактерий имеются капсульные антигены (К-антигены), состоящие из сложных полисахаридов.

Антигенными свойствами обладают также реснички бактерий.

8.9. БАРЬЕРНЫЕ ФУНКЦИИ ТКАНЕЙ И ФАКТОРЫ ЕСТЕСТВЕННОЙ ЗАЩИТЫ ОРГАНИЗМА

Средства защиты макроорганизмов от чужеродных воздействий, в том числе и от микроорганизмов, весьма разнообразны. Большинство из них являются неспецифическими, т.е. они одинаково эффективны в отношении любого патогенного микроорганизма. К факторам естественной резистентности относят: кожные покровы, слизистые оболочки, клетки и белки крови, лимфатические узлы, терморегулирующую и выделительную функции органов и систем макроорганизма.

Кожный покров является механическим препятствием для микроорганизмов. Кроме того, на коже содержатся вещества, губительно действующие на микробы (молочная, уксусная кислоты, жирные кислоты салных желез и др.).

Слизистые оболочки ротовой и носовой полостей, трахеи и бронхов, глаз, половых органов и желудочно-кишечного тракта также обладают защитными свойствами. В секретах слизистых оболочек содержатся ферменты, бактерицидные вещества, которые губительно действуют на микроорганизмы или препятствуют их размножению.

В **пищеварительном тракте** нет достаточно благоприятных условий для размножения микроорганизмов. Ферменты слюны, желудка, желчные кислоты и ферменты кишечника действуют бактерицидно на патогенную микрофлору, препятствуя ее размножению и заселению. В кишечнике в процессе эволюции сформировалась резидентная, нормальная микрофлора, которая также препятствует заселению кишечника патогенными микроорганизмами.

В случае проникновения микроорганизмов через кожный покров или слизистые оболочки на их пути возникает защитный барьер из бактерицидных веществ лимфы и крови, из клеток крови (лизозим, β-лизин, интерферон, фагоцитарные клетки и др.).

Весьма эффективным фактором защиты организма является **фагоцитоз** (от греч. *phago* - поедая, *cytes* - клетка), выражающийся в активном поглощении и переваривании клетками организма живых и убитых микробов, а также других генетически чужеродных частей. Существенную роль в неспецифической защите осуществляют такие **физиологические реакции организма**, как повышение температуры тела, выделение чужеродного фактора через кишечник, почки, кожные покровы. Повышенная температура тела для многих патогенных микроорганизмов является губительной, или же при такой температуре

интенсивность размножения их резко снижается. Выделение патогенных микроорганизмов с мочой и фекалиями уменьшает концентрацию возбудителя в организме.

Следовательно, неспецифические факторы защиты макроорганизма являются первым барьером на пути патогенного микроба и не все возбудители способны разрушить этот барьер. Если все-таки микроб проникает во внутреннюю среду организма, то включается множество реакций, обеспечивающих его специфическую защиту.

8.10. ВИДЫ (ФОРМЫ) ИММУНИТЕТА

По происхождению различают иммунитет врожденный (видовой) и приобретенный, а по направленности действия и биологической сущности - антивирусный, антибактериальный, антитоксический и антигрибковый.

Врожденный иммунитет - невосприимчивость организма одного вида к инфекционным заболеваниям, поражающим другие виды. Например, крупный рогатый скот не болеет сапом, а лошади не болеют ящуром, люди не заражаются вирусом чумы плотоядных.

Приобретенный иммунитет - это невосприимчивость (устойчивость) организма к инфекционным антигенам или их токсинам, приобретенная в течение жизни. Эта форма иммунитета в отличие от врожденного присуща конкретному макроорганизму и по наследству не передается. Приобретенный иммунитет подразделяют на естественный и искусственный.

Естественный иммунитет - это устойчивость к заражению, приобретенная конкретным животным или человеком в результате перенесения инфекционной болезни в естественной среде обитания. Такой иммунитет называют активным, так как макроорганизм в ответ на контакт с возбудителем вырабатывает антитела. Некоторые виды (человек, обезьяны, кролики и др.) передают через плаценту развивающемуся плоду готовые антитела, создавая у новорожденных естественный пассивный иммунитет.

Искусственный иммунитет - это устойчивость, созданная введением в организм животного убитого или ослабленного возбудителя или готовых защитных специфических антител. В соответствии с этим искусственный иммунитет может быть активным или пассивным.

Для создания искусственного активного иммунитета животным вводят ослабленные или убитые возбудители (вакцины) или обезвреженные токсины микроба (анатоксины).

Пассивный искусственный иммунитет создается за счет введения в организм животного сыворотки крови другого животного, содержащей антитела (сывороточный иммунитет), или же за счет поступления

защитных белков с молозивом матери (колостральный, молозивный иммунитет).

Все виды иммунитета следует рассматривать как понятия, и их деление условно, так как они взаимосвязаны между собой. Эта взаимосвязь обусловлена их биологической сущностью, направленной на поддержание генетического постоянства внутренней среды организма.

8.11. ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ УЧЕНИЯ ОБ ИММУНИТЕТЕ

Учение об иммунитете является не только теоретическим, но и сугубо практическим разделом биологии, медицины, ветеринарии. На основании серологических реакций, при помощи которых выявляют специфические антитела, строится диагностика инфекционных заболеваний. На основании иммунологических закономерностей разрабатываются средства специфической профилактики и терапии инфекционных заболеваний (вакцины и сыворотки). На основании этих закономерностей осуществляются переливание крови, трансплантация органов и тканей и многие другие лечебные и профилактические мероприятия.

Для диагностики бруцеллеза у дойных коров используют кольцевую реакцию агглютинации с молоком. Сущность ее состоит в том, что при наличии в молоке специфических антител (агглютининов) происходит склеивание окрашенного бруцеллезного антигена (убитых клеток возбудителя), образовавшийся агглютинат поднимается вместе со сливками вверх пробирки, образуя окрашенное кольцо (при обесцвечивании остальной части молока).

Антитела, содержащиеся в молозиве в больших количествах, поступаая в организм новорожденного, создают колостральный пассивный иммунитет, защищающий организм от кишечных и других инфекций.

Антитела молока являются одним из факторов, обуславливающих бактерицидную фазу молока, т.е. подавляют развитие микроорганизмов в молоке.

При маститах (воспалении молочной железы) резко увеличивается количество лейкоцитов в молоке, повышается их фагоцитарная активность, что используется при диагностике субклинических форм маститов и выявлении маститного молока.

Глава 9

МИКРООРГАНИЗМЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

К основным группам микроорганизмов, используемым при производстве молочных продуктов, относят молочнокислые, пропионовокислые бактерии, бифидобактерии, уксуснокислые бактерии и дрожжи. В созревании сыров со слизистой поверхностью участвует незакавочный пигментообразующий микроорганизм слизи *Vreivacterium lines*.

9.1. МОЛОЧНОКИСЛЫЕ БАКТЕРИИ

Это специфическая группа микроорганизмов, обуславливающих молочнокислое брожение, т. е. распад углеводов (сахаров) до молочной кислоты. Наряду с основным продуктом брожения - молочной кислотой - образуются побочные продукты: уксусная кислота, углекислый газ, ароматические вещества, этиловый спирт и др.

Первые научные исследования этих микроорганизмов были проведены Л. Пастером, результаты которых он опубликовал в 1857 г. С тех пор молочнокислые бактерии привлекают к себе пристальное внимание специалистов. На основе использования этих микроорганизмов создаются и развиваются крупные отрасли народного хозяйства.

В природе молочнокислые бактерии представлены в виде шаровидных (кокков) и палочковидных (лактобактерий) форм. Шаровидные молочнокислые бактерии называют молочнокислыми стрептококками, так как они относятся к семейству Streptococcaceae.

Молочнокислые стрептококки представлены тремя родами - *Lactococcus* (Lac.), *Leuconostoc* (Leu.) и *Streptococcus* (Str.).

9.1.1. Лактококки

Систематика. Род *Lactococcus* (от греч. *lacticus* - молочный) включает пять видов, типовым из которых является *Lactococcus lactis* (молочный лактококк). Он объединяет три подвида: *Lac. lactis* subspecies (subsp.) *lactis* (молочный лактококк - сокращенно Lac. *lactis*), *Lac. lactis* subsp. *cremoris* (сливочный лактококк - сокращенно Lac. *cremoris*) и *Lac. lactis* subsp. *hordniae* - сокращенно Lac. *hordniae*. В подвида *Lac. lactis* subsp. *lactis* отнесен ароматобразующий биологический вариант, который

называется *Lac. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*.

В прежних изданиях «Определителя бактерий» Берджи его называли *Str. diacetylactis*. Для удобства мы будем называть его сокращенно *Lac. diacetylactis*. В последнее время биовар *diacetylactis* предложено выделить в подвид молочного лактококка.

Остальные четыре вида, относящиеся к роду *Lactococcus*: *Lac. garvieae*, *Lac. piscium*, *Lac. plantarum*, *Lac. raffinolactis*, а также подвид *Lac. lactis* subsp. *hordniae* перенесены в род *Lactococcus* из других родов. Эти микроорганизмы изучены в молочной промышленности недостаточно и большого значения не имеют.

Представители вида *Lac. lactis* (за исключением подвида *Lac. lactis* subsp. *hordniae*) широко используются в молочной промышленности. Они очень схожи между собой, продуцируют неразличимые молочные дегидрогеназы, обладают общим ферментом β-фосфогалактазой и все идентичны по содержанию мол % Г+Ц (гуанин + цитозин) в ДНК (38,6), гомология ДНК/ДНК составляет не менее 50 %.

Лактококки являются в основном гомоферментативными микроорганизмами, исключение составляет биовар *diacetylactis*. Он образует ароматические вещества — диацетил — ацетонин, способен усваивать соли лимонной кислоты (цитраты) и в связи с этим относится к группе, так называемых, стрептококков цитроворусов. В эту группу также входят два основных представителя рода *Leuconostoc* — *Leu. cremoris* и *Leu. dextranicum*.

Морфология. Лактококки представляют собой сферические или овальные клетки размером 0,5—1,2 × 0,5-1,5 мкм, располагающиеся в виде коротких цепочек или попарно; неподвижны, спор и капсул не образуют, по Граму красятся положительно. В молодых культурах некоторые штаммы сливочного стрептококка образуют слизистую капсулу. Клетки *Lac. diacetylactis* несколько мельче, чем клетки *Lac. lactis* и *Lac. cremoris*. *Lac. cremoris* часто образует длинные цепочки (рис 18, 19).

Культуральные свойства. Лактококки являются факультативными анаэробами, т. е. растут не только в аэробных условиях, но и без доступа молекулярного кислорода. Однако, в присутствии кислорода у них не изменяется тип дыхания, так как не проявляется аэробное дыхание, а продолжается процесс брожения, т.е. анаэробного дегидроенирования. В связи с этим лактококки, как и все молочнокислые бактерии, можно отнести к категории аэротолерантных (воздухотерпимых) микроорганизмов.

По отношению к температуре лактококки являются мезофилами, их оптимальная температура роста 30 °С, развиваются при 10 °С, но не при 45 °С. Многие штаммы *Lac. lactis* имеют широкий диапазон температур роста — от 8 до 41 °С.

Имеются данные, что некоторые штаммы лактококков способны

расти при очень низких плюсовых температурах (до 3 °С).

По потребности в питательных веществах молочнокислые стрептококки, так же как и бактерии, относятся к наиболее сложным микроорганизмам. В качестве источника углерода они могут использовать моно- и дисахариды, органические кислоты.

На обычных питательных средах они не развиваются, а растут на средах с добавлением аминокислот, гидролизатов белков мяса, лактальбумина, казеина, различных видов муки. Большинство штаммов лактококков необходимы аминокислоты: аргинин, лейцин, изолейцин, гистидин, валин.

Лактококкам, как и большинству молочнокислых бактерий, необходимы витамины: рибофлавин (В₂), тиамин (В₁), пантотеновая (В₃), никотиновая (РР), фолиевая (Вс) кислоты, пиридоксин (В₆) и др. Этим объясняется положительное влияние на рост микроорганизмов добавок к питательным средам различных питательных экстрактов (кукурузы, моркови, картофеля), дрожжевого автолизата и других витаминсодержащих соединений. Рост лактококков стимулируют и некоторые пептиды, пурины (аденин, гуанин, гипоксантин), пиримидины (урацил, тимин), жирные кислоты (уксусная, олеиновая), а также лимонная кислота.

Лактококки, как и большинство молочнокислых бактерий, культивируют на обезжиренном стерильном молоке или на плотных и жидких искусственных питательных средах с использованием гидролизованного молока и других питательных веществ, получаемых из молока.

Гидролизованное молоко готовят следующим образом. Обычное или восстановленное обезжиренное молоко кипятят или стерилизуют при 121 °С 10-15 мин и охлаждают до 45 °С. Устанавливают рН 7,6-7,8. К 1 дм³ молока добавляют 0,5-1,0 г порошка панкреатина или 2-3 г поджелудочной железы, пропущенной несколько раз через мясорубку (порошок панкреатина предварительно разводят в небольшом количестве теплой воды). Затем к молоку добавляют 5 см³ хлороформа. Колбу закрывают корковой пробкой, тщательно перемешивают и выдерживают в термостате при 40 °С в течение 18-24 ч. В течение 2-3 ч молоко несколько раз перемешивают (пробку после встряхивания приоткрывают для удаления паров хлороформа). Через 18-24 ч колбу вынимают из термостата, гидролизованное молоко фильтруют через бумажный фильтр, разводят в 2 раза водой, устанавливают рН 7,0-7,2 и стерилизуют при 121 °С 15 мин.

Агар с гидролизованным молоком и мелом представляет собой гидролизованное молоко (основа), к которому добавляют 2 % агара и 2-3 % мела в виде тонкоизмельченного порошка. Среду стерилизуют при 121 °С 15 мин. Его используют для

количественного учета молочнокислых бактерий в молоке и молочных продуктах.

Для выделения чистых культур молочнокислых бактерий и для изучения их культуральных свойств используют агар с гидролизанным молоком (без мела).

Для получения стерильного обезжиренного молока его разливают в пробирки (1/3 часть их емкости) и затем стерилизуют при 121 °С в течение 10 мин. Молоко должно иметь кислотность 16-18 °Т.

При развитии лактококков в молоке они вызывают его свертывание, т. е. образование ровного, без обильного отделения сыворотки плотного сгустка, имеющего приятные кисло-молочные вкус и запах. Ароматобразующий лактококк образует сгусток, в котором можно обнаружить в небольшом количестве пузырьки углекислого газа.

При росте на гидролизованном молоке лактококки вызывают помутнение питательной среды.

На агаре с гидролизанным молоком и мелом они образуют мелкие (0,5-1 мм) каплевидные колонии с ровным краем и зонами просветления мела. Зоны просветления вокруг колоний обусловлены превращением (под действием молочной кислоты) нерастворимого углекислого кальция в растворимый лактат кальция. Колонии в толще питательной среды (глубинные колонии) имеют форму лодочки или зерна чечевицы (см. рис. 18, 19). *Lac. diacetylactis* на 3%-ном агаре может образовывать глубинные колонии в виде паучков или комочков ваты, напоминающие колонии молочнокислых палочек.

Лактококки растут в средах с низким значением рН - от 5,5 до 8,8, некоторые - при рН 2,9-3,2. Характерным свойством молочнокислых стрептококков и палочек является высокая спиртоустойчивость. Они могут развиваться на питательных средах, содержащих 15-18 % этилового спирта, реже - 24 %.

Биохимические свойства лактококков изучают по энергии кислотообразования, предельной кислотности, способности ферментировать соли лимонной кислоты, по качеству сгустка, возможной протеолитической активности бактерий и др.

Энергию (интенсивность) кислотообразования определяют по времени образования сгустка молока (кислотность около 58-60 °Т) при внесении 0,5 см³ молодой (12-20-часовой) культуры в 10 см³ стерильного обезжиренного молока и выращивании посевов при оптимальной температуре.

Кислотность молока, выраженную в градусах Тернера, определяют при титровании децинормальным раствором едкого натра с индикатором фенолфталеином. Для титрования берут 10 см³ молока, разбавленного 20 см³ воды (можно брать в 2 раза меньше). Объем щелочи (в см³,

последей на нейтрализацию кислоты, умножают на 10 (20) (т. е. производят перерасчет на 100 см³ молока) и получают таким образом кислотность молока в градусах Тернера (1°Т соответствует 9 мг молочной кислоты в 100 см³ молока).

Качество сгустка определяют тотчас после его образования. Лактококки образуют ровный, плотный, однородный кислотный сгусток; без отделения сыворотки; с кисловатым, приятным вкусом. Если сгусток стягивается с отделением сыворотки, то это дает основание предположить наличие в молоке сычужного фермента, выделяемого маммококками (*Enterococcus faecalis* var. *liquefaciens*) и микрококками. При этом образуется смешанный сычужно-кислотный сгусток. Чистый сычужный сгусток, который быстро полностью растворяется, образуют гнилостные бактерии.

Наличие в сгустке пузырьков газа (особенно, если их много) дает основание предположить загрязнение культуры бактериями группы кишечных палочек или дрожжами.

Протеолитическую активность молочнокислых бактерий изучают на масцептонном желатине, молоке, молочном агаре или определяют с помощью специальных биохимических исследований и судят о ней по общему количеству образовавшихся водорастворимых продуктов распада белка, образованию аммиака, сероводорода, индола, которые характеризуют глубокий распад белковых веществ.

Способность ображивать соли лимонной кислоты (цитраты) определяют посевом бактерий на плотную среду с цитратом кальция. Появление зон просветления вокруг колоний свидетельствует об образовании водорастворимых продуктов брожения при наличии фермента цитритазы.

Активность образования ароматических веществ устанавливают по количеству образовавшихся летучих соединений (методом возгонки) и четырехуглеродных соединений (диацетила и ацетона).

Лактококки обладают различной ферментативной активностью. Они ферментируют углеводы с образованием L (+)-молочной кислоты, но, как правило, без газа.

Lac. lactis является активным кислотообразователем. Его штаммы свертывают молоко за 4-7 ч, предельная кислотность достигает 120 °Т. Восстанавливает и свертывает лакмусовое молоко, не образует ацетона, разлагает аргинин с образованием аммиака. Не развивается в щелочной среде при рН 9,5. Заключительная рН в жидких средах с глюкозой составляет 4,0-4,5.

При культивировании на искусственных средах многие штаммы теряют способность к быстрой ферментации лактозы и к протеолизу молока. Эти утраченные свойства могут восстанавливаться при культивировании лактококков в молоке. *Lac. lactis* образует кислоту из



Рис. 18. *Lactococcus lactis*:
а — колонии (поверхностные — округлые, глубинные — в виде чечевички; б — клетки

галактозы, глюкозы, мальтозы и лактозы. Не ферментирует арабинозу, ксилозу, сахарозу, трегалозу, салицин, инулин, глицерол и сорбитол.

Многие штаммы продуцируют антибиотик низин, который является полипептидом с молекулярной массой 3500. Он подавляет большинство стрептококков (но не энтерококков), стафилококков, микрококков, некоторые виды бацилл, лактобактерий, клостридий, актиномицетов.

При этом в отношении грамотрицательных бактерий низин бактерицидным действием не обладает.

Lac. lactis применяют в многостаммовых заквасках совместно с *Lac. cremoris*, *Lac. diacetylactis* и видами рода *Leuconostoc*. В молочной промышленности его широко используют при производстве кисломолочных продуктов, кисломолочного масла, сыров.

Отдельные штаммы *Lac. lactis*, особенно при температуре около 30 °С, способны образовывать горечь и поэтому непригодны для использования в качестве бактериальных заквасок при производстве сыра.

Lac. cremoris в отличие от молочного лактококка не обрабатывает мальтозу и декстрин, не растет при температуре 39-40 °С. При пониженных температурах культивирования (15-20 °С) некоторые штаммы образуют значительное количество летучих кислот, восстанавливают и свертывают (иногда только частично) лакмусовое молоко. Имеются слизеобразующие штаммы, формирующие вязкие ступки молока. Их используют в заквасках для производства сметаны.

Кроме того, *Lac. cremoris* отличается от *Lac. lactis* неспособностью продуцировать аммиак из аргинина, отсутствием роста в бульоне с рН 9,2 и в бульоне, содержащем 4 % NaCl; неспособностью расти в молоке, содержащем 0,3 % метиленового синего.

Энергия кислотообразования у *Lac. cremoris* слабее, чем у *Lac. lactis*, и составляет 6-8 ч, а предельная кислотность — 110-115 °Т.

Отдельные штаммы синтезируют антибиотик диплококцин, представляющий собой растворимый в воде белок, устойчивый к высоким температурам в кислой среде. Антибиотик обладает антагонистической активностью по отношению к другим штаммам

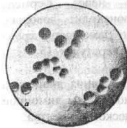


Рис. 19. *Lactococcus cremoris*:
а — колонии; б — клетки

Lac. cremoris и частично к золотистому стафилококку (*Staph. aureus*). Практического значения диплококцин не имеет.

Lac. cremoris используют преимущественно там, где необходимо добиться вязкой консистенции, умеренного кислотообразования. Он входит в состав заквасок для сметаны, творога, масла, сыров.

Lac. cremoris встречается в сыром молоке и молочных продуктах, но в небольших количествах.

Ароматобразующий лактококк *Lac. diacetylactis* продуцирует фермент цитриазу, которая расщепляет цитраты с образованием диоксида углерода (CO₂) и ароматических веществ — ацетона и диацетила.

Восстанавливает и свертывает лакмусовое молоко, устойчив к содержанию в среде 4 % NaCl, многие штаммы разлагают аргинин с выделением аммиака.

Lac. diacetylactis — сравнительно слабый кислотообразователь, имеет слабую энергию кислотообразования (более 16 ч), предельная кислотность в молоке достигает 70-100 °Т.

Ступок молока содержит пузырьки газа (CO₂). Образование диоксида углерода может быть необходимым или нежелательным. Для получения глазков во многих видах сыра образование CO₂ необходимо. С другой стороны, оно не должно быть настолько сильным, чтобы обуславливать пороки рисунка сыра. В кисломолочных напитках присутствие диоксида углерода в известной степени улучшает вкус (легкий пикантный привкус).

Нежелательно наличие диоксида углерода во всех ферментированных молочных продуктах, упакованных в газонепроницаемую упаковку.

Газообразование намного сильнее при использовании в качестве питательной среды цельного молока по сравнению с обезжиренным.

При развитии ароматобразующего лактококка ступок молока имеет специфический запах, обусловленный накоплением диацетила (собственно ароматического вещества), который имеет особое значение для ароматизации масла. Он также желателен как ароматизирующий компонент в сливках, пахте и различных сортах свежего сыра.

Ацетон (называемый также ацетилметилкарбинолом) не обладает выраженными ароматизирующими свойствами, но тесно связан с диацетилом.

Диацетил восстанавливается в ацетонин через фермент диацетилредуктазу. Эта необратимая реакция происходит довольно интенсивно и ведет к потере аромата. Ее можно замедлить, храня культуры или молочные продукты при низких температурах (5 °С и ниже).

Самым важным исходным веществом для образования диацетила является лимонная кислота; обогащением питательной среды лимонной кислотой можно стимулировать продукцию ароматического вещества.

В присутствии сбраживаемого углевода идет расщепление лимонной кислоты и ее солей с образованием ацетата, пировиноградной кислоты и диоксида углерода; пировиноградная кислота преобразуется в диацетил. Способствует образованию диацетила присутствие кислорода.

Оптимальной температурой ароматообразования для *Lac. diacetylactis* является 25 °С.

Образование диацетила у *Lac. diacetylactis* не стимулируется присутствием марганца. В связи с этим на ароматообразование не оказывают отрицательного влияния сезонные колебания содержания марганца в молоке (в отличие от лейконостоков). Сезонные колебания связаны с, так называемым, "весенним" молоком, в котором отмечается снижение содержания питательных и минеральных веществ.

Lac. diacetylactis в качестве заквасочного микроорганизма используют при производстве молочных продуктов, в которых желательна сильное кислото- и ароматообразование, например, для приготовления масла, творога, сметаны, простокваши и разных сортов свежего сыра.

5. Дифференцирующие признаки видов и подвидов рода *Lactococcus*

Показатель	Lac. garvieae	Lac. lactis				Lac. piscium	Lac. planartum	Lac. raffinolactis
		subsp. cremoris	subsp. hordniae	subsp. lactis	biovar diacetylactis			
Рост при 40°C	+	-	-	+	+	-	-	-
Рост в присутствии 4% NaCl	+	-	-	+	+	нд	+	-
Гидролиз аргинина	+	-	+	+	+	-	-	±
Образование кислоты из:								
Лактозы	+	+	-	+	+	+	+	±
Маннитола	+	-	-	±	±	+	+	±
Раффинозы	-	-	-	-	-	+	+	+

Обозначения: "+" – 80-90% или более штаммов положительные;
 "±" – 21-79% штаммов положительные;
 "±±" – 11-20% штаммов положительные;
 "-" – 90% или более штаммов отрицательные;
 "нд" – нет данных.

Негативное влияние при развитии ароматобразующего лактококка может проявляться тем, что в многоштаммовых заквасках при высоких температурах он подавляет развитие других видов из-за сильного образования диоксида углерода.

Дифференцирующие особенности других видов и подвидов рода *Lactococcus* представлены в табл. 5.

9.1.2. Лейконостоки

Систематика. Род *Leuconostoc* (от греч. *leucos* – белый, бесцветный; *nostoc* – водорослевое обобщенное название; *leuconostoc* – бесцветные слизистые растения) объединяет 9 видов: *Leu. mesenteroides*, *Leu. lactis*, *Leu. amelibiosum*, *Leu. carnosum*, *Leu. citreum*, *Leu. gelidium*, *Leu. oenos*, *Leu. paramesenteroides*, *Leu. pseudomesenteroides*.

В молочной промышленности имеет значение вид *Leu. mesenteroides*, он включает три подвида: *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum* (сокращенно – *Leu. dextranicum*); *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris* (*Leu. cremoris*) и *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (*Leu. mesenteroides*). Их дифференцирующие особенности приведены в табл. 6.

Морфология. Лейконостоки имеют сферические, несколько вытянутые клетки размером 0,5-0,7 х 0,7-1,2 мкм. Располагаются парами или цепочками. По Граму красятся положительно, неподвижные, спор не образуют (рис.20).

Leu. cremoris имеет клетки, которые обычно выстраиваются в длинные двойные цепочки.

У лейконостоков на морфологию клеток могут влиять условия выращивания микроорганизмов. При культивировании в молоке или на средах с добавлением молока большинство штаммов образуют коккоподобные клетки в коротких цепочках. При культивировании в бульоне клетки лейконостоков удлиняются и могут принимать вид палочек, проявляясь морфологически ближе к лактобактериям, чем к стрептококкам.

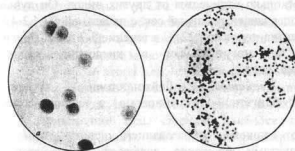


Рис. 20. *Leuconostoc mesenteroides*: а – круглые плотные колонии; б – кокковая форма, круглые клетки, окруженные слизью

Культуральные свойства. Лейконостоки являются факультативными анаэробами. Растут на специальных питательных средах. Оптимальная температура роста 20-30 °С, а минимальная составляет 5 °С.

По сравнению с лактококками лейконостоки более требовательны к составу питательных сред.

Молоко является бедной питательной средой для развития лейконостоков. Большинство штаммов растет в молоке при добавлении ростовых факторов, экстракта дрожжей и глюкозы.

Для всех видов лейконостоков необходимыми для их развития аминокислоты и комплексные факторы роста – никотиновая кислота + биотин и пантотеновая кислота или производные от этой кислоты; цианкобаламин (витамин В₁₂) и р-аминобензойная кислота не требуются. Для роста *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* необходимы глутаминовая кислота и валин, рибофлавин, пиридоксаль и фолиевая кислота. *Leu. dextranicum* в качестве фактора роста использует также твин-80.

Ростовый комплекс гуанин + аденин + ксантин + урацил необходим *Leu. cremoris*, *Leu. paramesenteroides* и *Leu. oenos*.

Лейконостоки на плотных средах образуют мелкие (до 1 мм в диаметре) гладкие круглые серовато-белые колонии (рис. 20); на средах, содержащих сахарозу, образуют мелкие слизистые колонии. При посеве лейконостоков уколом на плотную среду развиваются вдоль укола с небольшим поверхностным ростом. Бульонные культуры часто имеют однородное помутнение, но штаммы, образующие длинные цепочки, имеют тенденцию к образованию осадка.

Рост лейконостоков никогда не бывает быстрым. Наиболее активными являются штаммы *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, имеющие самое короткое время генерации. Его хороший рост может быть получен в течение 24-часовой инкубации при 30 °С. *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris* вырастает в течение 48 ч при температуре 22-30 °С. При культивировании медленно растущих штаммов к бульонным средам добавляют 0,05 % солинокислого чистенна. *Leu. oenos* несколько отличается от других видов. Он лучше растет в кислой среде, содержащей томатный сок, с начальной рН 4,2-4,8. Растет медленно, его культивируют при 22 °С в течение 5-7 дней. Другие виды лейконостоков не могут расти в кислых средах, предпочтительных для *Leu. oenos*.

Биохимические свойства. Лейконостоки являются хемоорганотрофами с облигатной потребностью в сброживаемом углеводе.

Они ферментируют глюкозу с образованием кислоты и обычно газа; основными продуктами брожения являются также этанол,

D(-)-изомер молочной кислоты и ароматические вещества – диацетил, ацетон и 2,3-бутилентгликоль.

Лейконостоки являются слабыми кислотообразователями, молоко часто не свертывается, протеолитической активностью не обладают, индол и аммиак не образуют, нитраты не восстанавливают. Конечную рН при росте в жидкой среде с глюкозой доводят до 4,4-5,0.

Leu. mesenteroides subsp. *dextranicum* является слабым кислотообразователем, свертывает молоко через 2-3 сут. Предельную кислотность доводит до 70-80 °Т.

Leu. mesenteroides subsp. *cremoris* медленно развивается в молоке и его не сквашивает, так как предельная кислотность достигает только 40-50 °Т.

Основную массу диоксида углерода лейконостоки вырабатывают из лимонной кислоты, поэтому добавление ее в молоко способствует образованию СО₂. Кроме того, бактерии рода *Leuconostoc* способны образовывать диоксид углерода посредством гетероферментативного расщепления молочного сахара.

Этиловый спирт лейконостоки образуют под действием ферментов фосфогексалазы. Некоторые штаммы имеют окислительный механизм метаболизма и вместо этилового спирта образуют уксусную кислоту.

Большинство видов лейконостоков усваивают цитраты, с образованием ароматических веществ – ацетона и диацетила, но это свойство может быть утрачено у штаммов, сохраняемых длительное время в лабораторных условиях.

Установлено стимулирующее воздействие марганца на рост и образование диацетила бактериями рода *Leuconostoc*.

Количество марганца в коровьем молоке зависит от времени года: весной его содержание составляет 8-20 мкг/л, летом и осенью – 25-85 мкг/л.

В связи с этим в масле, изготовленном с помощью заквасок, содержащих *Leuconostoc*, весной диацетила будет меньше, чем летом и осенью.

Образование диацетила и ацетона в заметных количествах наблюдается только у *Leu. cremoris* и *Leu. dextranicum*. Оптимальная температура ароматообразования составляет 18-20 °С. Оно происходит только при низком значении рН (меньше 6,0), т.е. при накоплении в большом количестве молочной кислоты.

С учетом этого *Leu. cremoris* и *Leu. dextranicum* с наибольшим эффектом ароматообразования используют в многостаммовых заквасках в сочетании с *Lac. lactis* или *Lac. cremoris* или обоими вместе.

Применение *Leu. cremoris* наиболее целесообразно там, где необходимо получить мягкий долговременный аромат, например, в производстве стойкого к хранению масла.

Leu. dextranicum вместе с другими ароматобразующими стрептококками чаще вводят в состав заквасок для сыров.

Лейкостокки обладают липолитической активностью. Они в состоянии расщеплять триглицериды, но прежде всего моно- и диглицериды, встречающиеся в молоке, сыре и масле после воздействия молочных и бактериальных липаз. Липолиз высвобождает жирные кислоты (масляную, капроновую, каприловую, каприновую, меристиновую, олеиновую) и их продукты распада, что может привести к порокам вкуса.

Многие штаммы *Leu. mesenteroides* образуют слизь из декстранов и сахарозы. Слизь интенсивнее образуется при 20-25 °С. Штаммы, не образующие слизи, не выдерживают нагревания в бульоне с глюкозой при 55 °С в течение 30 мин. Слизеобразующие штаммы сохраняют жизнеспособность в слизистых сахарных растворах, нагреваемых до 80-85 °С.

Лейкостокки распространены на растениях, в молочных и других пищевых продуктах. *Leu. citreum* и *Leu. pseudomesenteroides* выделены из организма человека.

6. Дифференцирующие признаки подвидов *Leu. mesenteroides*

Признак	Subsp. cremoris	Subsp. dextranicum	Subsp. mesenteroides
Лимонно-желтый пигмент	±	-	-
Образование кислоты из: L-арабинозы	-	-	+
Фруктозы	-	+	+
Мальтозы	±	+	+
Мелибиозы	±	+	+
Салицина	-	±	±
Сахарозы	-	+	+
Трегалозы	-	+	+
Образование декстрана из сахарозы	-	+	+
Гидролиз эскулина	-	±	±
Рост при pH 4,8	-	-	-
Рост при 37 °С	-	+	±

Обозначения: "+" — 90 % и более штаммов положительные;

"±" — 21-79 % штаммов положительные;

"±" — 11-20 % штаммов положительные;

"-" — 90 % и более штаммов отрицательные;

9.1.3. Термофильный стрептококк

Был выделен и описан Орла-Иенсенем в 1919 г.

Систематика. В род *Streptococcus* входит один вид молочнокислых кокков — *Streptococcus thermophilus* (термофильный стрептококк). Он образует в небольшом количестве ацетон, поэтому

занимает промежуточное положение между гомо- и гетероферментативными стрептококками. В связи с этим его относят к факультативным, или среднегетерогенным, гетероферментативным молочнокислым стрептококкам.

Морфология. *Str. thermophilus* представляет собой грамположительные шарообразные или эллипсоидные клетки диаметром 0,7-0,9 мкм, чаще располагающиеся длинными цепочками (рис. 21). По величине клетки крупнее, чем клетки молочного стрептококка. Термофильный стрептококк спор и капсул не образует, неподвижен.

Культуральные свойства. По отношению к кислороду *Str. thermophilus*, как и все молочнокислые бактерии, является факультативным анаэробом. Хорошо растет на обезжиренном и гидролизованном молоке, также на плотных средах, содержащих компоненты молока и ростовые факторы.

Более интенсивный рост термофильных стрептококков наблюдается при добавлении к питательным средам основных аминокислот — валина, лейцина, изолейцина, лизина, аргинина, метионина, гистидина и пролина. В жидких средах растет так же, как и лактококки.

На поверхности плотных питательных сред термофильный стрептококк образует очень мелкие колонии округлой формы с зернистой структурой и локонообразными краями, глубинные колонии имеют чечевицеобразную форму с боковыми выростами.

Характерным признаком *Str. thermophilus* является широкий диапазон температур роста — от 20 до 50 °С. Оптимальной является температура 37-40 °С, слабый рост наблюдается при 50 °С, температура 53 °С задерживает рост.

Имеется разновидность термофильного стрептококка (имевшая ранее название *Str. filant*), которая образует слизь и придает кисломуолочным продуктам особую кремоподобную вязкую консистенцию.

Биохимические свойства. *Str. thermophilus* по энергии кислотообразования превосходит все молочнокислые стрептококки, достигая уровня термофильных лактобактерий. Он сквашивает молоко через 3,5-6 ч, предельная кислотность составляет 110-115 °Т. Сквашивание молока происходит быстрее при добавлении к нему дрожжевого экстракта (0,3 %) и сахарозы (3 %). В этих условиях обнаруживают увеличение размера клеток в 2 раза и больше, чем при выращивании в обычном молоке.

Особенностью термофильного стрептококка является слабо-выраженная сахаролитическая активность. Его штаммы постоянно ферментируют только лактозу, глюкозу и сахарозу, иногда сбраживают

раффинозу и, как правило, не ферментируют маннит, инулин, глицерин, сорбит, салицин, рамнозу, трегалозу, декстрин и раффинозу (табл. 7).

Характерным свойством этого вида считаются способность сбраживать сахарозу и отсутствие ферментации мальтозы. Каталазу не образует. Некоторые штаммы образуют диацетил, в небольшом количестве синтезируют ацетонин, вследствие чего улучшается качество молочных продуктов. Многие культуры термофильных стрептококков образуют вязкие тягучие сгустки молока.

Str. thermophilus неустойчив к метиленовой сини, хлористому натрию и щелочной реакции среды (рН 9,6).

В жидкой среде, содержащей глюкозу и 4 % NaCl, термофильный стрептококк кислоту не образует, не развивается при наличии в среде 0,1 % метиленового голубого, не восстанавливает лакмусовое молоко, не растет на средах с концентрацией пенициллина 0,01 МЕ/см³ и стрептомицина 5 мкг/см³, поэтому его используют в качестве тест-культур при выявлении антибиотиков в молоке. Чувствителен к действию специфических бактериофагов.

Str. thermophilus обладает относительно высокой термоустойчивостью. Он выдерживает температуру 75 °С в течение 15 мин и 65 °С в течение 30 мин, вследствие чего составляет значительную часть остаточной микрофлоры в молоке после пастеризации.

Некоторые штаммы вызывают частичный гемолиз (растворение эритроцитов), при котором на агаре с кровью вокруг колоний термофильного стрептококка образуются зеленоватые зоны просветления (гемолиз типа α). Поэтому их иногда относят к группе «зеленящих стрептококков» (группа «viridans»).

Существуют нетипичные штаммы термофильного стрептококка, отличающиеся устойчивостью к неблагоприятным условиям, сбраживающие мальтозу и вызывающие β-гемолиз (прозрачные зоны растворения эритроцитов вокруг колоний), т.е. имеющие некоторую общность физиологических свойств с энтерококками (табл. 7). В связи с этим при их дифференциации учитывают, что штаммы энтерококков более устойчивы к неблагоприятным условиям. Они при температуре 10 °С размножаются на питательных средах, содержащих 40 % желчи, 6,5 % NaCl, 0,1 % метиленового голубого, имеющих рН 9,6. В отличие от *Str. thermophilus* энтерококки образуют аммиак из аргинина, ферментируют глицерин, маннит, сорбит, арабинозу, маннозу, декстрин, галактозу, мальтозу.

Штаммы термофильных стрептококков чаще выделяют из сырого молока, их в комбинации с болгарской палочкой используют в производстве ряженки, варенца, йогурта, мечниковской простокваши, а также кисломолочных напитков и творога ускоренной выработки, сыров

с высокой температурой второго нагревания. При этом *Str. thermophilus* начинает гликолиз и стимулирует рост *Lbm. bulgaricum*. Стимулирующим фактором является муравьиная кислота, которая образуется в достаточном количестве в микроаэрофильных условиях.

7. Дифференцирующие особенности типичных и нетипичных штаммов *Str. thermophilus* и энтерококков

Тесты	<i>Str. thermophilus</i>		Энтерококки
	штаммы типичные	штаммы нетипичные	
Лакмусовое молоко	ВС	ВС	ВС
Наличие роста в молоке при температуре:			
10 °С	-	±	+
45 °С	+	+	+
50 °С	+	+	-
Наличие роста в средах с NaCl:			
2 %	+	+	+
4 %	-	+	+
6,5 %	-	±	+
Наличие роста в гидролизованном молоке с желчью:			
10 %	-	+	+
40 %	-	+	+
Рост на средах с метиленовой синей (0,1 %)	-	+	+
Образование аммиака из аргинина	-	-	+
Ферментация углеводов:			
Глюкозы	+	+	+
Лактозы	+	+	+
Сахарозы	+	+	+
Галактозы	-	±	+
Рамнозы	-	±	+
Салицины	-	+	-
Глицерина	-	+	+
Сорбита	-	±	+
Арабинозы	-	±	+
Раффинозы	-	+	+
Мальтозы	-	±	+
Инулина	-	±	+
Ксилозы	-	-	+
Дульцита	-	-	-
Маннозы	-	+	+
Целлобиозы	-	+	+

Обозначения: «+» – тест положительный;

«-» – тест отрицательный;

«±» – реакция проявляется в большинстве случаев;

«+» – реакция отрицательная в большинстве случаев;

ВС – восстановление с последующим сквашиванием;

ВЧС – восстановление частичное и сквашивание.

9.1.4. Лактобактерии

Систематика. В связи с многочисленным количеством видов молочнокислых палочек (67) при их классификации и идентификации

выделенных штаммов в последнее время, кроме морфологических особенностей, культуральных свойств и ферментативной активности (фенотипические свойства), учитывают также генотипические особенности: содержание гуанина с цитозином (Г+Ц) в молекуле ДНК, выраженное в мольпроцентах, гомологию ДНК/ДНК различных штаммов и видов, состав и расположение аминокислот межпептидных связей в пептидогликане клеточной стенки (тип пептидогликана) и др.

Представители рода *Lactobacterium* имеют очень широкие пределы содержания гуанина с цитозином (Г+Ц) в молекуле ДНК, составляющие от 32 до 53 моль%, что является диапазоном в два раза большим, чем для обычного отдельного рода.

Наиболее распространенным типом пептидогликана у лактобактерий является тип лизин-Д-аспарагиновая кислота. Реже встречаются другие типы: лизин-аланин (*Lbm. confusus*, *Lbm. fructosus*, *Lbm. sanfrancisco*), лизин-аланин-серин (*Lbm. halotolerans*, *Lbm. viridescens*), орнитин-Д-аспарагиновая кислота (*Lbm. fermentum*) и др.

У некоторых видов лактобактерий имеют очень широкие пределы присутствовать мезо-диамино-пимелиновая кислота (*Lbm. scharpeae*, *Lbm. vitulinum*, *Lbm. yamanashiensis*, *Lbm. agilis*, *Lbm. maltaromicus*, *Lbm. plantarum*, *Lbm. divergens*, *Lbm. vaccinostercus*), что также учитывают при идентификации микроорганизмов.

Молочнокислые палочки (лактобактерии) относят к семейству *Lactobacteriaceae*, роду *Lactobacterium*, включающему три (по Орла-Иенсену) подрода: *Thermobacterium* (термобактерии), *Streptobacterium* (стрептобактерии) и *Betabacterium* (бетабактерии). В связи с тем, что молочнокислые палочки спор не образуют и поэтому не являются бациллами, их необходимо относить к роду *Lactobacterium*, но не к роду *Lactobacillus*, как часто пишут в специальной литературе.

Для рода *Lactobacterium* (*Lbm.*) типичным видом является *Lbm. delbrueckii* (Leichman, 1896; Bejerinck, 1901).

В «Определителе бактерий Берджи» 44 основных вида (описано еще 23 вида, таксономическое положение которых не установлено) рода лактобактерий распределены в три группы, соответствующие подродным определениям Орла-Иенсена. К **первой группе** в подрод *Thermobacterium* отнесены **облигатные гомоферментативные лактобактерии**, в подрод *Streptobacterium* вошла **вторая группа**, объединяющая **факультативные гетероферментативные лактобактерии**, **третья группа** молочнокислых палочек представлена **облигатными гетероферментативными лактобактериями**, отнесенными к подроду *Betabacterium*.

Такое деление является в определенной мере условным, так как многие, недавно описанные виды не подходят под характеристики свойств подродов по температуре роста, морфологии и другим

особенностям.

В **группу I** (табл. 8) вошли 15 видов гомоферментативных молочнокислых палочек, которые ферментируют углеводы исключительно до молочной кислоты. В подавляющем большинстве это термофилы, за исключением 4-х видов (*Lbm. farciminis*, *Lbm. amylophilum*, *Lbm. sharpeae*, *Lbm. yamanashiensis*), которые развиваются при 15 °C и не растут при 45 °C.

Эта группа объединяет всех классических представителей термобактерий и многие недавно описанные виды. Относительно гомологии ДНК/ДНК, то она содержит два основных комплекса близких видов.

Первый комплекс состоит из трех подвидов *Lbm. delbrueckii* (табл.8), которые прежде определялись как четыре самостоятельных вида: *Lbm. delbrueckii*, *Lbm. bulgaricum*, *Lbm. lactis* и *Lbm. leischmanii*. Было установлено, что эти виды обладают между собой гомологией ДНК/ДНК больше, чем на 80 %, и фенотипические различия их проявляются только при ферментировании углеводов. В связи с этим прежние виды этих лактобактерий были переведены в ранг подвидов.

Второй комплекс гомоферментативных термобактерий представлен *Lbm. acidophilum* и близко связанных с ним видов – *Lbm. gasseri*, *Lbm. crispatus* и *Lbm. helveticum*.

Во вторую группу (подрод *Streptobacterium*) отнесены 11 видов факультативных гетероферментативных лактобактерий (табл. 10), которые могут ферментировать углеводы до молочной кислоты или до молочной, уксусной и муравьиной кислот, этилового спирта и других продуктов.

Представители второй группы являются мезофилами, за исключением вида *Lbm. agilis*, а также подвида *Lbm. casei* subsp. *rhamnosus*, которые не растут при 15 °C и развиваются при 45 °C.

По гомологии ДНК среди стрептобактерий различают три основных комплекса видов или подвидов.

Первый комплекс, сформированный многими штаммами, обозначен как *Lbm. plantarum*. Внутри этого большого вида имеются штаммы, обладающие свойствами, атипичными для рода лактобактерий, например подвижностью и др.

Большинство вариантов *Lbm. plantarum* связано с типовым штаммом на уровне гомологии ДНК 80-100 %, четверть штаммов имеют гомологию ДНК на уровне 30-70 %, что указывает на существование дополнительных генотипов *Lbm. plantarum*.

Второй комплекс стрептобактерий сформирован тремя подвидами *Lbm. casei* (всего имеет 4 подвида): *Lbm. casei* subsp. *casei*, *Lbm. casei* subsp. *pseudoplantarum* и *Lbm. casei* subsp. *tolerans*. Они

образуют генотип на уровне гомологии ДНК 80-100 % по отношению друг к другу и 40 % гомологии к генотипу типового штамма.

Штаммы 4-го подвида *Lbm. casei* subsp. *rhamnosus* представляют отдельный генотип, который гомологичен только на 30-50 % со штаммами других подвидов. В связи с этим подвид *Lbm. casei* subsp. *rhamnosus* может быть выделен в самостоятельный вид.

Третий комплекс видов стрептобактерий состоит из *Lbm. sake*, *Lbm. curvatus* и *Lbm. bavaricus*. Первые два вида связаны на уровне гомологии ДНК/ДНК 50 %.

Lbm. bavaricus фенотипически отличается от первых двух видов. Большинство штаммов показывают 100%-ную гомологию ДНК/ДНК к *Lbm. sake*, несколько штаммов гомологичны с *Lbm. curvatus*. Это указывает на то, что вид *Lbm. bavaricus* состоит из двух генотипов, один из которых, включая типовый штамм, может рассматриваться как подвид *Lbm. sake*, другой – как подвид *Lbm. curvatus*.

Третья группа лактобактерий объединяет 18 видов облигатных гетероферментативных лактобактерий (табл. 12), которые ферментируют углеводы до молочной и уксусной кислот, этанола и CO_2 . По отношению к температуре они являются мезофилами, за исключением трех видов – *Lbm. fermentum*, *Lbm. reuteri*, иногда *Lbm. confusus*, которые растут при 45 °С и не культивируются при 15 °С.

В эту группу входят все облигатные гетероферментативные лактобактерии, отнесенные к подроду *Betabacterium*. Исключение составляет *Lbm. bifementans*, который ферментирует глюкозу гомоферментативно до L-молочной кислоты, но в зависимости от pH образует молочная кислота может расщепляться до уксусной кислоты, CO_2 и даже H_2 .

Большинство видов третьей группы имеют очень узкий диапазон Г+Ц в ДНК (40-46 моль%).

Однако, по отношению друг к другу они не показывают значительную гомологию ДНК/ДНК. Исключение составляют *Lbm. kefir* и *Lbm. buchneri*, имеющие гомологию ДНК/ДНК 40 %.

В третьей группе имеются виды лактобактерий, у которых характерный для лактобактерий тип пептидогликана лизин-Д-аспарагиновая кислота заменен на тип лизин-аланин или другие, типичные для представителей рода *Leuconostoc*. В связи с этим *Lbm. confusus* был первоначально ошибочно отнесен к роду *Leuconostoc*, чему способствовали также его коккоподобная форма и способность образовывать слизь.

Морфологические свойства. Лактобактерии представляют собой палочки размером 4-15 x 0,5-0,6 мкм, встречаются изогнутые и булавовидные формы (коринеформы), также короткие коккобактерии. Они, как правило, неподвижны, спор и капсул не образуют, по Граму



Рис. 21 Молочнокислые бактерии: а - *Lactobacterium bulgaricum*; б - *Lactobacterium casei*; а - *Lactobacterium acidophilum* и *Streptococcus thermophilus*: клетки, окруженные небольшим слоем слизи

красятся положительно. Подвижностью обладают два представителя второй группы (*Lbm. agilis*, *Lbm. curvatus*) и три вида термобактерий - *Lbm. ruminis*, *Lbm. salivarius* и *Lbm. jamanashiensis*. Все они являются перитрихами. Клетки стрептобактерий мельче, чем клетки термобактерий, часто располагаются в виде цепочек. Бетабактерии имеют наиболее мелкие и тонкие клетки (рис. 21-25).

Образование цепочек обусловлено тем, что деление клеток происходит только в одной плоскости, оно характерно для определенных видов и даже штаммов. Интенсивность образования цепочек зависит от фазы роста и pH среды. Ассиметричное развитие и деление клеток приводят к образованию цепочек, располагающихся по кругу.

Формирование инволюционных (измененных) форм клеток может наблюдаться при симбиотическом росте, например, в кефирных зернах; под воздействием высокой концентрации глицина, D-аминокислот или антибиотиков, активно действующих на клеточную стенку.

Особенности морфологии различных видов лактобактерий представлены в таблицах 8, 10, 12.

Культуральные свойства. Молочнокислые палочки являются факультативными анаэробами или микроаэрофилами, лучше растут при пониженном содержании кислорода или в атмосфере, содержащей 5-10 % CO_2 . Некоторые штаммы при выделении являются анаэробами. По отношению к температуре стрептобактерии и бетабактерии являются мезофилами, термобактерии - термофилами.

Лактобактерии относятся к хемоорганотрофам. На обычных средах они не растут, их выращивают на средах с молоком. При развитии в молоке вызывают образование однородного плотного сгустка с приятным кисло-молочным запахом и вкусом.

При росте молочнокислых бактерий в жидких средах (гидролизованное молоко) наблюдаются помутнение среды, осаждение

8. Дифференцирующие особенности биологических свойств облигатных гомоферментативных видов лактобактерий подрода *Thermobacterium* (группа I)

Виды и подвиды	Происхождение названия	Особенности биологических свойств	Содержание гуанина + цитозина в молекуле ДНК (моль %). Гомология ДНК/ДНК других видов	Кем выделен, когда, источник выделения
1	2	3	4	5
* <i>L. Lactobacterium</i> (<i>Lbm delbrueckii</i>) (Лактобактериум) (<i>L.</i> дельбруеки)	Назван по имени Delbruecki - немецкого бактериолога	Палочки с закругленными концами, 0,5-0,8 - 2,9 мкм. Образует D-изомер молочной кислоты. Факторы роста: пантотеновая кислота, ниацин, рибофлавин, фолиевая кислота, витамин В ₁₂ , тимидин	49-51	Leichmann, 1896; Beijerinck 1901; из растений
<i>la. Lbm. delbrueckii subsp. delbrueckii</i> (<i>L.</i> дельбруеки субспецис (подвид) дельбруеки)		Ферментирует углеводы при высоких температурах (40-53°C), большинство штаммов (до 89%) образует аммиак из аргинина	49-51	Leichmann, 1896; выделен из растительного материала
<i>la. Lbm. delbrueckii subsp. bulgaricum</i> (<i>L.</i> дельбруеки субспецис болгарicum)	<i>Bulgaricum</i> - болгарский	Обладает слабовыраженной сахаролитической активностью, ферментирует только лактозу, глюкозу, фруктозу. Не образует аммиак из аргинина	49-51	Orla-Jensen, 1919; из Йогурта и сыра
<i>lc. Lbm. delbrueckii subsp. lactis</i> (<i>L.</i> дельбруеки субспецис лактис)	<i>Lactis</i> - из молока (молочный)	Большинство штаммов (до 89%) образует аммиак из аргинина	49-51	Orla-Jensen, 1919; из молока, сыра, прессованных дрожжей и заквасочного сула
2. <i>Lbm. acidophilum</i> (<i>L.</i> ацидофилум)	<i>Acidophilum</i> - любящий кислоту (<i>acidus</i> - кислота; <i>philum</i> - любящий)	Палочки с закругленными концами, 0,6-0,9 - 1,5-6 мкм. Ферментирует крахмал, образует DL-изомеры молочной кислоты. Факторы роста: фолиевая кислота, ниацин, рибофлавин, пантотенат кальция	32-37; <i>Lbm.gasseri</i> , <i>Lbm. helveticum</i> , <i>Lbm. crispatus</i> (30-50%); <i>Lbm.amylovorum</i>	Моро, 1900; из кишечника, ротовой полости человека и животных, вагина
3. <i>Lbm. amylophilum</i> (<i>L.</i> амилофилум)	<i>Amylum</i> - крахмал, <i>philum</i> - любящий; <i>amylophilum</i> - любящий крахмал	Тонкие палочки, 0,5-0,7 - 2,3 мкм. Образует L-изомер молочной кислоты. Факторы роста: рибофлавин, пиридоксаль, пантотеновая кислота, ниацин, фолиевая кислота	44-46	Nakamura, Orowell, 1981; из забродивших зерновых фекалий свиней

1	2	3	4	5
4. <i>Lbm. amylovorum</i> (<i>L.</i> амиловорум)	<i>Amylum</i> - крахмал, <i>vorare</i> - уничтожать; <i>amylovorum</i> - разрушающий крахмал	Палочки, 1 - 3-5 мкм. Образует DL-изомеры молочной кислоты. Ферментирует крахмал. Факторы роста: ниацин, пантотеновая кислота, фолиевая кислота, рибофлавин	40-41	Nakamura, 1981; из забродивших зерновых фекалий крупного рогатого скота (КРС)
5. <i>Lbm. animalis</i> (<i>L.</i> анималис)	<i>Animalis</i> - от животного	Палочки с закругленными концами, 1,0-1,2 - 3-6 мкм. Образует L-изомер молочной кислоты	41-44; <i>Lbm.murinus</i>	Dent, Williams, -1982; из зубного налета и пищеварительного канала животных
6. <i>Lbm. crispatus</i> (<i>L.</i> криспатус)	<i>Crispatus</i> - изгибаться, закручиваться	Палочки прямые или слегка изогнутые (извитые), 0,8-1,6 - 2,3-11 мкм. Образует DL-изомеры молочной кислоты	35-38; <i>Lbm. acidophilum</i> , <i>Lbm. gasseri</i> , <i>Lbm. amylovorum</i>	Врюго, Atadame, 1953; из фекалий, вагины, пещного кармана человека; у шпылат - из зоба и слезной кишки
7. <i>Lbm. farcinis</i> (<i>L.</i> фарцинис)	<i>Farcimen</i> - колбаса, сосиска	Тонкие палочки, 0,6-0,8 - 2,6 мкм. Растет в присутствии 10% NaCl. Образует L(D)-изомеры молочной кислоты	34-36; <i>Lbm. alimentaris</i> 26-28%	Reuter, 1983; из сырых колбас (сосисок) и килего теста
8. <i>Lbm. gasseri</i> (<i>L.</i> газери)	По имени Gasser - французского бактериолога	Палочки с закругленными концами, 0,6-0,8 - 3-5 мкм. Ферментирует крахмал, образует DL-изомеры молочной кислоты	33-35; <i>Lbm acidophilum</i> , <i>Lbm. crispatus</i> , <i>Lbm. amylovorum</i>	Laue, Kandler, 1980; из ротовой полости человека; из кишечного тракта людей и животных
9. <i>Lbm. helveticum</i> (<i>L.</i> хельветикум)	<i>Helveticum</i> - швейцарский	Палочки одиночные или соединенные попарно, 4 - 0,5-0,6 мкм. Максимальная температура развития 50-52°C. Образует DL-изомеры молочной кислоты. Факторы роста: пантотенат кальция, ниацин, рибофлавин, пиридоксаль	37-40; <i>Lbm. acidophilum</i> 13-44%	Orla-Jensen, 1919; из кислого молока, сырных закусков, сыра эментальского и грийера (швейцарский сыр с запахом орехов)
10. <i>Lbm. jensenii</i> (<i>L.</i> йенсени)	Назван по имени Orla-Jensen - датского микробиолога	Палочки с закругленными концами, 0,6-0,8 - 2-4 мкм. Образует аммиак из аргинина и D-изомер молочной кислоты	35-37	Gasser, Mandel, Rogosa, 1970; из вагинальных выделений человека
11. <i>Lbm. ruminis</i> (<i>L.</i> руминис)	<i>Rumen</i> - рубец, из рубца	Палочки с закругленными концами, 0,6-0,8 - 2-4 мкм. иногда подвижны, перитрих; растет при сниженном давлении O ₂ образует L-изомер молочной кислоты. Фактор роста: цистин	44-47	Sharppe, Latham и др, 1973; из рубца рогатого скота (КРС), из нечистот

Глубинные колонии термобактерий могут быть темными, желтовато-бурыми, иногда с короткими отходящими нитями. В отличие от глубинных поверхностные колонии более крупные, доконообразные или зернистые. Глубинные колонии стрептобактерий имеют лодочкообразную форму, иногда с выростом. Слизистые колонии образует один вид — *Lbm. confusus*.

Температурные границы роста для термобактерий составляют 20-55 °С, для мезофилов — 15-38 °С. Оптимальной температурой развития для *Lbm. helveticum* является 40 °С, для *Lbm. delbrueckii* subsp. *bulgaricum*, *Lbm. delbrueckii* subsp. *lactis* — 40-45 °С, *Lbm. acidophilum* — 37-38 °С. Для *Lbm. helveticum* максимальной температурой развития является 50-52 °С. *Lbm. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* развивается и ферментирует углеводы при температурах 48-53 °С. Для мезофилов оптимальной является температура 30 °С. Виды *Lbm. curvatus* и *Lbm. sake*, относящиеся ко 2-й группе, могут размножаться при 2-4 °С.

Оптимальная pH составляет 5,5-6,2. Скорость роста снижается при нейтральной и слабощелочной реакции. Лактобактерии лучше растут в немного подкисленных средах с начальной pH 6,4. Рост прекращается при достижении pH 3,6-4,0.

Лактобактерии являются аукокстрофными организмами и поэтому чрезвычайно требовательны к питательным средам. Они адаптировались к комплексным органическим субстратам и им необходимо для своего развития не только углеводный источник, но также и нуклеотиды, аминокислоты и витамины. Наиболее часто для роста требуется рибофлавин, потребность в фолиевой кислоте, фосфате пиридоксала и р-аминобензойной кислоте разнообразна для различных видов. Биотин и витамин B₁₂ необходимы только для нескольких видов (см. табл. 8,10,12).

Многие ростовые вещества введены в широко используемую МРС-среду, предложенную Де Меном и другими соавторами в 1960 г.

В состав МРС-агара входят: пептон из казеина — 10,0 г; мясной экстракт — 10,0 г; дрожжевой экстракт — 5,0 г; глюкоза — 20,0 г; K₂HPO₄ — 5,0 г; диаммоний цитрат — 2,0 г; ацетат Na — 5,0 г; MgSO₄ × 7H₂O — 5,0 г; MnSO₄ × 4H₂O — 0,2 г; твин-80 — 1,0 г; агар — 15,0 г; дистиллированная вода — 1 000 см³. Устанавливают pH 6,2-6,4 и стерилизуют при температуре 121 °С в течение 15 мин.

Состав МРС-бульона — такой же, за исключением агара.

При выделении лактобактерий из различных источников успешно используют селективную ацетатную среду СЛ, предложенную Рогоза с соавторами в 1951 г. В ее состав входят: пептон из казеина — 10,0 г; K₂HPO₄ — 6,0 г; диаммоний цитрат — 2,0 г; MgSO₄ × 7H₂O — 0,5 г; MnSO₄ × 4H₂O — 0,2 г; FeSO₄ × 7H₂O — 0,04 г; твин-80 — 1,0 г; глюкоза — 20,0 г; ацетат Na × 3H₂O — 25,0 г; агар — 15,0 г. Агар растворяют отдельно на водяной бане в 500 см³ дистиллированной воды, все другие ингредиенты

10. Дифференцирующие особенности биологических свойств факультативных гетероферментативных видов лактобактерий подрода *Streptobacterium* (группа II)

Виды и подвиды	Происхождение названия	Особенности биологических свойств	Содержание гуанина + цитозина в молекуле ДНК (моль-%). Гомология ДНК/ДНК других видов	Кем выделен, когда, источник выделения
1	2	3	4	5
16. * <i>Lbm. agilis</i> (Л. агилис)	Агилис-подвижный, активный	Палочки с закругленными концами, 0,7-1,0 — 3-6 мкм. Подвижны, перитрих. Образует L-изомер молочной кислоты	43-44; <i>Lbm. plantarum</i> var. <i>mobilis</i>	Weiss, Schillinger и др., 1982; из городских нечистот
17. <i>Lbm. alimentaris</i> (Л. алиментарис)	Алиментарис-имеющий отношение к пище	Короткие тонкие палочки, 0,6-0,8 — 1,5-2,5 мкм. Образует L(D)-изомеры молочной кислоты. Развивается в средах, содержащих 10% NaCl	36-37; <i>Lbm. farcinimis</i>	Reuter, 1983; из маринованных рыбных продуктов, сырых колбас и кислого теста
18. <i>Lbm. bavaricus</i> (Л. аварикус)	Баварский	Палочки с закругленными концами, изогнутые в стационарной фазе роста, 0,8-1,0 — 2-7 мкм. Температурные пределы роста 2-37 °С. Образует L-изомер молочной кислоты	41-43; <i>Lbm. sake</i> , <i>Lbm. curvatus</i> 80-95%	Stetter, Stetter, 1980; из кислой капусты и капустных завесок
19. <i>Lbm. casei</i> (Л. казеи)	Casei — из сыра	Палочки, 0,7-1,1 — 2-4 мкм, концом прямоугольные, располагаются чаще в цепочках. Не растет при 45 °С, кроме подвида <i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> . Образует L-изомер молочной кислоты. Факторы роста: рибофлавин, фолиевая кислота, пантотенат кальция, ниацин, пиридоксаль	45-47;	Orla-Jensen, 1916; из молока, молочных продуктов, сыра, кислого теста, навоза КРС, силоса; кишечника, ротовой полости, вагина человека; из сточных вод (нечистот)
19a. <i>Lbm. casei</i> subsp. <i>casei</i> (Л. казеи субсп. casei (казеи))				Orla-Jensen, 1916;
19a. <i>Lbm. casei</i> subsp. <i>pseudoplantarium</i> (Л. казеи субсп. pseudoplantarium)	Pseudos — ложный, т.е. не является <i>L. plantarum</i>	Образует DL-изомеры молочной кислоты		Abo-Elnaga, Kandler, 1965
19c. <i>Lbm. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> (Л. казеи субсп. rhamnosus)	Rhamnosus — имеющий отношение к рамнозе	Хорошо растет при 15 и 45 °С, является только гомоферментативным видом		Hansen, 1968

1	2	3	4	5
19d. <i>Lbm. casei subsp. tolerans</i> (Л. казеи субспециес толеранс)	Tolerans - толерантный, выносливый	Выдерживает нагревание 72°С в течение 40 с, ферментирует очень узкий спектр углеводов: лактозу, глюкозу, галактозу, фруктозу		Abo-Elnaga, Kandler, 1965
20. <i>Lbm. coagulans</i> (Л. коагулянт)	Coagula - булава, клюшка, forma, formis - форма; coaguliformis - булавовидный	Короткие палочки, часто кокковидной и грушевидной формы, 0,8-1,1 - 1-3 мкм. Факторы роста: пантотеновая кислота, ниацин, рибофлавин, биотин, р-аминобензойная кислота	45	Abo-Elnaga, Kandler, 1965; из сычужка, навоза КРС, из воздуха коровника и сточных вод
20a. <i>Lbm. coagulans subsp. coaguliformis</i> (Л. коагулянт субспециес коагулянт)		Продуцирует D (L)-изомеры молочной кислоты. L-изомер образуется в количестве 15-20% от общей молочной кислоты		Abo-Elnaga, Kandler, 1965
20b. <i>Lbm. coagulans subsp. torquans</i> (Л. коагулянт субспециес торквен)	Torquans - изогнутый, искаженный	Продуцирует исключительно D-изомер молочной кислоты		Abo-Elnaga, Kandler, 1965
21. <i>Lbm. curvatus</i> (Л. курватус)	Curvate - лат. изогнутый, искривленный	Палочки, изогнутые в форме бобов, 0,7-0,9 - 1-2 мкм, встречаются в парах, коротких цепочках, образуют кольца из 4-склеток или располагаются в форме подковы. Иногда подвижны. Может расти при 2-4°С. Продуцирует DL-изомеры молочной кислоты.	42-44; Lbm. sake 40-50%	Troili-Peterson, 1903; из навоза КРС, молока, сычужка, готового теста, мясных продуктов
22. <i>Lbm. homohiochii</i> (Л. гомохохии)	Homos - гр. подобный, hiochi - японская рисовая водка (sake), homohiochi - подобный молочнокислым бактериям, но выделен из sake	Палочки с закругленными концами, 0,7-0,8 - 2-6 мкм. Не растет на МРС-булоне. Оптимум роста 30°С. Лаг-фаза 4-7 дней. Образует D- и L-изомеры молочной кислоты в равных количествах. Устойчив к 13-15%-ному этанолу, который стимулирует рост. Факторы роста: D-мевалоновая кислота	35-38; Lbm. sake 10% и более	Kitahara, Kaneko, Goto, 1957; из испорченной японской рисовой водки - sake.

1	2	3	4	5
23. <i>Lbm. maltaromicus</i> (Л. мальтаромикус)	Malle - высушенные перемолотые отруски ячменя, aroma - приятный запах, maltaromicus - продуцирующий солодолоподобный аромат	Тонкие палочки различной длины с тешицей к образованию нитей и длинных цепочек. Продуцирует L(+)-изомер молочной кислоты. Факторы роста: рибофлавин, фолиевая кислота	36	Miller, Morgan, Libbey, 1974; из производственных молочных образцов, обладающих солодовым привкусом
24. <i>Lbm. murinus</i> (Л. мурунус)	Murinus - от мышей	Палочки с закругленными концами, 0,8-1 - 2-4 мкм, часто в цепочках. Образует L-изомер молочной кислоты. Фактор роста: рибофлавин	43-44	Hemme, Raibaud и др., 1982; из кишечника мышей и крыс
25. <i>Lbm. plantarum</i> (Л. плантарум)	Planta - от растений	Палочки прямые, 0,9-1,2 - 3-8 мкм. Некоторые штаммы продуцируют нитрат, pH при этом сдвигается к 6,0 или выше. Образует D- и L-изомеры молочной кислоты. Факторы роста: пантотенат кальция, ниацин	44-46	Orla-Jensen, 1919; из молочных продуктов, сычужка, кислой капусты, соевых (маринованных) овощей, кислого теста, навоза КРС, сточных вод, ротовой полости, кишечника, испражнений человека
26. <i>Lbm. sake</i> (Л. sake)	Sake - японское рисовое вино (водка)	Палочки с закругленными концами, 0,6-0,8 x 2-3 мкм. Многие штаммы растут при 2-4°С. Продуцирует L и D изомеры молочной кислоты	42-44; Lbm. curvatus, Lbm. bavaricus 40-50%; Lbm. homohiochii	Katagiri, Kitahara, Fukami, 1934; из закваски sake, кислой капусты, мясных продуктов, готового теста

* Номера видов и подвидов приведены в соответствии с «Определителем бактерий» Берджи.

растворяют без нагревания в 500 см³ дистиллированной воды, доводят pH с помощью кристаллической уксусной кислоты до 5,4; добавляют этот раствор к расплавленному агару и кипятят в течение 5 мин. В дальнейшей стерилизации нет необходимости.

Биохимические свойства. Лактобактерии находятся на границе аэробного и анаэробного типов дыхания. Они обладают эффективным метаболизмом ферментации углеводов и аминокислот, который связан с субстратным фосфорилированием, т.е. ферментативным присоединением фосфата к органическому веществу. Вторым уровнем фосфорилиции является преобразование карбамидфосфата в CO₂ и NH₃. Заключительным этапом фосфорилирования является ферментация аргинина, наблюдаемая у большинства гетероферментативных лактобактерий. Однако, только некоторые виды, образующие аммиак из

аргинина, способны расти на аргинине как единственном источнике энергии.

В дополнение к субстратному уровню фосфорилиции энергия может быть получена при биологическом окислении органических веществ путем дегидрогенирования.

При гомоферментативном метаболизме 1 моль глюкозы преобразуется в 2 моля молочной кислоты, при гетероферментативном брожении образуется 1 моль CO_2 , 1 моль этилового спирта (или уксусной кислоты) и 1 моль молочной кислоты.

Активность ферментации гомо- и гетероферментативных лактобактерий отличается наличием или отсутствием ферментов альдозаз и фосфокетолаз. Гетероферментативные лактобактерии обладают фосфокетолазой, а гомоферментативные виды – альдозазами. В связи с этим гомоферментативные молочнокислые палочки не способны ферментировать пентозы, которые гетероферментативные лактобактерии расщепляют при помощи фосфокетолаз до молочной и уксусной кислот.

Стрептобактерии способны ферментировать пентозы гетероферментативно до молочной и уксусной кислот, в то время как глюкозы они метаболизируют гомоферментативно. Поэтому стрептобактерии относят к факультативным гетероферментативным лактобактериям.

Некоторые органические кислоты (лимонная, винная, яблочная) расщепляются стрептобактериями до CO_2 и молочной или уксусной кислот.

Отдельные аминокислоты (тирозин и глутаминовая кислота) декарбоксилируются лактобактериями, однако, продукты декарбоксилирования дальнейшему метаболизму не подвергаются.

В процессе ферментации углеводов образуется молочная кислота в форме L- или D-изомеров.

Изомеры молочной кислоты образуются различными путями метаболической ферментации в зависимости от того, обладает ли L- или D-конфигурацией специфический фермент - лактатдегидрогеназа, продуцирующий специфическую молочную кислоту. Лактатдегидрогеназы различных видов молочнокислых бактерий отличаются друг от друга электрофоретической (при электрофорезе) подвижностью и кинетическими свойствами. Ионы Mn^{2+} и некоторые другие вещества (фруктозо - 1,6 - дифосфат) оказывают на эти ферменты стимулирующее действие.

Многие лактобактерии обладают хорошо выраженными сахаролитическими свойствами (табл. 9,11,13). Кроме глюкозы и лактозы, многие гомо- и гетероферментативные виды (Lbm. plantarum, Lbm. brevis и др.) интенсивно используют пентозы, иногда даже

11. Ферментация углеводов факультативными гетероферментативными лактобактериями подгруппы Streptobacterium (группа II)

Виды	16. Lbm. acidis	17. Lbm. alimentis	18. Lbm. alimentis	19a. Lbm. casei sibir. casei	19b. Lbm. casei sibir. casei	20a. Lbm. casei sibir. casei	20b. Lbm. casei sibir. casei	21. Lbm. casei sibir. casei	22. Lbm. casei sibir. casei	23. Lbm. casei sibir. casei	24. Lbm. casei sibir. casei	25. Lbm. casei sibir. casei
Амигдалин	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Арабиноза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Целлюлоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Эскулин	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Фруктоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Галактоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Глюкоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Глюконат	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Лактоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Мальтоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Маннит	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Манноза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Мелеситоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Мелибиоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Раффиноза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Раиноза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Рибоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Салицин	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Сорбит	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Сахароза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Трегалоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ксилоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Обозначения: + - 99% или более штаммов положительны; ++ - 90% или более штаммов отрицательны; ++ - 11-89% штаммов положительны;

* - положительны со слабой реакцией; ** - реакция не установлена.

12. Дифференцирующие особенности биологических свойств облигатных гетероферментативных видов лактобактерий подрода *Betabacterium* (группа III)

Виды и подвиды	Пронскоязственные названия	Особенности биологических свойств	Содержание гуанина + цитозина в молекуле ДНК (моль %). Гомология ДНК/ДНК других видов	Кем выделен, когда, источник выделения
1	2	3	4	5
27. * <i>Lbm. bifementans</i> (Л.биферментанс)	Bis – дважды, fermentalis – заквасывающий; bifementans – дважды ферментирующий	Палочки с закругленными или коническими концами, 0,5-1 - 1,5-2 мкм. Образует DL-изомеры молочной кислоты. При pH больше 4,0 молочная кислота ферментируется до уксусной кислоты, этанола, CO ₂ и H ₂ O. Ферментирует лактаты и продуцирует свободный H ₂ . Не образует аммиак из аргинина.	45	Kandler, Schilling, Weiss, 1983; из испорченного эдамского сыра и новозеландского мягкого сыра гауда, где он образует нежелательные небольшие трещины
28. <i>Lbm. brevis</i> (Л. бревис)	Brevis – короткий	Палочки с закругленными концами, 0,7-1 - 2-4 мкм. Образует DL-изомеры молочной кислоты и аммиак из аргинина. Факторы роста: пантотенат кальция, ниацин, тиамин, фолиевая кислота.	44-47; <i>Lbm.hilgardii</i> , <i>Lbm.kefir</i> , <i>Lbm.confusus</i> <i>Lbm. collinoides</i>	Orla-Jensen, 1919; из молока, сыра, кислой капусты, кислого теста, силоса, навоза КРС, ротовой полости, кишечника, фекалий человека и крыс
29. <i>Lbm. buchneri</i> (Л. бухнери)	Назван именем Е. Buchner – германского бактериолога	Палочки с закругленными концами, 0,7-1 - 2-4 мкм. Ферментирует меллицтозу, образует DL-изомеры молочной кислоты и аммиак из аргинина.	44-46	Henneberg, 1903; из молока, сыра, растительного материала, подвергнутого брожению, ротовой полости человека
30. <i>Lbm. collinoides</i> (Л.коллиноидес)	Collins – бурный; холмистый; idus – форма; collinoides – бурной формы (колонины)	Палочки с закругленными концами, 0,6-0,8 - 3-5 мкм, часто образует длинные нити. Образует DL-изомеры молочной кислоты, а также аммиак из аргинина.	46	Carr, Davies, 1972; из сидра (слабоалкогольное вино, полученное брожением яблочного сока и насыщенное углекислым газом; содержит спирта 5-7 объемных %)
31. <i>Lbm. confusus</i> (Л. коифузус)	Confusus – перепутанный. Ссылка на действительную путаницу этого вида с <i>Leucopostoc</i>	Палочки, 0,8-1 - 1,5-3 мкм, часто удлиняются с одного конца. Образует DL-изомеры молочной кислоты, а также аммиак из аргинина. Из сахарозы продуцирует декстран.	45-47	Halzapfel, Kandler, 1969; из сахарного тростника, морковного сока, редко обнаруживается в сыром молоке, слюне, сточных водах

1	2	3	4	5
32. <i>Lbm. divergens</i> (Л.дивергенс)	Divergens – отклоняющийся (расходящийся) от нормы или стандарта	Палочки с закругленными концами, 0,5-0,7 - 1-1,5 мкм. Слабо продуцирует газ из-за недостатка фактора роста, который до сих пор не установлен, он содержится в пептоне сырых бобов и некоторых дрожжевых пастоных препаратах. Образует L-изомер молочной кислоты и аммиак из аргинина	33-35	Holzappel, Gerber, 1984; из вакуум упакованного, замороженного мяса
33. <i>Lbm. fermentum</i> (Л.ферментум)	Fermentum – фермент, закваска (дрожжи)	Палочки толстые, вариабельные, 0,5-0,9 мкм. Образует DL-изомеры молочной кислоты и аммиак из аргинина. Факторы роста: пантотенат кальция, ниацин, тиамин	52-54; <i>L. cellobiosum</i> до 9%, поэтому он рассматривается как биовар <i>L. fermentum</i>	Bejerling, 1901; из закваски (дрожжей), молочных продуктов, кислого теста, брожденного растительного материала, сточных вод, ротовой полости и фекалий человека
34. <i>Lbm. fructivivans</i> (Л.фруктививанс)	Fructus – плод; vivare – подавать; fructivivans – поедаящий плод (в значении фруктопоглощающий)	Палочки с закругленными концами, 0,5-0,8 - 1,5-4 мкм. Кислотолюбивый, оптимальная pH 5,0-5,5. При начальной pH выше 6,0 не растет. Образует D(L)-изомеры молочной кислоты и аммиак из аргинина. Факторы роста: при выделении из источника – линалоновая кислота, томатный сок, этанола	38-40	Charlton, Nelson, Werkman, 1934; из испорченного майонеза, уксусных консервов, из испорченной сале, десертного вина, аперитивов (франц. aperitif – напиток для возбуждения аппетита, обычно спиртный)
35. <i>Lbm. fructosus</i> (Л.фруктозус)	Fructosus – от фруктозы, имеющий отношение к фруктозе	Палочки, 0,5-0,8 - 2-4 мкм. Рост на МРС-бульоне улучшается, если глюкоза заменяется на фруктозу. Образует D(L)-изомеры молочной кислоты, не образует аммиак из аргинина	47	Kodama, 1956; выделен из цветков
36. <i>Lbm. halotolerans</i> (Л.галотолеранс)	Hals – соль; tolerans – выносливый (толерантный)	Палочки короткие, коккоподобные, с заостренными (сужающимися) концами, 0,5-0,7 - 1-3 мкм, иногда образуют цепочки. Хорошо растет в присутствии 12% NaCl и очень слабо при 14%. Образует DL-изомеры молочной кислоты и аммиак из аргинина	45	Kandler, Schilling, Weiss, 1983; из мясных продуктов

1	2	3	4	5
37. <i>Lbm. hilgardii</i> (Л.хильгардия)		Палочки с закругленными концами, 0,5-0,8 - 2-4 мкм, одиночные, в коротких цепочках, часто длинные нити. Первоначальная pH для роста и ферментации углеводов 4,5-5,5. Растет в присутствии 15-18% этанола. Образует DL-изомеры молочной кислоты и аммиак из аргинина	39-41; <i>L.brevis</i> , <i>L.reuteri</i>	Douglas, Gness, 1936; первоначально выделен из калифорнийских столовых вин, выделяется и из других вин
38. <i>Lbm. kandleri</i> (Л. кандлери)	Назван именем Кандлера немецкого биолога	Палочки неправильной формы, 0,7-0,8 - 1,5 мкм. Продуцирует слизь из сахарозы. Образует DL-изомеры молочной кислоты и аммиак из аргинина.	39	Holzappel, van Wyk, 1983; выделен из пустынного источника
39. <i>Lbm. kefir</i> (Л. кефир)	Кефир - казакское кислое молоко	Палочки с закругленными концами, 0,6-0,8 - 3,0-15 мкм. Образует DL-изомеры молочной кислоты и аммиак из аргинина.	41-42; <i>L.buchneri</i> (до 40%)	Kandler, Kunaath, 1983; из кефирных зерен и питьевого кефира
40. <i>Lbm. minor</i> (Л. минор)	Минор - меньше (меньший)	Палочки, 0,6-0,8 - 1,5-2 мкм, часто изогнутые с односторонним утолщением. Образует DL-изомеры молочной кислоты и аммиак из аргинина	44	Kandler, Schillinger, Weiss, 1983; выделен из отстоя молочных машин
41. <i>Lbm. reuteri</i> (Л. реутери)	Назван именем Реутера немецкого биолога	Палочки 0,7-1 - 2-5 мкм, одиночные. Образует DL-изомеры молочной кислоты и аммиак из аргинина.	40-42,3; <i>Lbm.fermentum</i>	Kandler, Stetter, Koh, 1982; из фекалий людей и животных, из мясных продуктов
42. <i>Lbm. sanfrancisco</i> (Л. санфранциско)	От названия города Сан-Франциско, где впервые выделен этот вид	Палочки с закругленными концами, 0,6-0,8 мкм. В МРС-бульоне растет при добавлении свежего прожаренного экстракта с pH 5,6. Образует DL-изомеры молочной кислоты, аммиак из аргинина ие образует. Факторы роста: пептид, выделенный из прожаренного экстракта, оказывает ростостимулирующий эффект.	36-38	Weiss, Schilliger, 1984; из сырого теста
43. <i>Lbm. vacuostercus</i> (Л. вакциностеркус)	<i>Vaccinus</i> - от коров; <i>stercus</i> - навоз; <i>vacuostercus</i> - из коровьего навоза	Палочки с закругленными концами, 0,9-1,0 - 1,5-2,5 мкм. Температурный оптимум 37°C. Образует DL-изомеры молочной кислоты и аммиак из аргинина. Факторы роста: тиамин, пантотеновая кислота, ниацин, биотин	36	Okada, Suzuki, Kozaki, 1983; из коровьего навоза
44. <i>Lbm. viridescens</i> (Л. виридесценс)	<i>Viridescens</i> - растущий зеленым, зеленеющий	Мелкие палочки, 0,7-0,9 - 2,5 мкм, с закругленными утолщенными (коническими) концами. Не продуцирует аммиак из аргинина. Образует DL-изомеры молочной кислоты. Факторы роста: пантотенат кальция, ниацин, тиамин, рибофлавин, биотин. Стимуляторы - фолиевая кислота, пиридоксаль	41-44	Niven, Evans, 1957; из консервированных мясных продуктов, изменивших цвет, и пастеризованного молока

* Номера видов и подвидов приведены в соответствии с «Определителем бактерий» Берджи.

13. Ферментация углеводов облигатными геотермофильными лактобактериями подрода *Vetabacterium* (группа III)

Виды	Клеиота	Перглота	Схарота	Сорбит	Салтин	Риота	Ранота	Рифнота	Мелнота	Келсшота	Маннота	Мантин	Малтота	Лактоа	Глюкоа	Галактоа	Фруктоа	Суккин	Целлоноза	Арабиноза	Амгладин	
27. <i>Lbm. bifermians</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28. <i>Lbm. brevis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
29. <i>Lbm. buchneri</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30. <i>Lbm. collinoides</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
31. <i>Lbm. confusus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32. <i>Lbm. divergens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33. <i>Lbm. fermentum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
34. <i>Lbm. fructosus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35. <i>Lbm. fructosus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
36. <i>Lbm. halotolerans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37. <i>Lbm. hilgardii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
38. <i>Lbm. kandleri</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
39. <i>Lbm. kefir</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40. <i>Lbm. minor</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
41. <i>Lbm. reuteri</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42. <i>Lbm. sanfrancisco</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
43. <i>Lbm. vacuostercus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
44. <i>Lbm. viridescens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Обозначения: «+» - 90% или более штаммов положительных; «-» - 90% или более штаммов отрицательных; «±» - 11-89% штаммов положительных; «+» - положительные со слабой реакцией; «о» - реакция не установлена.

активнее, чем глюкозу (метаболизм броидильного типа).

Гетероферментативные молочнокислые бактерии ферментируют фруктозу, поскольку у них имеется фермент маннитдегидрогеназа, осуществляющий восстановление фруктозы до маннита. Продуктами сбраживания фруктозы также являются лактаты, ацетаты и углекислый газ.

Лактобактерии обладают слабой протеолитической активностью и поэтому не растут в субстратах, где единственным источником азота является белок, т.е. где отсутствуют различные аминокислоты.

В то же время имеются молочнокислые бактерии, которые могут расщеплять белки. Протеолитически активные штаммы подбирают для составления сырных заквасок.

Молочнокислые бактерии не восстанавливают нитраты в нитриты, не образуют пигментов, некоторые виды продуцируют каталазу, разлагающую перексид водорода (H_2O_2).

В молочной промышленности используют ограниченное число видов молочнокислых палочек.

Среди термобактерий в качестве заквасочных микроорганизмов чаще применяют *Lbm. helveticum* (швейцарская палочка), *Lbm. delbrueckii subsp. bulgaricum* (болгарская палочка), *Lbm. acidophilum* (ацидофильная палочка), *Lbm. delbrueckii subsp. lactis* (молочная палочка).

Термофильные молочнокислые палочки являются активными кислотообразователями, они сквашивают молоко через 4-5 ч, предельная кислотность достигает 200-350 °Т.

Lbm. helveticum является самым активным кислотообразователем, предельная кислотность при его развитии достигает 350 °Т. Эта палочка может сбраживать, кроме лактозы, глюкозы, галактозы, фруктозу, маннозу, ксилитозу, мальтозу и декстрин, не сбраживает сахарозу, раффинозу, салицин. Некоторые штаммы развиваются в субстратах, содержащих до 5% поваренной соли.

Штаммы *Lbm. helveticum* можно выделить из сычуга телят или кислого сырого молока. Микроорганизмы используют в составе заквасок для твердых сыров с высокой температурой второго нагревания.

Lbm. delbrueckii subsp. bulgaricum (рис. 21) доводит предельную кислотность молока до 200-300 °Т. Штаммы



Рис. 22. *Lactobacterium helveticum*: а – колония с локоновидно-разветвленным краем; б – длинные палочки

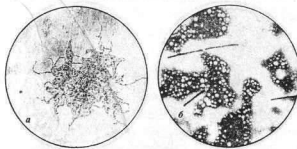


Рис. 23. *Lactobacterium acidophilum*: а – поверхностная колония; б – длинные палочки, сгустки казеина, ацидофильное молоко

болгарской палочки образуют ацетальдегид – ароматическое вещество, придающее вкус, запах, подав-

ляющее нежелательную микрофлору кишечника. Болгарская палочка чувствительна ко многим антибиотикам, устойчива к бактериофагу.

Ее штаммы выделяют, как правило, из сырого молока. Применяют в составе заквасок для производства простокваши мечниковской, южной, йогурта, рженки и др.

Lbm. acidophilum является кишечным микробом, который можно выделить из содержимого пищеварительного тракта человека и различных животных. Ацидофильная палочка способна после культивирования в молоке вновь приживаться в кишечнике человека и подавлять там развитие патогенных и нежелательных микроорганизмов (сальмонеллы, шигеллы, стафилококки, эшерихии и др.). Антагонистическое действие *Lbm. acidophilum* обусловлено продуцируемыми антибиотиками – ацидофилином и лактоцидином.

Ацидофильные бактерии устойчивы к щелочной реакции (рН 8,3), наличию в среде фенола (0,25-0,4 %), желчи (20 %), NaCl (2 %). Предельная кислотность ацидофильной палочки достигает 200-250 °Т. *Lbm. acidophilum* ферментирует сахарозу, мальтозу, салицин, часто раффинозу, декстрин. Имеются слизеобразующие штаммы ацидофильной палочки.

Lbm. delbrueckii subsp. lactis по своим свойствам и поведению в закваске проявляет большое сходство с болгарской палочкой. Она сбраживает глюкозу, лактозу, мальтозу, сахарозу, галактозу, декстрин и салицин. Предельная кислотность молока, сквашенного молочной палочкой, достигает 120-180 °Т, используется в сыроделии.

Сахаролитические свойства термобактерий представлены в табл. 9. **Стрептобактерии** обладают менее выраженной кислотообразующей способностью. Они ферментируют молоко через 2-3 сут, предельная кислотность составляет 180 °Т.

Для молочной промышленности имеют значение стрептобактерии *Lbm. plantarum* и *Lbm. casei subsp. rhamnosus*. Они способны усваивать, кроме лактозы, также соли молочной кислоты (лактаты), растут в гидролизованном молоке, содержащем 6 % NaCl и 20 % желчи, восстанавливают и свертывают лакмусовое молоко и не образуют аммиак

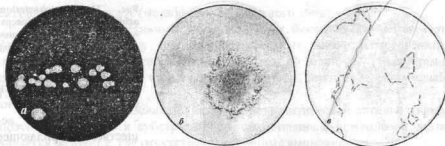


Рис. 24. *Lactobacterium plantarum*: а – маленькие, гладкие, блестящие колонии; б – шероховатые колонии с разветленным краем; в – короткие палочки, располагающиеся цепочками

из аргинина. Обладают высокой протеолитической активностью (в 2 раза выше, чем у мезофильных молочнокислых стрептококков), содержание свободных аминокислот в молоке повышают с 10 до 60 мг%. *Lbm. casei* subsp. *rhamnosum* в отличие от *Lbm. plantarum* образует CO_2 из цитрата натрия.

Lbm. plantarum продуцирует антибиотик лактолин, действующий угнетающе на кишечную микрофлору и маслянокислые бактерии.

Стрептобактерии обладают хорошо выраженными сахаролитическими свойствами (табл. 11). Они довольно активно ферментируют лактозу, фруктозу, галактозу, маннит, маннозу, рибозу, салицин, эскулин и др. Глюкозу сбраживают без образования газа.

Новые штаммы *Lbm. plantarum* и *Lbm. casei* subsp. *rhamnosum* можно выделить из сырого молока, сыра, с поверхности оборудования для производства сыра, коровьего навоза, силоса и др.

Стрептобактерии играют положительную роль при созревании многих сыров, так как они могут размножаться в них после ферментирования лактозы и при содержании поваренной соли в концентрации до 6%. Некоторые штаммы *Lbm. plantarum* вызывают образование ржавых пятен на поверхности сыров.

Бетабактерии характеризуются слабой энергией кислотообразования и молоко не сквашивают. При добавлении дрожжевого автолизата к молоку размножение бетабактерий ускоряется и предельная кислотность может достигнуть 150-160°Т.

Бетабактерии в молоке образуют незначительное количество летучих кислот, углекислый газ, этиловый спирт, молочную кислоту. Ферментируют глюкозу с образованием кислоты и газа, мальтозу, рибозу, фруктозу и др. (табл. 13). Большинство видов образуют аммиак из аргинина. Исключение составляют четыре вида – *Lbm. bifementans*, *Lbm. fructosus*, *Lbm. sanfrancisco*, *Lbm. viridenscens*, которые аммиак не продуцируют. Бетабактерии не свертывают лакмусовое молоко и лишь

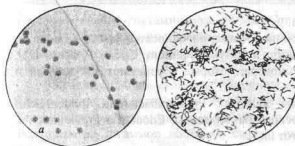


Рис. 25. *Lactobacterium brevis*: а – круглые колонии со слегка зазубренным краем; б – короткие палочки

частично его восстанавливают (порозовение). Имеют очень слабую терморезистентность, могут развиваться в

среде, содержащей 4% NaCl.

Гетероферментативные бетабактерии участвуют в созревании твердых сыров с низкой температурой второго нагревания, способствуют образованию рисунка и формированию запаха сыра. Некоторые штаммы могут обуславливать раннее вспучивание сыра вследствие их способности к газообразованию.

Биологические свойства других бетабактерий, а также их дифференцирующие особенности представлены в табл. 12, 13.

Лактобактерии широко распространены в окружающей среде. Их часто обнаруживают в молочных, хлебных, мясных и рыбных продуктах, в воде, сточных водах, пиве, вине, фруктах и фруктовых соках, соленых овощах, силосе, кислом тесте и сусле. Они находятся в ротовой полости, кишечнике, на слизистых мочеполового тракта людей и животных.

9.2 ПРОПИОНОВОКИСЛЫЕ БАКТЕРИИ

Являются возбудителями пропионовокислого брожения, при котором углеводы ферментируются с образованием главных продуктов брожения – пропионовой кислоты и ее солей – пропионатов.

Пропионовокислые бактерии относят к семейству Propionibacteriaceae, роду Propionibacterium, который включает две основные группы микроорганизмов, выделенных из различных естественных сред обитания.

Виды, выделенные из сыра и молочных продуктов, отнесены к «классическим пропионабактериям», или «молочным пропионабактериям». Они были найдены и в других естественных ферментациях, например силосе, в забродивших (ферментирующих) маслах, выделены также из почвы.

Вторую группу составляют виды, обнаруженные на человеческой коже или встречающиеся в других местах, например кишечнике. Они выделены также из угрей, поэтому их называют «группой акнес (угрей)» или «кожными пропионабактериями». Угрями называют воспаление сальных желез кожи.

В первую группу включены 4 вида: *P. freudenreichii*, *P. jensenii*,

P. thoenii и *P. acidipropionici*.

К группе кожных пропионобактерий относятся также 4 вида: *P. acnes*, *P. avidum*, *P. granulosum* и *P. lymphophilum*. Среди *P. acnes* и *P. avidum* различают по два биовара, которые обозначают как первый и второй.

Типовым видом рода является *Propionibacterium freidenreichii* (назван по имени швейцарского бактериолога Edouard'a Freidenreich'a, который первый выделил этот вид).

В прошлом штаммы этого вида были дифференцированы на 2 подвиды: *P. freidenreichii* subsp. *freidenreichii* и *P. freidenreichii* subsp. *schermannii*. Первый подвид восстанавливает нитраты и не ферментирует лактозу, второй — наоборот. Поэтому в сыроделии использовали *P. freidenreichii* subsp. *schermannii*. В последнее время такого деления нет, так как подвиды определяют по генетическим, а не фенотипическим особенностям. Например, содержание моль % гуанина + цитозина (Г+Ц) в молекулах ДНК различных видов микроорганизмов. Пределы такого содержания для пропионовоокислых бактерий составляют 53-68 моль %.

Морфология. Бактерии пропионовоокислого брожения представляют собой неподвижные, не образующие спор и капсул грамположительные полиморфные палочки размером 0,5-0,8 x 1-5 мкм. Клетки могут быть кокковидными, удлиненными, раздвоенными или разветвленными, встречаются булавовидные формы. Располагаются одиночно, парами, короткими цепочками, в виде букв V или Y или группами и в виде китайских иероглифов (рис. 26), но нитчатые формы отсутствуют.

Классические пропионобактерии имеют тенденцию к образованию более коротких и довольно толстых форм, хотя все штаммы могут быть очень вариабельными, особенно в ранних культурах в логарифмической фазе роста. Штаммы *P. acnes* образуют тонкие палочки в молодых культурах. В более старой культуре все виды имеют тенденцию к образованию кокковых форм.

Значительное число штаммов всех видов может продуцировать внеклеточную слизь, не организованную в форме четких индивидуальных капсул.

Состав и расположение аминокислот межпептидных соединений (связей) в пептидогликане клеточной стенки различно для отдельных видов пропионобактерий. Чаще встречаются сочетания: аланин-глицин-



Рис. 26. Пропионовоокислые бактерии

глутамин; аланин-глутамин-мезо-диамино-пимелиновая кислота.

Изомеры диаминопимелиновой кислоты имеются в клеточной стенке всех видов, за исключением *P. lymphophilum*, где вместо них имеются лизин.

Культуральные свойства. Пропионовоокислые бактерии являются факультативными анаэробами, но вариабельными по аэротолерантности. Большинство культур растет в той или иной степени на воздухе, хотя большинство штаммов наиболее быстро растут в строго анаэробных условиях.

В пищевых потребностях обе группы пропионобактерий оказываются схожими. Пантотенат кальция требуется для всех штаммов, многим необходим биотин; рост улучшается тиаминном и никотинамидом; соль олеиновой кислоты (олеат) также является стимулятором, а некоторым штаммам требуется α -аминобензойная кислота. Потребности в аминокислотах комплексные для группы акнес, но некоторые из классических пропионобактерий могут расти с аммонием сульфатом как источником азота.

Превосходный рост всех пропионобактерий может быть получен на трипсиново-дрожжевой экстракт-глюкозной среде, содержащей 0,05 % твина-80. Бактерии хорошо растут в бульоне с пептоном, дрожжевым экстрактом и глюкозой в глубоких пробирках при свободном доступе воздуха. Вызывают помутнение бульона и образование часто окрашенного осадка. Большинство штаммов растет в глюкозном бульоне с 20 % желчи и 6,5 % NaCl.

На плотной среде (кровяном агаре) пропионовоокислые бактерии образуют мелкие выпуклые полупрозрачные блестящие колонии, которые могут быть белыми, серыми, розовыми, красными, желтыми или оранжевыми. Оптимальный рост наблюдается при температуре 30-37 °C и pH около 7. Некоторые штаммы растут при 25 и 45 °C. Классические пропионовоокислые бактерии лучше растут при 30-32 °C, а штаммы кожных видов — при 36-37°C. Максимальный рост достигается через 48 ч.

Биохимические свойства. Пропионобактерии являются хемоорганотрофами. Продукты ферментации включают большие количества пропионовой и уксусной кислот, и меньшие количества изовалериановой, муравьиной, янтарной, молочной кислот и диоксида углерода.

В молоке пропионовоокислые бактерии развиваются медленно и свертывают его через 5-7 дней.

Несмотря на слабую энергию кислотообразования при развитии этих бактерий, предельная кислотность молока может достигать 160-170 °Т.

Пропионовоокислому брожению подвергаются различные углеводы, в том числе глюкоза и лактоза, а также лактаты, т.е. соли молочной

кислоты, и пептон.

Пропионовокислые бактерии используют в составе заквасок при производстве твердых сыров с длительным сроком созревания.

После окончания молочнокислого брожения лактозы в созревающем сыре наступает стадия пропионовокислого брожения, сопровождающаяся образованием молочной кислоты в уксусную и пропионовую кислоты. Эти кислоты придают сырам острый вкус, а образующийся диоксид углерода формирует рисунок сыра (глазки). Пропионовокислые бактерии способны синтезировать витамин В₁₂ и обогащать им молочные продукты. Кожные пропионобактерии витамина В₁₂ не продуцируют. Пропионобактерии образуют аммиак из безжелезных веществ, фермент каталазу и ферменты дегидрогеназы и цитохромы.

Дифференцирующие признаки видов рода *Propionibacterium* представлены в табл. 14.

14. Дифференцирующие признаки видов рода *Propionibacterium*

Признак									
	<i>P. acidipropionicus</i>	<i>P. jensenii</i>	<i>P. thoenii</i>	<i>P. freudenreichii</i>	<i>P. granulosum</i>	<i>P. jensenii</i>	<i>P. avidum</i>	<i>P. limophilum</i>	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Обычный цвет колоний	Белый	От белого до розового	От оранжевого до кирпичного	Бронзовый, розовый	От белого до серого	От белого до серого	От белого до кремового	Белый	
Рост при 20% желчи	+	±	∓	∓	-	∓	±	-	
Гидролиз: Эускулина	+	+	+	+	-	-	+	-	
Крахмала	-	-	+	-	-	+	-	∓	
Желатина	-	-	-	-	±	+	±	±	
Молоко: свертывание пептонизация	∓	-	-	±	+	±	+	-	
Образование индола	-	-	-	-	-	±	-	-	
Восстановление нитрата	+	-	-	-	-	-	-	∓	
Каталаза	-	±	+	+	+	±	+	±	
Газ	∓	∓	∓	+	∓	∓	∓	-	
Ацетон	±	-	-	-	-	-	-	∓	
Образование кислоты из: Лактозы	+	±	+	+	-	-	+	-	
Мальтозы	+	-	+	-	±	-	+	+	
Фруктозы	+	+	+	+	+	+	+	+	
Галактозы	+	+	+	+	+	±	+	-	
Глюкозы	+	+	+	+	+	±	+	+	

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Сахарозы	+	+	±	-	+	-	+	∓	-
Трегалозы	+	+	+	-	±	-	+	-	-
Ксилиты	±	±	-	-	-	-	-	±	-
Арабинозы	+	-	-	+	-	-	-	±	-
Целлобиозы	+	∓	-	-	-	-	-	-	-
Дульцита	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Глицерола	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Гликогена	-	-	±	-	-	-	-	-	-
Иназитола	+	+	±	-	-	-	∓	-	±
Маниозы	+	+	±	+	+	±	+	+	-
Рамнозы	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Рибозы	+	+	+	±	∓	±	±	±	+
Салицина	+	+	±	-	-	-	-	±	-
Сорбита	+	-	±	-	-	-	+	-	-
Содержание моль % Г+Ц в ДНК (выявляется чаще)	66-68 (67)	65-68 (67)	65-67 (66)	64-67 (65)	61-63 (62)	57-60 (59)	62-63 (62)	62-63 (62)	53-54 (53)
Основные источники выделения	Молочные продукты	Молочные продукты, силос	Красные патчи на змеином сыре	Сырое молоко, швейцарский сыр	Нормальные и пораженные железом	Пораженные железом, кожная, прожженная	Увлажненные участки кожи (подмышки, промежность)	Пораженные лимфоузлы, мочеполовой тракт	

Обозначения: ++ - 80-90 % или более штаммов положительные;
 +- - 90 % или более штаммов отрицательные;
 ± - 21-79 % штаммов положительные;
 ∓ - 11-20 % штаммов положительные.

Пропионобактерии обнаруживаются в основном в сыре и в молочных продуктах, а также на кожных покровах человека.

9.3. БИФИДОБАКТЕРИИ

Это облигатная и доминирующая часть кишечной микрофлоры здорового человека и теплокровных животных. Она проявляет антагонистическую активность по отношению к патогенным, условно-патогенным и нежелательным микроорганизмам в кишечнике.

В настоящее время идентифицировано 24 вида бифидобактерий (от

лат. *bifidus* – раздвоенный, расщепленный надвое), объединенных в род *Bifidobacterium*, который относится к семейству Actinomycetaceae.

Наиболее изученными видами бифидобактерий являются: *B. bifidum*, *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. pseudolongum*, *B. thermophilum* и др. (табл. 15). Типовой вид – *B. bifidum*.

Содержание моль % гуанина + цитозина (Г+Ц) в молекуле ДНК бифидобактерий составляет 57-64.

Морфология. Бифидобактерии представляют собой чрезвычайно переменные по форме палочки – прямые, изогнутые, разветвленные, раздвоенные Y- или V-формы, булавовидные, лопатовидные. Клетки располагаются одиночно, парами, иногда цепочками, палисадом или розетками, размер клеток 0,5-1,3 x 1,5-8 мкм. Грамположительные, не образуют спор и капсул, неподвижные. Микроскопическая картина каждого вида бифидобактерий имеет особенности по размеру, форме и расположению клеток (рис. 27).

При выращивании культур бифидобактерий на печеночном агаре или в молоке ветвление исчезает, клетки становятся грамвариабельными, слабее окрашиваются кислыми и щелочными красителями, появляется много гранулированных форм, которые иногда можно принять за кокки. Грануляция у бифидобактерий наблюдается также в средах с высоким содержанием сухих веществ.

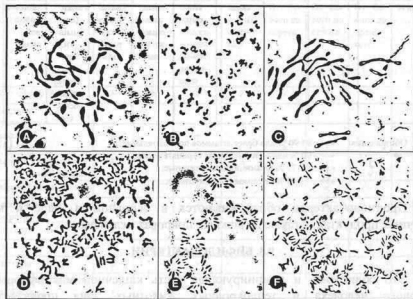


Рис. 27. А – *B. bifidum*, В – *B. indicum*, С – *B. magnum*, D – *B. angulatum*, E – *B. asteroides*, F – *B. minimum*

Ветвление происходит в среде, неполноценной в отношении

источников питания. Появление полиморфных клеток у бифидобактерий индуцируется и катионами одновалентных металлов: калия, натрия, лития, цезия, а также исключением из среды культивирования одной из четырех аминокислот: DL-аланина, DL-серина, DL-аспарагиновой кислоты, L(+)-глутаминовой кислоты, смесь которых предотвращает ветвление клеток.

Среди штаммов, выделенных из кишечника взрослых людей, преобладают палочковидные и булавовидные формы; ветвящиеся палочки чаще встречаются у детей грудного возраста. На ранних стадиях развития у бифидобактерий преобладают палочковидные формы, а при дальнейшем культивировании образуются разветвленные нити с многочисленными перегородками в основном стволе и ответвлениях.

Культуральные свойства. Все виды бифидобактерий при первичном выделении являются строгими анаэробами. В присутствии углекислого газа они могут быть толерантными к кислороду. При лабораторном культивировании эти микроорганизмы приобретают способность развиваться в присутствии некоторого количества кислорода, а в высокопитательных средах – расти в полностью аэробных условиях. Чувствительность к кислороду у многих штаммов бифидобактерий варьирует, что обусловлено различиями в механизме брожения. Некоторые виды могут расти в атмосфере воздуха, обогащенного 10 % CO₂. Оптимальной является температура 37-41 °С. Оптимальное значение pH 6-7, при pH ниже 4,5 и выше 8,5 рост микроорганизмов прекращается.

Размножение бифидобактерий обусловлено огромным количеством факторов роста. Многие виды нуждаются в биотине, пантотеновой кислоте, цистине, рибофлавине, пуриновых и пиримидиновых основаниях, пептидах, аминоксахарах, коферменте А, олигосахаридах, некоторых ненасыщенных жирных кислотах и др. (табл. 15). Отдельные штаммы нуждаются в углекислом газе, аммиаке, гистидине. Из аминокислот требуется лизин, пролин, серин, аланин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты.

Некоторые штаммы бифидобактерий растут при наличии азотфиксирующих олигосахаридов – N-ацетил-глюкозамина, N-ацетил-галактозамина, N-ацетил-маннозамина и др., которые отсутствуют в коровьем молоке (содержатся в женском молоке).

В синтетических средах бифидобактериям для роста необходимы железо, магний, фосфаты, хлориды калия и натрия, в некоторых случаях – марганец.

Бифидобактерии культивируют, создавая анаэробные условия или снижая окислительно-восстановительный потенциал среды, на молоке, гидролизованном молоке и гидролизате казеина, а также на печеночном бульоне с добавлением ростовых веществ (дрожжевого автолизата,

15. Дифференцирующие особенности биологических свойств бифидобактерий

Виды	Происхождение названия	Необходимые факторы роста	Содержание гуанина + цитозина в ДНК (моль %). Гомология ДНК/ДНК других видов	Кем выделен, когдa, источник выделения
1	2	3	4	5
L.Bifidobacterium (B.) bifidum (Бифидобактериум (Б.) бифидум)	Bifidum - расщепленный, разделенный	Никотиновая и фолиевая кислоты, твин-80, р-аминобензойная кислота	58; B. longum - 40%; B. infantis - 42 %; B. boum - 38%; B. pseudolongum - 35%	Tissier, 1900; обнаружен в фекалиях младенца, вагине человека, в фекалиях молочных телат
2. B. longum (Б. лонгум)	Longum - длинный		58; B. infantis - 50-76%; B. breve - 40%	Reuter, 1963; из фекалий взрослых людей и младенцев
3. B. infantis (Б. инфантис)	Infantis - от младенца, младенческий	Пантотенат кальция, твин-80	58; B. longum - 50-76%; B. breve - 40%; B. pullorum - 39 %	Reuter, 1963; из фекалий взрослых людей и младенцев, из вагины человека
4. B. breve (Б. бреве)	Breve - короткий		58; B. infantis - 40-60%; B. longum - 40-60%; B. pullorum - 33 %; B. globosum - 25 %	Reuter, 1963; из фекалий взрослых людей и младенцев, из вагины человека
5. B. adolescentis (Б. адолесцентис)	Adolescentis - юношеский, подростковый	Рибофлавин, пантотенат кальция, никотиновая кислота, пиридоксин, тиамин	58; B. angulatum - 20 - 30 %; B. catenulatum - 15-57 % B. animalis - 25 %	Reuter, 1963; из фекалий взрослых людей, обезьян и собак; сточных вод, рубца крупного рогатого скота (КРС)
6. B. angulatum (Б. ангулатум)	Angulatum - угловой, с углами	Рибофлавин, пантотенат кальция	59; B. adolescentis - 20-44 %; B. catenulatum - 2-37 %; B. dentium - 5-26 %; B. minimum - 20 %	Scardovi, Crociani, 1974; из фекалий взрослых людей, сточных вод
7. B. catenulatum (Б. катенулатум)	Catenulatum - с наличием маленьких цепочек	Рибофлавин, пантотенат кальция	55; B. dentium - 16 - 45 %; B. adolescentis - 20-57 %; B. magnum - 26 %; B. bifidum - 25 %; B. minimum - 25 %	Scardovi, Crociani, 1974; из фекалий взрослых людей и младенцев, из сточных вод

1	2	3	4	5
8. B. pseudocatenulatum (Б. псевдокатенулатум)	Pseudo - ложный, ошибочный, т.е. не является catenulatum	Рибофлавин, пантотенат кальция, никотиновая кислота	57; B. catenulatum - 50-80 %; B. adolescentis - 30 %; B. choerinum - 25 %; B. suis - 25 %; B. minimum - 25 %	Scardovi, Trovatelli, Biavati, Zani, 1979; из фекалий младенцев, молочных телат, сточных вод
9. B. dentium (Б. денгум)	Dentum - зубной	Рибофлавин, пантотенат кальция	61; B. adolescentis - 24-49 %; B. angulatum - 8 - 20 %; B. catenulatum - 3-48 %	Scardovi, Crociani, 1974; из зубов, пораженных кариесом; из фекалий взрослых людей и младенцев, из ротовой полости и вагины человека
10. B. globosum (Б. глобозум)	Globus - шар, сфера, globosum - сферический	Рибофлавин, пантотенат кальция, тиамин, фолиевая кислота	64; B. pseudolongum - 65-70 %; B. cuniculi - 50-67; B. choerinum - 26 - 57 %	Scardovi, Trovatelli, Crociani, Sgorbati, 1969; из фекалий свиной, молочных телат, крыс, кроликов, агнят; из рубца КРС и сточных вод
11. B. pseudolongum (Б. псевдолонгум)	Pseudo - ошибочный, ложный, т.е. не является B. longum		60; B. globosum - 75 %; B. choerinum - 37%; B. animalis - 34 %	Mitsuoka, 1969; из фекалий свиной, цыплят, КРС, крыс и мышей
12. B. cuniculi (Б. кункули)	Cuniculi - кроличий (от кролика)		64; B. globosum - 50 - 67 %; B. animalis - 26 - 31 %; B. pullorum - 25 %; B. thermophilum - 15-25 %; B. adolescentis - 25 %	Scardovi, Trovatelli, Biavati, Zani, 1979; из фекалий кролика
13. B. choerinum (Б. хоеринум)	Choerinum - принадлежащий свиные (от свины)		66; B. pseudolongum - 45-50 %; B. pullorum - 37 %; B. indicum - 44 %; B. globosum - 50 %; B. asteroides - 50 %	Scardovi, Trovatelli, Biavati, Zani, 1979; из фекалий поросят, из сточных вод

1	2	3	4	5
14. <i>B. animalis</i> (Б. анималис)	Animalis – животный (от животных)		60; <i>B. pullorum</i> – 35 %; <i>B. adolescentis</i> – 30%; <i>B. globosum</i> – 40 %; <i>B. cuniculi</i> – 18-25 %	Mitsuoka, 1969; из фекалий крыс, цыплят, кроликов, телат, овец, свиней; из сточных вод
15. <i>B. thermophilum</i> (Б. термофилюм)	Thermophilum – теплолюбивый	Рибофлавин, пантотенат кальция, пиридоксин	60; <i>B. choerinum</i> – 15-35 %; <i>B. boom</i> – 36-74 %; <i>B. longum</i> – 27-80 %	Mitsuoka, 1969; из фекалий свиней, поросат, цыплят, телат, рубца КРС, сточных вод
16. <i>B. boom</i> (Б. боум)	Boom – от крупного рогатого скота		60; <i>B. thermophilum</i> – 27-80 %; <i>B. adolescentis</i> – 25 %	Scardovi, Trovatelli, Biavati, Zani, 1979; из рубца КРС, фекалий поросат
17. <i>B. magnum</i> (Б. магнум)	Magnum – большой, огромный		60; <i>B. globosum</i> – 32 %; <i>B. longum</i> – 0-29 %; <i>B. minimum</i> – 19 %	Scardovi, Zani, 1974; из фекалий кроликов
18. <i>B. pullorum</i> (Б. пуллорум)	Pullorum – цыплячий (от цыплят)	Никотиновая кислота, пиридоксин, тиамин, фолиевая кислота, р-аминобензойная кислота, танин-80	67; <i>B. adolescentis</i> – 21 %; <i>B. bifidum</i> – 20 %; <i>B. breve</i> – 18 %	Trovatelli, Crociani, Pedinotti, Scardovi, 1974; из фекалий цыплят
19. <i>B. suis</i> (Б. сунс)	Suis – свиной	Рибофлавин	62; <i>B. catenulatum</i> – 25 %; <i>B. pseudolongum</i> – 9-27 %; <i>B. angulatum</i> – 20 %; <i>B. dentium</i> – 20 %; <i>B. animalis</i> – 20 %	Matteuzzi, Crociani, Zani, Trovatelli, 1971; из фекалий поросат
20. <i>B. minimum</i> (Б. минимум)	Minimum – наименьший		61,5; <i>B. globosum</i> – 33 %; <i>B. catenulatum</i> – 30%; <i>B. subtile</i> – 10-31 %; <i>B. angulatum</i> – 23 %	Biovati, Scardovi, Moore, 1982; из сточных вод
21. <i>B. subtile</i> (Б. субтиле)	Subtile – тонкий, стройный		61,5; <i>B. longum</i> – 23 %; <i>B. minimum</i> – 16-20 %; <i>B. breve</i> – 17 %	Biovati, Scardovi, Moore, 1982; из сточных вод
22. <i>B. coryneforme</i> (Б. коринформе)	Coryneforme – булавовидный		-; <i>B. indicum</i> – 60 %	Scardovi, Trovatelli, 1969; из кишечника медоносной пчелы <i>Apis mellifera</i> subsp. <i>caucasica</i> в Норвегии

1	2	3	4	5
23. <i>B. asteroides</i> (Б. астероидес)	Asteroides – звездоподобный	Рибофлавин, пантотенат кальция, никотиновая кислота, пиридоксин, тиамин, биотин	59; <i>B. indicum</i> – 23-30 %; <i>B. coryneforme</i> – 23 %; <i>B. choerinum</i> – 50 %	Scardovi, Trovatelli, 1969; из кишечника медоносной пчелы <i>Apis mellifera</i> var. <i>Ligustica</i> в Италии
24. <i>B. indicum</i> (Б. индикум)	Indicum – от названий пчелы <i>Apis indicum</i>		60; <i>B. coryneforme</i> – 30 %; <i>B. subtile</i> – 60 %	Scardovi, Trovatelli, 1969; из кишечника медоносной пчелы <i>Apis indicum</i> в Малайзии

кукурузного экстракта, цистина и др.). На плотных питательных средах бифидобактерии образуют разнообразные колонии: плоские, полусферовидные, блестящие, шероховатые, окруженные валиком, имеющие более темный центр и т.д. Цвет колоний изменяется от белого и серого до темно-коричневого. Колонии часто напоминают по форме зерно гречихи или усеченную треугольную пирамиду, на некоторых средах колонии имеют форму чечевичек. Размеры колоний от 0,5 до 5 мм.

В молоке бифидобактерии развиваются медленно, так как коровье молоко не является естественной средой их обитания. Одной из причин плохого роста бифидобактерий в молоке служит растворенный в нем кислород. У них не обнаружено казеолитической активности, т.е. они могут усваивать казеин только после частичного гидролиза. В результате расщепления казеина образуются полипептиды, гликопептиды, аминоксахара, стимулирующие рост бифидобактерий. Другой причиной заторможенного роста бифидобактерий может быть и их низкая фосфатазная активность.

Рост бифидобактерий в коровьем молоке стимулируют экстракты дрожжей, гидролизованное молоко, а также увеличение соотношения белок : лактоза. Сильный стимулирующий эффект роста бифидобактерий получают при использовании гидролизатов казеина.

Растительными стимуляторами роста бифидобактерий в молоке являются обезжиренная соя, экстракт картофеля, тростниковый сахар, кукурузный экстракт, морковный сок. В качестве стимуляторов роста применяют также соли железа, сорбит, микроэлементы в виде сернокислой меди и лактата железа.

Одним из способов активации роста бифидобактерий в молоке является получение мутантов этих микроорганизмов, способных расти без какой-либо защиты от кислорода.

Для культивирования бифидобактерий наиболее распространенной считается печеночно-цистиновая среда (с р е д а Б л а у р о к а).

Для ее приготовления 500 г говяжьей печени, освобожденной от сухожилий, пропускают через мясорубку, заливают двойным

колличесом воды и кипятят в течение 2 ч, затем отфильтровывают. Фильтрат доводят дистиллированной водой до 1 000 см³ и вносят 10 г пептона, 10 г лактозы, 100 мг хлористого цистеина, 5 г NaCl и агара 1-2 г. рН среды 6,8-7,0. Однако эта среда дорога, содержит дефицитные компоненты, поэтому мало пригодна для использования в промышленных условиях.

В молочной промышленности для выявления бифидобактерий рекомендована гидролизатно-молочная среда (ГМ-среда). Для ее приготовления в небольшом количестве разведенного гидролизованного молока (гидролизата) расплавляют агар из расчета 2,5 г. на 1 дм³ приготовленной среды. К остальному количеству гидролизата добавляют 20 г. пептона и 3,5 г. хлористого натрия, смесь нагревают до температуры 80 °С, после чего соединяют с расплавленным агаром. Устанавливают рН 7,5 и смесь кипятят в течение 15 мин, дают отстояться, сливают с осадка, не фильтруя, доливают горячей дистиллированной водой до заданного объема и добавляют в нее 10 г. лактозы и 0,15 г. солянокислого цистеина. Среду разливают в пробирки высоким столбиком по 10 см³ и стерилизуют при температуре 112 °С в течение 30 мин.

Биохимические свойства. Бифидобактерии являются хемоорганотрофами, активно сбраживают сахарозу, галактозу, фруктозу, мальтозу, меллибиозу, раффинозу, лактозу и др. (табл. 16), с образованием в основном уксусной и молочной кислот в молярном соотношении 3 : 2. Образуются также примеси муравьиной и янтарной кислот, а также этанола. Масляную, пропионовую кислоты и СО₂ не образуют.

Бифидобактерии не продуцируют каталазы, не образуют индол и сероводород, не восстанавливают нитраты, не разжижают желатин. Они не продуцируют фенол, не образуют аммиак из аргинина. При развитии в лакмусовом молоке бифидобактерии вызывают частичное или полное его восстановление. Эти микроорганизмы способны развиваться в бульоне из гидролизованного молока с 2%-ным раствором поваренной соли, 20 % желчи, концентрацией фенола 1 : 250. Цитраты в качестве источника энергии бифидобактерии не используют.

Большинство штаммов бифидобактерий не сквашивают стерильное молоко или сквашивают его через 4 сут и более. В процессе культивирования биохимическая активность микробов повышается и свертывание молока происходит через 24-36 ч. Биохимическая активность повышается также при добавлении в молоко ростовых веществ. При внесении 5-10 % посевного материала сквашивание наблюдается через 8-12 ч. Предельная кислотность достигает 120-130 °Т.

Кроме кишечника теплокровных бифидобактерии обнаружены в

16. Дифференцирующие особенности сахаролитических свойств видов рода *Bifidobacterium*

Углеводы	Виды	Д-Риоза																									
		L-Арабиноза	Лактоза	Целлюлоза	Меллибиоза	Раффиноза	Сорбит	Крахмал	Глюкоза	Ксилоза	Манноза	Фруктоза	Галактоза	Сахароза	Мальтоза	Третьяоза	Меллибиоза	Маннит	Нишшта	Самниин							
1. B. bifidum		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
2. B. longum		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3. B. infantis		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4. B. breve		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5. B. adolescentis		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6. B. angustatum		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7. B. catenulatum		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8. B. pseudocatenulatum		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9. B. dentium		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10. B. globosum		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11. B. pseudolongum		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12. B. cuniculi		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13. B. choerinum		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14. B. animalis		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15. B. nemophilum		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16. B. boum		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17. B. magnum		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18. B. pullorum		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19. B. suis		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20. B. minimum		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21. B. subtile		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22. B. coryneforme		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23. B. asteroides		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24. B. indicum		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Обозначения: +++ - 90% или более штаммов положительные; ++ - 50% или более штаммов отрицательные; +- - 1-89% штаммов положительные; - - - - - положительные со слабой реакцией.

ротовой полости, также у насекомых и в сточных водах.

Бифидобактерии применяют при изготовлении кисломолочных продуктов для детей раннего возраста и пробиотиков для людей и животных, так как способствуют нормализации микрофлоры кишечника. Они сообщают продукту диетические и лечебные свойства, так как синтезируют витамины группы В (V_1 , V_2 , V_6 , V_{12} , фолиевую кислоту), витамин К, также незаменимые аминокислоты, при этом в качестве азота используют аммиак. Эти микроорганизмы разрушают канцерогенные вещества, образуемые некоторыми представителями кишечной микрофлоры при азотном обмене, выполняя, таким образом, роль «второй печени».

Бифидофлора играет важную роль в жизнедеятельности человека, поддерживая его здоровье на оптимальном уровне. Она является преобладающей микрофлорой в кишечнике. В 1 г. содержимого толстого кишечника взрослого человека обнаруживают несколько миллиардов клеток бифидобактерий.

9.4. УКУСНОКИСЛЫЕ БАКТЕРИИ

Микроорганизмы, окисляющие этиловый спирт в уксусную кислоту, называют уксуснокислыми бактериями или ацетобактериями. Их относят к роду *Acetobacter*, в который входят 7 видов: *A. aceti*, *A. diazotrophicus*, *A. Hansenii*, *A. liquefaciens*, *A. methanolicus*, *A. pasteurianus* и *A. xilinum*. Типовым видом является *Acetobacter aceti*.

Морфология. Ацетобактерии представляют собой мелкие прямые или слегка изогнутые палочки размером 0,6-0,8 x 1,0-4,0 мкм. Встречаются эллипсоидные, удлиненные, разветвленные или имеющие вздутия формы. Подвижны, жгутики располагаются перитрихально, бывают неподвижные штаммы. По Граму красятся отрицательно, в старых культурах некоторые штаммы становятся грампвариабельными. Спор и капсул не образуют. Клетки располагаются беспорядочно — по одной, в парах, часто в цепочках (рис.28).

Культуральные свойства. Уксуснокислые бактерии являются облигатными аэробами. Оптимальная температура роста 25-30 °С, хорошо растут при 20 °С и слабо при 37-38 °С, температурные пределы

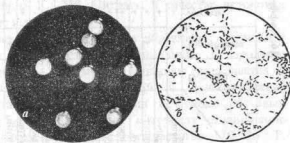


Рис. 28. *Acetobacter aceti*: а — круглые гладкие блестящие колонии; б — палочки, расположенные длинными, параллельно идущими цепочками

развития 5-42 °С; оптимум pH 5,4-6,3, могут расти при pH 4,0-4,5, при pH 7,0-8,0 растут слабо. Нилучшими источниками углерода при культивировании служат этанол, глицерол и лактаты.

Растут на простых и сложных питательных средах, большинство штаммов не нуждается в витаминах

На сусло-агаре ацетобактерии образуют мелкие маслянистые блестящие бесцветные колонии, так как большинство штаммов пигменты не образуют. Для небольшого числа штаммов характерно образование водорастворимых пигментов, чаще желтого цвета. Редко колонии могут окрашиваться в розовый цвет за счет образовавшихся порфиринов.

На жидких подкисленных средах уксуснокислые бактерии образуют слабую пленку, напоминающую папиросную бумагу или более плотную, опускающуюся на дно пробирок. При посеве уколом на МПЖ ацетобактерии дают гроздевидный рост, в связи с чем могут быть отнесены к факультативным аэробам.

В молоке в чистой культуре ацетобактерии практически не развиваются, так как лактозу не усваивают. Совместно с молочнокислыми бактериями, образующими молочную кислоту и лактаты, развиваются очень активно, при этом некоторые штаммы могут синтезировать флавин, в результате чего на поверхности свернувшегося молока появляется оранжевое кольцо.

Для дифференциации видов уксуснокислых бактерий применяют питательную среду ЖИК (GYC), содержащую 5 % D-глюкозы + 1 % дрожжевого экстракта + 3 % $CaCO_3$ + 2,5 % агара.

Для приготовления дрожжевого экстракта 100 г измельченных прессованных дрожжей заливают 500 см³ дистиллированной воды, кипятят при постоянном перемешивании до тех пор пока не сойдет пена, затем помещают на 24 ч при 4-6 °С в холодильник. Эмульсию фильтруют через вату и фильтрат стерилизуют при температуре 121 °С 20 мин.

Биохимические свойства. Уксуснокислые бактерии являются хемоорганотрофами, для них характерен метаболизм дыхательного типа, никогда не броидльного. Окисляют этанол в уксусную кислоту при нейтральной или кислой реакции (pH 4,5), при этом образуют от 5 до 9,6 % уксусной кислоты. Ацетат и лактат окисляют до CO_2 и H_2O (сверхокисление). Этанол и лактат служат хорошими источниками углерода.

Гексозы и глицерин пригодны как источники углерода для большинства штаммов, маннит усваивают плохо, лактозу, крахмал и декстрин не гидролизуют. Легко окисляют многие аминокислоты, желатин не разжижают, индол и сероводород не образуют, продуцируют каталазу и перекись водорода.

Некоторые штаммы ацетобактерий способны синтезировать

витамин В₁₂.

Дифференцирующие особенности видов рода *Acetobacter* представлены в табл. 17.

Уксуснокислые бактерии входят в состав постоянной микрофлоры кефирной грибковой закваски (кефирного грибка), участвуют в формировании специфического вкуса и консистенции кефира. При избыточном развитии вызывают порок – ослизнение и тягучесть кефирной закваски.

В твороге, сметане и простокваше при содержании ацетобактерий в количестве 10^5 - 10^6 клеток в 1 см³ (г) обуславливают запах и привкус уксусной кислоты и ослизнение продукта.

Уксуснокислые бактерии встречаются на цветах, фруктах, медоносных пчелах, в виноградных винах, сидре, пиве, кефире, пивных дрожжах, уксусе, скисших фруктовых соках, соке сахарного тростника, «чайном грибе», растительных дубильных растворах и в садовой почве.

Некоторые представители рода *Acetobacter* могут вызывать розовую гниль ананасов, яблок и груш. Один вид (*A. diazotrophicus*) является микроаэрофильным азотфиксирующим микроорганизмом, он присутствует на корнях и стеблях сахарного тростника.

17. Дифференцирующие признаки видов рода *Acetobacter*

Признак	<i>A. aceti</i>	<i>A. diazotrophicus</i>	<i>A. hanseii</i>	<i>A. liquefaciens</i>	<i>A. methanolicus</i>	<i>A. pasteurianus</i>	<i>A. xylinum</i>
Образование водорастворимых коричневых пигментов на среде ГYC	-	+	-	+	-	-	-
Источники углерода:							
Этанол	+	+	-	+	±	±	-
Дульцитол	-	-	±	-	-	-	-
Ацетат натрия	+	+	-	±	±	±	-
Метанол	-	-	-	-	+	-	-
Рост с использованием:							
L-гуанина, L-треонина, L-триптофана;	-	-	-	±	-	-	-
L-глутамина	±	-	+	+	-	-	-
L-аспарагина	±	+	+	+	-	-	-
Рост в присутствии 10 % этанола	-	-	-	-	-	±	-
Рост в присутствии 30 % D-глюкозы	-	+	-	-	-	-	-
Азотфиксация и рост с использованием N ₂	-	+	-	-	-	-	нд

Обозначения: «++» – 90 % и более штаммов положительные;

«+» – 90 % и более штаммов отрицательные;

«±» – 11-89 % штаммов положительные;

«±» – слабая активность;

нд – нет данных.

9.5. ДРОЖЖИ

Являются основными возбудителями спиртового брожения. Систематика дрожжей представлена в главе 1. Наибольшее значение в пищевой и молочной промышленности имеет семейство *Saccharomycetaceae*, род *Saccharomyces*. К этому роду относятся и молочные дрожжи *S. lactis*, *S. casei*, которые могут развиваться в сырах и кисломолочных продуктах.

В молоке и молочных продуктах выявляются и другие как спорообразующие, так и неспорообразующие (аспорогенные) дрожжи. Из спорообразующих встречаются также дрожжи родов *Zygosaccharomyces*, *Fabospora* и *Debariomycus*, из неспорообразующих родов – *Torulopsis*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* и др. По современной классификации в род *Candida* включен вид *Candida mycoderma*, составлявший ранее самостоятельный род *Mycoderma*.

Дрожжи вида *Candida mycoderma* относят к дрожжеподобным микроорганизмам, которые являются как бы промежуточным звеном между дрожжевыми и плесневыми грибами. Они размножаются почкованием, причем почки не отделяются от материнской клетки, образуя скопления из объединенных между собой клеток, напоминающие мицелий многоклеточных плесеней (псевдомицелий). Таким образом, аспорогенные дрожжи рода *Candida* могут существовать в дрожжевой и нитевидных формах. На жидких питательных средах такие скопления клеток образуют пленку.

Морфология. Клетки дрожжей овальные или слегка эллипсоидные (рис. 5). Почки клеток имеют продолговатую форму. Дрожжи неподвижные, по Граму красятся положительно, капсул не образуют. Аскомицеты образуют споры, которые формируются внутри клетки по 2, 4, 8 и более штук.

Величина клеток варьирует в широких пределах. В молодых культурах дрожжевые клетки имеют размеры 2-5 x 3,0-7,5 мкм, более зрелые формы достигают размеров 14-16 мкм. Длина мицелиальных нитей составляет десятки (до сотен) микрометров. Форма клеток у дрожжей различных видов варьирует от шаровидных, овальных до удлиненноцилиндрических.

Культуральные свойства. Дрожжи являются факультативными анаэробами, но лучше развиваются при наличии в среде кислорода. Оптимальная температура развития 25-30 °С, минимальная 5-12 °С. Однако, многие дрожжи способны размножаться при температуре минус 3°С. Активность роста зависит от температуры. Например, появление видимого роста у штаммов рода *Torula* отмечается при 2 °С через 7 сут, при 0 °С – через 10 сут, при минус 2 °С – через 21 сут.

Повышенная температура (30-32 °С) стимулирует развитие дрожжей, особенно не ферментирующих лактозу. Дрожжи,

сбраживающие лактозу, достаточно хорошо развиваются и при 18-20 °С.

Большинство дрожжей предпочитают для своего развития кислую реакцию среды, поэтому они широко распространены в кисломолочных продуктах и могут быть обнаружены почти в любом образце продукта, приготовленного на естественных заквасках. Однако дрожжи развиваются медленнее, чем лактобактерии, в связи с чем их обнаруживают в меньшем количестве, чем молочнокислые бактерии.

При росте на плотных питательных средах, а также на продуктах дрожжи рода *Rhodotorula* образуют колонии, окрашенные в красный, розовый или желтый цвет.

Большинство штаммов дрожжей родов *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Torulopsis* и *Candida* при развитии на пищевых продуктах в условиях холодильного хранения образуют внеклеточный полисахарид, в результате чего на продукте появляется слизь.

Для выращивания дрожжей наиболее часто используют агар Сабуро, на котором они образуют полупрозрачные гладкие блестящие колонии средних и крупных размеров. В состав среды входят мальтоза или глюкоза - 4г, пептон - 1г, агар - 2г и вода 100 см³.

Для выявления аспорогенных дрожжей используют синтетическую среду с лизинном. В 1 дм³ водопроводной воды растворяют: глюкозы 50 г, лизина 3 г, KH_2PO_4 1 г, $MgSO_4$ 1 г, $FeSO_4$ следы. Каждый компонент растворяют в воде отдельно и добавляют в указанном порядке. В среду прибавляют агар (1,5 %), расплавляют и разливают по пробиркам. Стерилизуют 20 мин при 112 °С.

Аскомицеты, не усваивающие лизин, не растут на этой среде или растут в виде точечных колоний за счет следовых количеств азота, содержащихся в агаре. Неспорообразующие дрожжи, ассимилирующие лизин, развиваются в виде крупных колоний.

Биохимические свойства. Возможность дрожжей размножаться в молоке определяется способностью их ферментировать лактозу или наличием в молоке другой микрофлоры, в частности молочнокислой, обладающей лактозной активностью.

По биохимической активности, способности ферментировать лактозу и развиваться в молоке дрожжи делят на три группы.

В первую группу отнесены **неспорообразующие, не ферментирующие лактозу** и другие углеводы дрожжи вида *Candida pseudocodgema*. Они не способны к спиртовому брожению. Развиваются на поверхности кисломолочных продуктов при их хранении.

Вторую группу представляют **спорообразующие дрожжи** вида *Saccharomyces cartilaginosus*, **не ферментирующие лактозу**. Они ферментируют мальтозу с образованием газа. Эти дрожжи называют «дикими», так как они в производстве не применяются, но хорошо развиваются с молочнокислыми бактериями.

Третью группу составляют дрожжи, **ферментирующие лактозу**. Это спорообразующие виды *Saccharomyces lactis*, *Zygosaccharomyces lactis*, *Fabospora fragilis*, а также неспорообразующие - *Torulopsis kefir* и *Candida pseudotropicalis* var. *lactis*.

Первые два вида лактозу ферментируют с образованием газа, мальтозу все перечисленные виды не ферментируют, лакмусовое молоко не свертывают, за исключением рода *Candida*.

Дрожжи третьей группы могут входить в состав микрофлоры кефирных грибков и вводиться в состав заквасок для производства других кисломолочных продуктов.

В качестве источника углерода дрожжи лучше всего используют гекозсы, другие углеводы, спирты, в том числе метанол, органические кислоты. В качестве источника азота усваивают соли аммония, аминокислоты, пептиды, реже - нитраты и нитриты.

Большинство видов дрожжей, развивающихся на молочных продуктах, обладают липолитической способностью. В связи с этим размножение дрожжей в жирсодержащих продуктах при холодильном хранении вызывает их порчу: прогоркание, осаливание, появление неприятного запаха.

Роль дрожжей в производстве кисломолочных продуктов и молочных консервов исключительно велика. Обычно их рассматривают как возбудителей спиртового брожения, но эта функция, видимо, не основная.

Дрожжи формируют специфические вкус и запах, витаминизируют продукты, стимулируют размножение молочнокислых бактерий, подавляют вредную микрофлору. Дрожжи используют также для повышения стойкости масла.

Они способны вырабатывать антибиотические вещества, подавляющие развитие возбудителя туберкулеза, бактерий группы кишечных палочек и других нежелательных микроорганизмов.

Незаквасочные дрожжи обнаруживают в молоке, сметане, твороге, других кисломолочных продуктах, где они образуют этиловый спирт и создают условия для развития уксуснокислых бактерий. При развитии в этих продуктах, в сгущенном молоке с сахаром, в сыре дрожжи могут вызывать такие пороки продуктов, как спиртовый вкус и запах, обильное газообразование («бродящее» молоко), бомбаж баночных консервов, иногда вспучивание сыров, творога и других кисломолочных продуктов.

Дрожжи хорошо приспособились к обитанию в различных местах. Они растут на поверхности сладких плодов, в нектаре цветов, в соке деревьев, на поверхности листьев, в лесной подстилке, почве и в водоёмах. Дрожжи содержатся также в пищеварительном тракте людей и животных, на кожных покровах. Имеются патогенные или условно-патогенные формы, вызывающие заболевания у людей и растений.

9.6 СЛИЗЕОБРАЗУЮЩАЯ ПАЛОЧКА – BREVIBACTERIUM LINENS

В образовании слизи на сырах со слизистой поверхностью участвует наряду с пигментообразующими микрококками и дрожжами прежде всего *Brevibacterium linens* – бактерия, вырабатывающая красный пигмент.

Систематика. Род *Brevibacterium* объединяет четыре вида бактерий, он выделен в группу коринебактерий, которая охватывает различные протеолитически активные микроорганизмы. Их таксономическое положение в системе бактерий неустойчиво. Существует тесное родство между родами *Brevibacterium*, *Anthrobacter*, *Microbacterium* и *Corynebacterium*.

Морфология. Бревибактерии представляют собой грамположительные палочки неправильной формы, размером 0,6–1,2 х 1,5–6 мкм, располагаются одиночно или в парах, часто V-образно, т.е. под углом друг к другу. Встречаются разветвленные клетки. В старых культурах палочки распадаются на мелкие коккоподобные формы. Спор не образуют, неподвижные.

Культуральные свойства. По отношению к кислороду бревибактерии являются облигатными аэробами. Оптимальная температура развития 20–35 °С, pH – 6,0–10,0. Могут размножаться на субстратах, содержащих до 15 % поваренной соли.

Характерным признаком бревибактерий является рост на питательных средах простого состава, причем могут быть использованы различные источники углерода и азота.

При инкубации на свету бревибактерии образуют слизистые, округлые, различного цвета колонии – желтые, кремовые, оранжевые, красные, красно-коричневые, желто-коричневые, белые и серые. Пигментация колоний зависит от состава питательных сред и условий культивирования.

На мягком сыре с плесенью (камамбер и др.) бревибактерии развиваются на более поздних стадиях созревания, после того как произойдет раскисление поверхности сыра, вызванное плесенью рода *Penicillium*. При этом сначала слизеобразующие бактерии развиваются в виде красновато-желтой крошки, а затем на всей поверхности сыра.

Биохимические свойства. Бревибактерии являются хемоорганотрофами. Обладают метаболизмом дыхательного типа. Из глюкозы и других углеводов образуют небольшое количество кислоты, вызывают гидролиз желатина, казеина и крахмала. Каталазоположительные.

Они продуцируют протеолитические и липолитические ферменты, диффундирующие в сыр и вызывающие в результате расщепления белка и жиров характерный слегка пикантный запах.

Характерные признаки *B. linens* заключаются в его изменчивости. Поэтому не все штаммы пригодны для сыроделия, их необходимо отбирать по определенным критериям.

Штаммы выделяются лучше всего из слизи сыров. В отношении пигментации наиболее желательны желто-коричневые тона. Протеолиз не должен быть слишком сильным: прежде всего нежелательны штаммы, вызывающие сильное выделение аммиака.

Культуры получают путем выращивания в специальных сосудах на агаровых питательных средах с различными источниками азота и углеводами. Как только поверхность питательной среды полностью зарастет, бактерии смывают стерильным физраствором. Суспензии клеток в растворе поваренной соли поставляют как заквасочные культуры.

Культуры должны соответствовать следующим показателям качества: количество живых микроорганизмов в 1 см³ – не менее 5х10⁸; отсутствие коолиформ, спорообразующих бактерий и других посторонних бактерий; дрожжей и плесневых грибов – не более 10³/см³; сохраняемость культур при 5–8 °С и отсутствии света – 30 дней. При этом количество живых клеток должно составлять 90 % от установленной нормы.

Бактерии, вырабатывающие красную слизь, обычно не культивируют на молочных предприятиях, а применяют непосредственно при изготовлении кисломолочного сыра, камамбера и других сыров со слизью. При этом считается, что добавить культуру в молоко при производстве сыра неэкономично; более целесообразно опрыскивать сыр или отбирать (сыр с плесенью) разбавленной культурой.

ВОЗБУДИТЕЛИ ПОРЧИ (ПОРОКОВ) МОЛОКА И МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

К основным возбудителям пороков молочных продуктов относят гнилостные микроорганизмы, маслянокислые бактерии, энтерококки, термоустойчивые молочнокислые палочки и бактериофаги.

10.1. ГНИЛОСТНЫЕ (ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ) БАКТЕРИИ

Они являются основными возбудителями порчи молочных продуктов, вызывают распад белков (протеолиз), в результате чего могут возникнуть различные пороки пищевых продуктов, зависящие от глубины распада белка. Антагонистами гнилостных являются молочнокислые бактерии, поэтому гнилостный процесс распада продукта возникает там, где не идет кислomолочный процесс.

Протеолиз (протеолитические свойства) изучают посевом микроорганизмов в молоко, молочный агар, мясопептонный желатин (МПЖ) и в свернутую кровяную сыворотку.

Свернувшийся белок молока (казеин) под влиянием протеолитических ферментов может свертываться с отделением сыворотки (пептонизация) или растворяться (протеолиз).

На молочном агаре вокруг колоний протеолитических микроорганизмов образуются широкие зоны просветления молока.

В МПЖ посев производят уколом внутрь столбика среды. Посевы выращивают 5-7 сут при комнатной температуре. Микробы, обладающие протеолитическими свойствами, разжижают желатин. Микроорганизмы, не обладающие протеолитической способностью, растут в МПЖ без его разжижения.

В посевах на свернутой кровяной сыворотке протеолитические микроорганизмы также вызывают разжижение, а микроорганизмы, не обладающие этим свойством, не изменяют ее консистенцию.

При изучении протеолитических свойств определяют также способность микроорганизмов образовывать индол, сероводород, аммиак, т. е. расщеплять белки до конечных газообразных продуктов.

Гнилостные бактерии имеют очень широкое распространение. Они встречаются в почве, воде, воздухе, кишечнике человека и животных, на пищевых продуктах. К этим микроорганизмам относятся спорообразующие аэробные и анаэробные палочки, пигментообразующие и факультативно-анаэробные бесспорные бактерии.

Спорообразующие. К гнилостным аэробам относятся *Vac. subtilis* - сенная палочка, *Vac. mesentericus* - картофельная палочка, *Vac. megatherium* - капустная палочка, *Vac. mycooides* - грибовидная палочка,

Vac. cereus и др.

К спорообразующим гнилостным анаэробам относятся бактерии рода *Clostridium* (*Cl. putrificum*, *Cl. sporogenes*, *Cl. perfringens* и другие виды).

Спорообразующие аэробы и анаэробы относятся к одному семейству *Bacillaceae*.

Все спорообразующие гнилостные представляют собой довольно крупные толстые палочки, достигающие размеров 0,5-2,5 x 10 (у клостридий - до 20) мкм, по Граму красятся положительно, подвижные до момента спорообразования, капсул не образуют. Исключение составляет *Cl. perfringens* - неподвижная, образующая капсулы палочка. Клетки располагаются беспорядочно, у *Vac. cereus* и *Vac. mycooides* - цепочками

Наиболее короткими являются клетки сенной палочки. У бацилл споры располагаются, как правило, центрально, у клостридий - субтерминально. Последние чаще имеют вид теннисной ракетки, ложки или лодочки. У *Cl. sporogenes* почти все клетки содержат споры (рис. 29). Клетки *Cl. perfringens*, как правило, спор не содержат и располагаются часто в виде частокола или римской цифры V.

Спорообразующие аэробы хорошо растут на обычных питательных средах. На МПБ они вызывают помутнение среды, часто - образование пленки и хлопьевидного осадка. *Vac. cereus* помутнения не вызывает, а образует незначительный осадок, поднимающийся при встряхивании

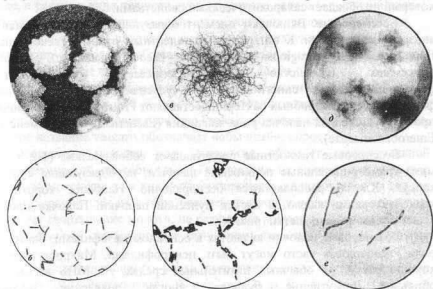


Рис. 29. Спорообразующие гнилостные: *Vac. subtilis*: а - колонии; б - клетки; *Vac. mycooides*: в - колонии; з - клетки; *Cl. sporogenes*: д - колонии; е - клетки

пробирки в виде обложка или комочка ваты.

Вас. *subtilis* формирует поверхностную морщинистую беловатую пленку.

На МПА аэробные бактерии вырастают в виде крупных колоний серовато-белого цвета. Вас. *tyucoides* образует корневидные колонии, напоминающие мицелий гриба, откуда и происходит название палочки (от греч. *tyuces* - гриб) (рис.29). Некоторые штаммы этого микроорганизма выделяют коричневый или розово-красный пигмент. Бурый или коричневый пигмент могут выделять также штаммы Вас. *mesentericus*.

Вас. *subtilis* формирует сухие морщинистые беловатые колонии. Колонии Вас. *segeus* под малым увеличением микроскопа имеют докособразный край или вид головы медузы.

Спорообразующие анаэробы выращивают на специальных питательных средах — мясо-пептонном печеночном бульоне (МППБ), среде Китта-Тарощи, а также на глюкозо-кровяном агаре. Они вызывают помутнение бульона, на агаре образуют округлые мелкие колонии с зоной гемолиза, т. е. просветления — растворения эритроцитов крови.

Спорообразующие обладают хорошо выраженными протеолитическими свойствами: разжижают желатин, свертывают и пептонизируют молоко, вызывают гемолиз, выделяют аммиак, сероводород, а анаэробы выделяют еще и индол. Способны ферментировать многие углеводы, за исключением *Cl. putrificum*, который не обладает сахаролитическими свойствами.

Бесспоровые. Включают пигментообразующие и факультативно-анаэробные бактерии. К пигментным гнилостным относят *Pseudomonas fluorescens*, *Ps. aeruginosa* (семейство *Pseudomonadaceae*), *Serratia marcescens* (семейство *Enterobacteriaceae*) (соответственно флюоресцирующая, синегнойная и чудесная палочки). Группу факультативно-анаэробных бактерий составляют *Proteus vulgaris* (палочка протей) и кишечная палочка рода эшерихия (*Escherichia coli*) (семейство *Enterobacteriaceae*).

Бесспоровые гнилостные представляют собой мелкие (1-2 x 0,6 мкм) грамотрицательные подвижные палочки, не образующие спор и капсул. Клетки располагаются беспорядочно. Наиболее короткими коккобактериями являются клетки чудесной палочки. Палочка протей имеет полиморфные клетки (рис. 30).

Бесспоровые палочки являются в основном мезофилами. Бактерии рода *Pseudomonas* часто могут быть психрофилами. Микроорганизмы хорошо растут на обычных питательных средах. На МПБ вызывают обильное помутнение бульона, иногда появление пленки, пигментообразующие — изменение цвета среды. На МПА образуют окрашенные в цвет пигмента округлые блестящие полупрозрачные



Рис. 30. Бесспоровые гнилостные: *Pseudomonas aeruginosa*: а — колонии; б — клетки; *Pseudomonas fluorescens*: в — клетки

колонии (рис.30).

Флюоресцирующие палочки выделяют зеленовато-желтый пигмент, который растворяется в воде, и поэтому МПА окрашивается также в цвет пигмента.

Синегнойная палочка также выделяет водорастворимый пигмент сине-зеленого цвета, который состоит из двух пигментов: голубого - пхиоцианина и желтого - флюоресцина.

Чудесная палочка образует колонии, окрашенные в ярко-красный или вишнево-красный цвет благодаря нерастворимому в воде пигменту продигозину.

Палочка протей не образует колоний на плотной питательной среде, а растет в виде нежного вуалевидного налета («ползучий рост»). Эшерихия образует серые средних размеров полупрозрачные колонии.

Бесспоровые палочки разжижают желатин, свертывают и пептонизируют молоко, образуют аммиак, иногда сероводород и индол. Сахаролитические свойства выражены у них слабо.

Палочка протей обладает большой протеолитической активностью. Ее обнаруживают в 100 % проб продуктов, пораженных гниением. В связи с этим дано родовое название *Proteus*, обозначающее «вездесущий», видовое название *vulgaris* обозначает «обычный», «простой».

Кишечная палочка рода эшерихия обладает незначительной протеолитической способностью. Так как она не гидролизует целую белковую молекулу, то к гнилоственному процессу подключается на стадии пептонов, расщепляя их с образованием аминов, аммиака, сероводорода. Вызывает свертывание молока, не разжижает желатин, обладает высокой ферментативной активностью в отношении лактозы, глюкозы и других сахаров.

Для количественного учета протеолитических микроорганизмов (кроме *E. coli*) используют молочный агар. Отдельно готовят 2%-ный водный агар и обезжиренное молоко. Обе среды стерилизуют отдельно при 121 °С 10 мин. При употреблении к

расплавленному агару добавляют 20 % обезжиренного горячего молока и после тщательного перемешивания смесь, выливают в чашки Петри.

Для приготовления водного агара в 1 дм³ питьевой воды вносят 20 г мелко измельченного агара и нагревают до кипения. После растворения агара смесь в горячем состоянии фильтруют через ватный фильтр, разливают в колбы по 50-100 см³, закрывают ватными пробками и стерилизуют.

Для определения количества протеолитических бактерий проводят посев по 1 см³ каждого из выбранных разведений продукта на чашки Петри и заливают молочным агаром. Посевы выдерживают в термостате при 30 °С в течение 48 ч и после этого подсчитывают число выросших колоний протеолитических бактерий (с широкими зонами просветления мюла).

Способностью расщеплять белки обладают также плесени и актиномицеты. Многие протеолитические микроорганизмы образуют фермент липазу, вызывающий распад жиров. Наиболее выраженной липолитической способностью обладают плесени, флюоресцирующие палочки и другие бактерии рода *Pseudomonas*.

10.2. МАСЛЯНОКИСЛЫЕ БАКТЕРИИ

Они являются возбудителями маслянокислого брожения, в результате которого молочный сахар и соли молочной кислоты (лактаты) расщепляются с образованием масляной, уксусной, пропионовой, муравьиной кислот, этилового, бутилового, пропилового спиртов. Они способны расщеплять белки и усваивать азот из белков, аминокислот, аммиака, а некоторые представители — молекулярный азот из воздуха.

Маслянокислые бактерии относят к роду *Clostridium*, объединяющему 25 видов почвенных анаэробов (*Cl. pasteurianum*, *Cl. butyricum*, *Cl. tyrobutyricum* и др.), которые ранее объединяли под общим названием *Cl. amylobacter*.

Маслянокислые бактерии представляют собой грамположительные палочки цилиндрической формы размером 5-12 x 0,5-1,5 мкм, подвижные до момента спорообразования. Капсул не образуют, споры располагаются терминально и субтерминально. Клетки имеют вид булавы, теннисной ракетки или ложки (рис. 31). Споры выдерживают кипячение в течение 2-3 мин, при пастеризации не погибают. Перед образованием спор в цитоплазме клеток накапливается гранулеза — крахмалоподобное вещество, окрашивающееся йодом в синий цвет.



Рис. 31. Маслянокислые бактерии

Маслянокислые бактерии являются облигатными анаэробами. Особенности развития этих микроорганизмов являются бурное газообразование и неприятный запах масляной кислоты. Оптимальная температура развития 30-35 °С, температурные пределы роста 8-45 °С.

В учебной лаборатории культуру маслянокислых бактерий получают на картофельной среде. В небольшую длиннокорлую колбу или высокую пробирку вносят несколько кусочков неочищенного картофеля, заливают водой на 3/4 объема, добавляют 1-2 г. мела и пастеризуют при 80 °С в течение 10 мин, после чего термостатируют при 37 °С. Через 1-2 сут развивается маслянокислое брожение.

В сыроделии количественный учет спор маслянокислых бактерий (мезофильных анаэробных лактатобразующих бактерий) проводят на плотной лактатно-ацетатной селективной среде (гл. 18).

Количественный учет маслянокислых бактерий производят также методом предельных разведений, высевая исследуемый материал в пробирки со стерильным цельным молоком или с обезжиренным молоком и парафином (1-2 г). После посева пробирки нагревают в водяной бане в течение 10 мин при температуре 90 °С, охлаждают до 30 °С и выдерживают в термостате в течение 3 сут. при температуре 30 °С.

Наличие маслянокислых бактерий определяют по образованию газа, запаху масляной кислоты, наличию в микроскопическом препарате крупных спорных палочек, дающих положительную реакцию на гранулезу. Гранулеза — крахмалоподобное вещество, являющееся цитоплазматическим включением и окрашивающееся йодом (раствором Люголя) в синий цвет.

Клостридии обладают хорошо выраженной протеолитической и сахаролитической активностью. Сбраживают молочный сахар, усваивают соли молочной кислоты (лактаты) с образованием масляной, уксусной, пропионовой, муравьиной кислот, небольшого количества этилового спирта и большого количества газов CO₂ и H₂. В результате обильного газообразования они могут вызывать порок позднее вспучивание сыров.

Кроме анаэробных клостридий маслянокислое брожение могут вызывать бактерии рода *Pseudomonas*, особенно флюоресцирующие палочки.

10.3. ЭНТЕРОКОККИ

Энтерококками называют молочнокислые стрептококки кишечного происхождения, т. е. они являются представителями нормальной микрофлоры кишечника человека и животного и выделяются в окружающую среду в довольно значительных количествах (в 1 г фекалий до 10⁸-10⁹ жизнеспособных особей), но примерно в 10 раз меньше, чем бактерий группы кишечных палочек (БГКП). В настоящее время энтерококки считаются вторым после БГКП санитарно-показательным

микроорганизмом при исследовании воды водоемов, особенно проб воды колодезей, плавательных бассейнов, сточных вод, почвы, предметов обихода.

К энтерококкам относят два основных вида кокков семейства Streptococcaceae, рода Enterococcus: *Ent. faecalis* (биовары *Ent. liquefaciens* и *Ent. zymogenes*) и *Ent. fecium* (биовар *Ent. bovis*).

В этот род внесены другие виды, ранее относившиеся к роду Streptococcus: *E. durans*, *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. malodoratus*, *E. cecorum*, *E. dispar*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. saccharolyticus*, *E. seriolicida* и *E. solitarius*. Таким образом, род Enterococcus объединяет 16 видов микроорганизмов.

Биовар *E. liquefaciens* часто является обитателем молочной железы, поэтому его называют маммококком (от лат. *Glandula mamma* – железа молочная).

Энтерококки представляют собой диплококки овальной или круглой формы размером 0,6-2 x 0,6-2,5 мкм, иногда располагающиеся цепочками, грамположительны, спор и капсул не образуют, неподвижные. Факультативные анаэробы, хорошо размножаются на простых питательных средах, но при выращивании необходимо пользоваться средами с ингибиторами, подавляющими сопутствующую флору (бактерии группы кишечных палочек, протей и др.). Лучший рост наблюдается при добавлении в среду глюкозы, дрожжевых препаратов и других стимуляторов роста. При культивировании в жидких питательных средах образуется осадок и наблюдается диффузное помутнение. На плотных средах колонии энтерококков мелкие, серовато-голубые, прозрачные, круглые с ровными краями, выпуклые, с блестящей поверхностью. На кровяном агаре в зависимости от биовара они могут давать гемолиз (*Ent. liquefaciens*), изменение цвета вокруг колоний на зеленовато-бурый, так как гемоглобин превращается в метгемоглобин (*Ent. faecalis*). Оптимальная температура роста 37 °С, пределы – 10-45 °С.

Для определения энтерококков используется молочная среда с полимиксином по Калине. На 100 см³ 1,5 % питательного агара (МПА) вносят глюкозы – 1 г, дрожжевого диализата (экстракта, автолизата) – 2 см³. Стерилизуют при 112 °С 20 мин; pH 6,0. Перед разливом в чашки Петри добавляют на 100 см³ среды: кристаллического фиолетового – 1,25 см³, 0,01 % водного раствора; сухого вещества 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида (ТТХ) – 10 мг; стерильного обезжиренного молока – 10 см³; полимиксина – 200 ед/мл.

Типичные колонии энтерококков имеют на этой среде округлую форму, ровные края, блестящую поверхность, диаметр 1,5-2 мм, красноватую окраску с зоной протеолиза на светло-голубом фоне.

Энтерококки являются хемоорганотрофами, метаболизм у них бродильного типа, разлагают глюкозу и маннит до кислоты и газа, но не обладают каталазной активностью (в отличие от других грамположительных кокков). По антигенной структуре они однородны и относятся к группе D по классификации Ленсфильд.

Отличительные признаки энтерококков от мезофильных молочнокислых стрептококков по тестам Шермана приведены в табл. 18.

18. Дифференциация энтерококков от стрептококков

Признак	Энтерококки	Стрептококки
Температурные пределы роста, °С	10-45	10-41
Рост: при pH 9,6	+	-
в бульоне с 40 % желчи	+	-
в бульоне с 6,5 % хлорида натрия	+	-
в молоке с 1 % метиленового синего	+	-
Термостойкость при 60°С в течение 30 мин	+	-

Примечание: «+» - наличие признака; «-» - отсутствие признака.

Энтерококки довольно устойчивы к физическим и химическим факторам, что и было положено в основу дифференциации энтерококков от других стрептококков, входящих в нормальную микрофлору человека и вызывающих заболевание верхних дыхательных путей. Помимо устойчивости к температуре (легко переносят нагревание до 60 °С в течение 30 мин) энтерококки резистентны к действию активного хлора, некоторых антибиотиков, красителей и др.

Дифференциацию *Ent. faecalis* от *Ent. faecium* проводят по способности ферментировать глицерин: *Ent. faecalis* расщепляет глицерин в аэробных и анаэробных условиях, в то время как *Ent. faecium* только в аэробных. Для дифференциации видов энтерококков рекомендовано свыше 30 биохимических тестов: ферментация сорбита, маннита, арабинозы, редукция ТТХ, пептонизация молока и др. Необходимость разделения энтерококков на виды связана с их неодинаковой распространенностью у людей и животных. Однако в повседневной практике всех представителей энтерококков считают санитарно-показательными микроорганизмами.

Будучи термостойкими, они составляют значительную часть остаточной микрофлоры пастеризованного молока и играют определенную роль при созревании сыра. *Ent. durans* как ружебом применяют в составе закваски при производстве некоторых сыров. В нашей стране проводят исследования о возможности использования *Ent. faecium* в составе закваски для кисломолочных продуктов. В остальных случаях энтерококки являются нежелательными микроорганизмами в молоке и молочных продуктах. Особенно технически вредными являются маммококки (*Ent. liquefaciens*), которые выделяют сычужный фермент,

вызывают прогоркание молочных продуктов и преждевременное свертывание молока.

10.4. ТЕРМОУСТОЙЧИВЫЕ МОЛОЧНОКИСЛЫЕ ПАЛОЧКИ

Эти микроорганизмы могут выдерживать кратковременное нагревание в молоке при температуре 85-90 °С, иногда выше, что является важным отличительным признаком этих бактерий от других видов термофильных молочнокислых палочек.

Клетки представляют собой средних размеров или крупные палочки, располагаются одиночно или цепочками (рис. 32), часто с выраженными зернами в цитоплазме. По Граму красятся положительно, спор и капсул не образуют, неподвижны.

Термоустойчивые бактерии являются факультативными анаэробами, на обычных средах не растут. Хорошо растут в обезжиренном молоке, а также на агаре с гидролизованным молоком.

В отличие от термофильных лактобактерий, используемых в молочной промышленности, термоустойчивые палочки на агаре с гидролизованным молоком образуют поверхностные колонии более крупные, локонообразные или зернистые, с темным центром. Глубинные колонии мелкие, темные или желтовато-бурые, иногда с короткими отходящими нитями. Растут при температуре от 20 до 65 °С, оптimum 45-55 °С.

Термоустойчивые палочки свертывают молоко в течение 8-10 ч, предельная кислотность достигает 150-220 °Т. При сквашивании молока образуется ровный слизистый или неслизистый сгусток, без газа. Растут в среде с содержанием 2-3 % NaCl, 30-40 % желчи. Устойчивы к действию дезинфицирующих средств, применяемых в молочной промышленности, что затрудняет борьбу с ними. Обладают антагонистической активностью по отношению к кишечным палочкам.

В результате жизнедеятельности термоустойчивых палочек происходит интенсивное кислотообразование, обуславливающее порк творога, сметаны, обыкновенной простокваши - излишне кислый вкус. Могут вызывать тягучесть и нечистый неприятный вкус.

Термоустойчивые молочнокислые бактерии обнаруживают в сыром молоке, в молоке, пастеризованном при 74-76 °С с выдержкой 15-20 с и при 80-85 °С с выдержкой 5-10 мин; на оборудовании, в кисломолочных продуктах и в закусках.

Для контроля пастеризованного молока

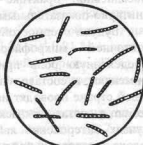


Рис. 32. Термоустойчивые молочнокислые палочки

и сливок на наличие термоустойчивых палочек готовят разведения исследуемых проб в стерильном растворе хлористого натрия. Полученные разведения пастеризованного молока или сливок засевают в стерильное обезжиренное молоко (до 6-го разведения). Посевы помещают в термостат с температурой 42 °С и выдерживают 3 сут.

Из образовавшихся сгустков готовят бактериоскопические препараты, микроскопируют их и устанавливают наличие или отсутствие в них термоустойчивых палочек.

Для обнаружения термоустойчивых молочнокислых палочек на технологическом оборудовании стерильным тампоном, смоченным стерильным раствором хлористого натрия, протирают исследуемый участок оборудования. Тампон опускают в пробирку со стерильным молоком и выдерживают 16-24 ч при 42 °С. После культивирования просматривают микроскопические препараты, приготовленные из молока, и устанавливают наличие термоустойчивых молочнокислых палочек.

10.5. БАКТЕРИОФАГИ

Представляют собой разнообразно устроенные ДНК- или РНК-содержащие вирусы, являющиеся внутриклеточными паразитами бактерий. Они вызывают лизис (растворение) бактерий, используемых при производстве молочных продуктов, в результате чего увеличиваются сроки выработки продукта, ухудшается его качество.

При производстве кисломолочных продуктов наибольшее значение имеют фаги, поражающие мезофильные молочнокислые стрептококки: *Lac. lactis*, *Lac. diacetylactis*, *Lac. cremoris*. Обнаружены бактериофаги, поражающие *Str. thermophilus* и молочнокислые палочки. Однако среди этих микроорганизмов бактериофаги встречаются очень редко.

Цикл развития бактериофагов показан на рис. 33. При попадании фаговой частицы в культуру бактерий она адсорбируется на бактериальной клетке и при помощи протеолитического фермента разрывает клеточную стенку. Затем белковая оболочка фага сокращается и ДНК впрыскивается в цитоплазму бактериальной клетки. В клетке начинается синтез ДНК фага и его белка. Одновременно подавляется бактериальная генетическая система. В дальнейшем образуются вегетативные фаговые частицы, а через 30-60 мин стенка бактериальной клетки набухает и прорывается, при этом освобождается до 100 новых частиц, которые могут инфицировать 100 новых бактериальных клеток. Так продолжается до тех пор, пока не лизируются все чувствительные клетки бактерий.

Благоприятные условия для размножения фагов находятся в диапазоне температур от 8 до 46 °С. Основными условиями, способствующими размножению бактериофага, являются непрерывное

ведение технологического процесса, кислая реакция среды, добавление CaCl_2 , разбрызгивание сыворотки, перемешивание.

Основными условиями, подавляющими развитие бактериофага, служат внесение в молоко сычужного фермента, обработка оборудования УФ-лучами, раствором хлорной извести или другими моюще-дезинфицирующими растворами.

Различают две разновидности фагов: вирулентные и умеренные. При инфекции вирулентными фагами их цикл размножения завершается лизисом бактериальной клетки и выходом фаговых частиц. Умеренные фаги в бактериальной клетке не размножаются, в виде профагов встраиваются в генетический аппарат клетки, не принося ей вреда. При этом возможно одновременное деление клетки-хозяина и профага.

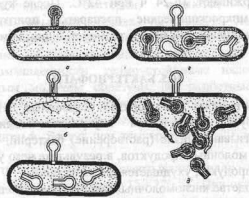


Рис. 33. Цикл развития бактериофага:

а - адсорбция бактериофага на поверхности клетки; б - внедрение ДНК фага в цитоплазму клетки; в - синтез ДНК фага и его белка; г - образование новых частиц фага; д - лизис бактериальной клетки и освобождение фаговых частиц

Вновь образовавшиеся клетки бактерий также не лизируются, и это состояние сожительства клетки и профага может сохраняться на протяжении многих поколений бактерий.

Клетки бактерий, а также их культуры, содержащие профаг, называют лизогенными. Профаг в клетке хозяина может погибнуть или под влиянием внешних индуцирующих воздействий может вновь стать вирулентным, способным размножаться.

Лизогенные штаммы молочнокислых бактерий являются основным источником попадания профагов в производственные закваски, которые в дальнейшем размножаются в микрофлоре полуфабрикатов, продуктов, оборудования, молочной сыворотки и др.

Большое практическое значение имеет специфичность фагов, т.е. способность их размножаться в определенных видах бактерий. Такие фаги и клетки бактерий называют гомологичными.

Специфичные бактериофаги могут лизировать один и даже восемь штаммов одного вида микробов. Установлена также различная фагочувствительность штаммов бактерий, которые могут лизироваться одним или несколькими штаммами бактериофагов. В связи с этим в лабораториях, разрабатывающих закваски, определяют наличие бактериофага в молоке и чувствительность заквасочных штаммов к бактериофагу.

Наличие бактериофага в молоке или закваске устанавливают посевом их в стерильное обезжиренное молоко с добавлением раствора метиленового голубого. Если в процессе культивирования после обезжиривания метиленового голубого через 4-5 ч снова наблюдается посинение молока, то это указывает на наличие бактериофага.

Для проверки штаммов молочнокислых бактерий на чувствительность к бактериофагу исследуемую культуру ($0,1 \text{ см}^3$) наносят на поверхность пластинчатого агара с гидролизанным молоком и тщательно распределяют ее шпатель по поверхности среды так, чтобы в дальнейшем после термостатирования можно было получить сплошной рост культуры (газон). На заселенную питательную среду микропипеткой наносят в разных местах по $0,01 \text{ см}^3$ фильтрата фага и его разведений (до 5-7). Затем чашки термостатируют при температуре 30°C в течение 17-18 ч, после чего отмечают наличие или отсутствие роста колоний бактерий в месте нанесения капель фильтрата фага.

Если культура чувствительна к фагу, то на месте нанесения капель фильтрата появляются зоны отсутствия роста исследуемой бактериальной культуры — так называемые «негативные» колонии.

Фаги устойчивы к воздействию высоких температур, они выдерживают режимы пастеризации молока при 75°C в течение 15 с.

Они хорошо переносят замораживание и длительное хранение (годами) при низких температурах в высушенных субстратах. 1%-ный раствор фенола не оказывает на них заметного действия, 1%-ный раствор формалина инактивирует фаг через несколько минут. Фаги обладают высокой чувствительностью к кислотам. Ультрафиолетовые лучи и ионизирующая радиация вызывают их инактивацию, а в более низких дозах — мутации.

Бактериофаги имеют широкое распространение. Их можно встретить в почве, фекалиях и сточных водах. Поэтому первичное загрязнение молока происходит обычно на ферме. Другими источниками загрязнения являются воздух, зараженная фагами вода, а также недостаточно вымытые и продезинфицированные емкости.

Для борьбы с бактериофагами чаще применяют асептическое выращивание заквасок, частую смену штаммов бактерий в закваске, использование питательных сред, тормозящих деятельность фагов, и др.

Асептическое изготовление заквасок предусматривает абсолютную стерильность, достаточно высокое нагревание молока (не меньше 90 °С), самую тщательную мойку и дезинфекцию всех установок для производства заквасок. Закваски необходимо использовать в течение нескольких дней, а затем применять другую закваску с очень похожими свойствами. Для смены необходимо иметь от 3 до 8 заквасок.

Применение питательных сред, подавляющих развитие бактериофага, основано на том, что адсорбция фагов зависит от присутствия кальция. При использовании свободных от кальция питательных сред можно значительно уменьшить адсорбцию бактериофагов на клетках хозяина. Это объясняется тем, что частицы фага и бактерии имеют одинаковый отрицательный электрический заряд и в отсутствие ионов кальция они взаимно отталкиваются, так как ионы Ca^{++} сообщают клетке положительный заряд.

В питательную среду можно добавлять, так называемое, иммунное молоко, т. е. молоко, полученное от коров, иммунизированных бактериофагами, и содержащее специфические противофаговые антитела.

Кроме того, необходимо осуществлять мойку, дезинфекцию и другие санитарно-гигиенические мероприятия, уменьшающие загрязнение производственных помещений и оборудования бактериофагами.

ПАТОГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ, ВСТРЕЧАЮЩИЕСЯ В МОЛОКЕ И МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ

11.1. ВОЗБУДИТЕЛИ ПИЩЕВЫХ ОТРАВЛЕНИЙ

11.1.1 Понятие о пищевых токсикозах и токсикоинфекциях

Пищевые отравления микробной этиологии условно подразделяют на пищевые токсикозы и токсикоинфекции.

Пищевыми токсикозами (интоксикациями) называют пищевые отравления, связанные с употреблением в пищу продуктов, в которых накопился *экзотоксин* в результате жизнедеятельности токсинообразующих микроорганизмов.

После употребления человеком продуктов, содержащих экзотоксины, последний всасывается через желудочно-кишечный тракт в кровь и разносится по всему организму. При этом поражаются в первую очередь сердечно-сосудистая и центральная нервная системы. Появляются головные боли, головокружение, нарушаются зрение, функции сердечно-сосудистой системы и др. Позже появляются признаки нарушения функций желудочно-кишечного тракта рвота, диарея, боль в области желудка и др.

Инкубационный период при токсикозах короче, чем при пищевых токсикоинфекциях, и составляет несколько часов.

Возбудителями пищевых токсикозов являются патогенные стафилококки, стрептококки, возбудитель ботулизма и токсигенные грибы. Токсикозы грибного происхождения называют микотоксикозами.

Пищевые токсикоинфекции - острые кишечные заболевания, возникающие в результате употребления пищевых продуктов, содержащих большое количество живых микробов.

Попав в желудочно-кишечный тракт человека, одни микробы погибают, а другие проникают в лимфатические узлы кишечника и там разрушаются, высвобождающийся *эндоксин* вызывает патологические изменения в стенке кишечника и оказывает токсическое воздействие на центральную нервную систему. Болезнь обуславливают и другие факторы патогенности, так как возбудители токсикоинфекций являются условно-патогенными или патогенными микроорганизмами. Заболевание проявляется рвотой и острой диареей. Позже появляются признаки поражения центральной нервной системы головные боли, головокружение, быстрая утомляемость и др. Инкубационный период продолжается несколько часов, редко более суток.

Пищевые токсикоинфекции вызывают бактерии родов *Salmonella*,

Escherichia, *Proteus*, *Clostridium* (*Cl. perfringens*), *Bacillus* (*Bac. cereus*), иногда - энтерококки, кампилобактеры и др.

11.1.2. Возбудители пищевых токсикозов

Патогенные стафилококки. Стафилококки впервые выделены из гноя фурункула человека Л. Пастером в 1880 г. Их относят к семейству *Micococcaceae*, роду *Staphylococcus*, который представлен 28 видами. Различают сапрофитные, условно-патогенные и патогенные виды стафилококков. Сапрофитные виды содержатся в воздухе, почве, воде, на поверхности растений. Условно-патогенные и патогенные обитают в организме людей и животных: на коже и слизистых оболочках. Патогенные стафилококки часто обуславливают гнойно-воспалительные процессы — маститы, флегмоны, нагноения ран и др. В связи с этим их называют пиогенными или гноеродными. Они также вызывают пищевые токсикозы у людей. Заболевания возникают часто в результате употребления молока и молочных продуктов, содержащих экзотоксины этих микроорганизмов.

Различают 3 основных вида стафилококков: *Staph. aureus* - золотистый, *Staph. epidermidis* - накожный, *Staph. saprophyticus* - сапрофитный.

Стафилококки представляют собой круглые клетки, располагающиеся в виде скоплений, напоминающих виноградные грозди. Они неподвижны, спор и капсул не образуют, красятся всеми анилиновыми красителями, грамположительны (рис. 34).

Стафилококки - факультативные анаэробы, неприхотливы к питательным средам и развиваются при температуре от 10 до 43 °C (оптимум 32-37 °C). Хорошо развиваются в слабощелочной среде (рН 7,2-7,6), однако рост возможен и в слабокислой среде.

На МПБ стафилококки вызывают помутнение среды и выпадение обильного осадка. В пробирках нередко появляются пристеночное серовато-белое кольцо и такая же пленка.

На МПА бактерии растут в виде выпуклых, с ровными краями колоний диаметром от 1 до 4 мм. При 20-25 °C, доступе кислорода и рассеянном свете стафилококки вырабатывают пигменты

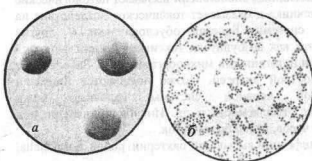


Рис. 34. *Staphylococcus aureus*: а - колония; б - клетки

золотистого (*Staph. aureus*), белого (*Staph. epidermidis*) или лимонно-желтого (*Staph. saprophyticus*) цвета. Пигменты не растворяются в воде, поэтому в цвет пигмента окрашиваются колонии, а питательная среда остается бесцветной.

При росте на МПЖ через несколько дней (обычно на пятый день) наблюдается разжижение среды. Свернутую кровяную сыворотку медленно разжижают. Молоко свертывают и пептонизируют.

Стафилококки расщепляют лактозу, декстрозу, сахарозу, мальтозу, маннит. Продуцируют каталазу, уреазу, аммиак и водород.

Патогенные стафилококки продуцируют пять типов экзотоксинов: летальный, вызывающий гибель животных; гемолитический, лизирующий эритроциты; лейкоцидин, разрушающий лейкоциты; некротический, вызывающий омертвление тканей; энтеротоксин, обуславливающий возникновение пищевых токсикозов.

Наиболее патогенным является золотистый стафилококк, который выделяет все виды токсинов. *Staph. epidermidis* является условно-патогенным, т. е. его некоторые штаммы могут обладать способностью к токсинообразованию. Сапрофитный стафилококк патогенными свойствами не обладает.

Для отличия патогенных от сапрофитных стафилококков изучают комплекс признаков, представленных в табл. 19.

Среди неспорообразующих микробов стафилококки наиболее устойчивы к различным физическим и химическим факторам. В высушенных субстратах они сохраняются до 6 мес, при кипячении погибают мгновенно. В то же время энтеротоксин разрушается при кипячении в течение 30 мин, т. е. токсин может оставаться в молоке после термической обработки, когда стафилококки, его продуцирующие, под действием высоких температур отмирают. Такое молоко может вызывать стафилококковые токсикозы.

19. Дифференциация патогенных стафилококков от сапрофитных

Признак	Стафилококки	
	патогенные	непатогенные
Пигмент	Золотистый, реже белый	Лимонно-желтый, иногда белый
Разжижение желатина	+	±
Ферментация маннита в анаэробных условиях	+	-
Коагуляция плазмы крови	+	±
Растворение эритроцитов (гемолиз)	+	±
Образование токсинов	+	-
Термостабильная ДНК-аза	+	-

Стафилококки чувствительны к анилиновым красителям и антибиотикам. Они погибают при воздействии 5%-ного раствора фенола

в течение 15-30 мин. Имеются штаммы патогенных стафилококков, способные развиваться на субстратах, содержащих 6-12 % NaCl, и вызывать токсикозы при употреблении сильно соленых продуктов.

В связи с тем, что основным источником обсеменения сборного молока стафилококками является молоко, полученное от коров, больных маститом, необходимо выявлять больных животных, особенно с субклиническими формами маститов, и не допускать смешивания маститного и сборного молока.

Источником обсеменения молока патогенными стафилококками могут быть люди с гнойничковыми поражениями кожи (фурункулами, абсцессами, нагноившимися ранами и царапинами), а также больные ангиной. Такие люди не должны допускаться к работе на пищевых предприятиях.

В целом профилактика пищевых интоксикаций стафилококковой этиологии сводится к предотвращению обсеменения продуктов патогенными стафилококками, а также к недопущению нарушения сроков реализации готовой продукции.

Патогенные стрептококки. Впервые их выделил и определил патогенность для человека Л. Пастер в 1880 г. Они относятся к семейству Streptococcaceae, роду Streptococcus.

Род представлен 38 видами, которые с учетом экологических, ферментативных и других особенностей подразделены на четыре условные группы: *пиоциenne*, или гноеродные (Str. pyogenes, Str. agalactiae, Str. dysagalactiae, Str. equi и др., всего 8 видов); **стрептококки ротовой полости** (Str. pneumoniae, Str. oralis, Str. anginosus и др., всего 18 видов); **анаэробные стрептококки** (Str. hansenii, Str. morbillosus, Str. parvulus и Str. pleomorphus) и группа **другие стрептококки** (Str. thermophilus, Str. uberis, Str. bovis, Str. acidominimus и др., всего 8 видов).

Патогенные стрептококки чаще обуславливают маститы (Str. agalactiae, Str. dysagalactiae), гнойно-воспалительные процессы, сепсис (Str. pyogenes), острые и хронические инфекционные болезни (Str. equi, Str. pneumoniae). Причиной пищевых токсикозов являются в основном возбудители маститов.

Патогенные стрептококки образуют такие же токсины, что и патогенные стафилококки, однако пищевые токсикозы стрептококковой этиологии встречаются крайне редко.

Стрептококки представляют собой неподвижные грамположительные кокки, имеющие форму шара диаметром 0,8-1 мкм. Спор и капсул, как правило, не образуют. В процессе деления формируются короткие или длинные цепочки.

Стрептококки плохо растут на обычных питательных средах. Их культивируют на средах с добавлением сыворотки крови и глюкозы. На МПА вырастают точечные бесцветные колонии, на МПБ вызывают

небольшое помутнение и образование осадка.

На кровяном агаре отдельные штаммы стрептококков (Str. equi, Str. pyogenes) образуют вокруг колоний прозрачную зону гемолиза (β-гемолиз). Возбудитель пневмонии (Str. pneumoniae) образует вокруг колоний зеленовато-серую зону просветления (α-гемолиз). Отдельные штаммы Str. dysagalactiae оказываются негемолитическими (γ-гемолиз). На полужидком агаре с сывороткой крови стрептококки дают равномерный рост по всей глубине среды в виде облачка.

Патогенные стрептококки проявляют минимальную биохимическую активность по сравнению с сапрофитами. Они относительно резистентные микроорганизмы. В высушенном состоянии могут сохраняться в течение 4-6 мес. Под действием прямых солнечных лучей погибают через 2-3 ч, 3-5%-ный раствор фенола, 2%-ный раствор формалина убивают стрептококки через 15 мин. При кипячении погибают немедленно, режимы пастеризации молока обезвреживают патогенные стрептококки.

Источником пищевых отравлений стрептококковой этиологии могут служить продукты, полученные от животных, больных маститом и септицемией, а также продукты питания, загрязненные лицами, имеющими гнойничковые заболевания. Поэтому средства и методы профилактики стрептококковых интоксикаций те же, что и при стафилококковых токсикозах.

Возбудитель ботулизма. Ботулизм - это пищевое отравление, относящееся к числу самых тяжелых заболеваний, связанных с употреблением пищи, инфицированной бактериями *C. botulinum* и содержащей ботулинический нейротоксин. Ботулизм при запоздалом распознавании и лечении часто заканчивается смертельным исходом.

Первое описание ботулизма принадлежит немецкому врачу Кернеру. В 1817 г. им были опубликованы данные о заболевании, возникшем после употребления в пищу колбасы. Отравление «колбасным» ядом исследователь назвал ботулизмом (от лат. *botulus* — колбаса). Возбудитель ботулизма был выделен позднее в 1894 г. бельгийским бактериологом Ван-Эрменгемом.

Возбудитель ботулизма относится к роду клостридий (*Clostridium*). В настоящее время известно 7 сероваров возбудителя: А, В, С, D, E, F, G, различающихся по антигенной структуре, образуемыми токсинами и рядом других признаков.

Клостридии представляют собой крупные палочки длиной 3,4-8,6 мкм и шириной до 1,3 мкм. Возбудитель подвижен до момента спорообразования, перитрих, по Граму красится положительно, капсул не образует. Споры располагаются в клетке субтерминально. Палочка со спорой по виду напоминает теннисную ракетку, ложку, лодочку (рис. 35).

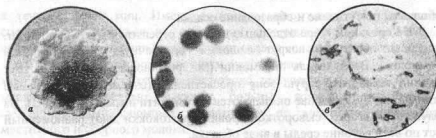


Рис. 35. *Clostridium botulinum*: а, б – колонии; в – клетки

Палочка ботулизма является строгим анаэробом. Условия благоприятны для размножения возбудителя ботулизма и накопления токсина, создаются в герметически закрытых банках (консервах), в глубинных участках твердых пищевых продуктов.

Клостридии ботулизма культивируются на казеиновых или мясных питательных средах, в жидкие мясные среды рекомендуется добавлять мясной или печеночный фарш, в казеиновые - отварное пшено. На плотных средах — кровяном, печеночном или сахарном агаре - растут в виде небольших прозрачных колоний с ровными или изрезанными краями (рис.35). На кровяном агаре вокруг колонии образуется прозрачная зона гемолиза. Оптимальная температура роста 30-40 °С, рН 7,2-7,4.

Клостридии сбраживают глюкозу, фруктозу и некоторые другие углеводы, но сахаролитические свойства непостоянны. По протеолитическим свойствам серовары неоднородны. Протеолитические штаммы способны расплавлять кусочки печени или мясного фарша на средах типа Китта-Тароци.

Возбудитель ботулизма образует два основных типа токсинов: нейротоксин и гемолизин.

Нейротоксин (ботулинический токсин) продуцируют все серовары, он определяет клиническую картину интоксикации при ботулизме. Токсин выделяют палочковидные формы возбудителя. Он представляет собой самый сильнейший из известных в мире ядов. Одна стомиллионная доля грамма этого токсина убивает морскую свинку, три десятиллионные доли грамма смертельны для человека массой 76 кг.

Токсин *Cl. botulinum* представляет собой простой белок, состоящий только из аминокислот. Молекулярная масса токсина варианта Е равна примерно 350 000, серовара F - 238 000.

Токсин полностью инактивируется в пищевом продукте при нагревании до 80 °С в течение 30 мин и в течение соответственно меньшего времени при 100 °С. Поэтому обычная кулинарная обработка продукта приводит к его разрушению.

Некоторые штаммы *Cl. botulinum* секретируют токсин гемолизин,

обладающий способностью лизировать эритроциты.

Споры возбудителя устойчивы к воздействию внешней среды. Они сохраняют жизнеспособность при таких условиях, когда погибают все другие живые организмы. Споры выдерживают кипячение в течение 5-6 ч, сохраняют жизнеспособность в спирте в течение 2 мес, противостоят действию кислот и формалина, устойчивы к замораживанию.

В отличие от спор вегетативные клетки почти так же чувствительны к различным воздействиям, как и клетки грамотрицательных бактерий.

Возбудитель ботулизма широко распространен в природе и часто обнаруживается в почве, силосе, на корнеплодах. Являясь нормальными обитателями кишечника млекопитающих (животных, человека) и рыб, клостридии ботулизма с испражнениями выделяются в почву и воду, где длительно сохраняются в виде спор. Отсюда возможно попадание микробов в сырье для приготовления различных консервов.

Споры возбудителя, попадающие в консервы с частицами почвы, при недостаточной термической обработке в условиях герметизации прорастают и выделяют токсин. Очень большую опасность для заражения представляют пластинчатые и трубчатые грибы, так как полное освобождение их от частиц почвы затруднено из-за особенностей строения шляпок.

В отличие от доброкачественной пищи продукты, содержащие возбудителя ботулизма, могут иметь специфический запах прогорклого масла, «циплющий» вкус, становятся бледными на вид, рыхлой консистенции. Металлические банки с зараженными консервами часто вздуваются (бомбаж). Однако все эти признаки непостоянные, и пищевые продукты с большой концентрацией ботулинического токсина могут на вид ничем не отличаться от доброкачественных.

Человек заражается при употреблении пищи, содержащей токсин и живых микробов, с размножением которых количество токсина увеличивается. Как правило, заболевают не все, употреблявшие в пищу твердые инфицированные продукты, а примерно треть из них. Это зависит от гнездового расположения токсина в этих продуктах.

Для предупреждения возникновения ботулизма на пищевых предприятиях следует строго выполнять санитарно-гигиенические правила, не допускать обсеменения пищевых продуктов возбудителем.

В консервном производстве необходимо строго соблюдать технологические режимы стерилизации. Все подозрительные продукты перед их употреблением необходимо подвергать тепловой обработке.

Возбудители микотоксикозов. Микотоксикозы (от греч. *myces* - гриб и *toxicon* - яд) - интоксикации людей, возникающие при употреблении в пищу продуктов, пораженных токсическими грибами.

Отравление вызывается ядовитыми метаболитами, образующимися в грибах и субстрате в период их жизнедеятельности и накапливающимися в пищевых продуктах.

К продуктам метаболизма грибов относятся различные сложные токсические вещества, которые в зависимости от вида гриба называют по-разному: афлатоксины, охратоксины (аспергиллы), исландин, рубротоксин (пенициллы) и др.

Кроме указанных сложных веществ токсические грибы продуцируют токсичные для организма кислоты: β -нитропропионовую, койевую, аспергилловую, щавелевую и др.

Некоторые наиболее изученные микотоксикозы выделены в самостоятельные нозологические единицы и называются по роду или виду гриба, вызвавшего отравление. Так, заболевания, обусловленные грибами рода *Aspergillus*, называются аспергиллотоксикозами; *Aspergillus flavus* - афлатоксикозом; плеснями рода *Penicillium* - пенициллотоксикозом, *Penicillium rubrum* - рубротоксикозом; спорыньевыми грибами - эрготизмом и др.

При микотоксикозах поражаются все органы и системы. Микотоксикозы имеют характерные особенности: внезапность появления, короткий инкубационный период, отсутствие контагиозности. Тяжесть и клиническое проявление болезни зависят от количества яда, попавшего в организм, от длительности воздействия на организм токсических веществ грибов, возрастных и индивидуальных особенностей организма. Микотоксикозы возникают сравнительно редко. У людей они протекают, как правило, в хронической форме, у животных - в острой. Для их профилактики необходимо не допускать в пищу продуктов, пораженных плесневыми грибами.

11.1.3. Возбудители пищевых токсикоинфекций

Сальмонеллы. Пищевые отравления, вызываемые бактериями рода *Salmonella*, занимают первое место среди микробных пищевых отравлений. Микробы были названы в честь американского микробиолога Д. Сальмона, впервые выделившего в 1885 г. одного из представителей этой группы.

Род *Salmonella* относится к семейству кишечных бактерий *Enterobacteriaceae*. В настоящее время описано свыше 2,5 тыс. серологических вариантов (сероваров), из них у человека выделено более 700. Наиболее часто встречаются 15-20 вариантов возбудителей, среди которых сальмонеллы мышинного тифа (*S. typhimurium*), энтерита (*S. enteritidis*), холеры свиней (*S. choleraesuis*) и др.

В последнем издании «Определителя бактерий Берджи» (1994) все сальмонеллы отнесены к двум видам. Вид *Salmonella bongori* содержит менее 10 очень редких сероваров (в предыдущих изданиях - видов).

Все остальные 2500 сероваров, ранее называемых видами, включены в вид *Salmonella choleraesuis*, который по фенотипическим и генетическим критериям разделен на 6 подвидов: *S. choleraesuis* subsp. *arizonae*, *S. choleraesuis* subsp. *choleraesuis*, *S. choleraesuis* subsp. *diarizonae*, *S. choleraesuis* subsp. *houtenae*, *S. choleraesuis* subsp. *indica*, *S. choleraesuis* subsp. *salamae*.

В подвид входят различные серовары, которые внутри подвида *choleraesuis* имеют названия, тогда как в других подвидах серовары названий не имеют, за исключением некоторых сероваров в подвидах *salamae* и *houtenae*.

Серовары, не имеющие названий, рекомендовано обозначать с помощью антигенной формулы и указанием подвида.

В антигенной формуле отмечают при помощи условных обозначений наличие и количество различных групп антигенов (соматический О-антиген, жгутиковый Н-антиген, оболочечный или капсульный К-антиген, VI-антиген вирулентности и др.).

В подвид *S. choleraesuis* subsp. *choleraesuis* включены серовары (ранее виды): *choleraesuis*, *gallinarum*, *paratyphi A*, *pullorum*, *typhi*.

Бактерии рода *Salmonella* — это мелкие грамотрицательные палочки. Клетки имеют длину в среднем от 2 до 5 мкм и ширину 0,6 мкм. Большинство видов сальмонелл подвижны, имеют перитрихальные жгутики, капсул и спор не образуют (рис. 36).

Сальмонеллы хорошо растут на обычных питательных средах, факультативные анаэробы. Оптимальный рост наблюдается при температуре 37 °С.

На МПА сальмонеллы вызывают помутнение, на МПА образуют колонии средних размеров (диаметром 2-3 мм), трудноотличимые от колоний бактерий группы кишечных палочек. Свежеизолированные штаммы образуют круглые гладкие блестящие колонии (рис. 36).

Сальмонеллы ферментируют с образованием кислоты и часто газа глюкозу, мальтозу, маннит и сорбит.

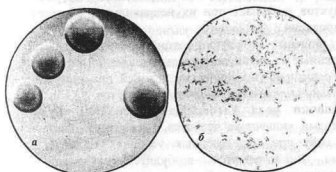


Рис. 36. *Salmonella paratyphi*: а - колонии; б - клетки

Сальмонеллы являются хемоорганотрофами, обладают дыхательным (с использованием кислорода) и бродным

(дегидрогенирование) типами метаболизма. Образуют фермент каталазу и сероводород. Индол не образуют. Проба с метиловым красным положительная. Встречаются у человека, теплокровных и холоднокровных животных, в пищевых продуктах. Патогенны для человека и многих видов животных.

Кроме пищевых токсикоинфекций, вызывают брюшной тиф, паратифы и септицемию.

Они не образуют спор, но отличаются относительно высокой устойчивостью к действию различных физических и химических факторов внешней среды, а также антибиотиков. Хорошо переносят высушивание, сохраняясь при комнатной температуре на различных субстратах в течение 2,5-3 мес.; в высушенных испражнениях животных - в течение 3-4 лет. В замороженных овощах (при минус 18 °С) сальмонеллы сохраняются в течение 2-2,5 лет.

В молочных продуктах эти микробы не только длительно сохраняются (до 3-4 мес), но и размножаются, не изменяя внешнего вида и вкусовых свойств продуктов. В масле сальмонеллы обнаруживают в течение 4 мес при хранении в комнатных условиях и 9-10 мес - в условиях холодильника. В твороге жизнеспособность сальмонелл наибольшая - до 34 мес. В воде, особенно с низким значением рН, сальмонеллы выживают до 2 мес.

Режимы пастеризации молока достаточны для инактивации сальмонелл, если первоначальная концентрация их не превышает 3×10^{12} клеток в 1 см^3 молока.

Основными источниками сальмонеллезной инфекции являются сельскохозяйственные и домашние животные, птицы.

Заражение пищевых продуктов сальмонеллами может быть различным. Если молоко инфицируется непосредственно от больных животных, то такое заражение называют первичным. Вторичное инфицирование продуктов nastупает при их неправильной обработке, хранении, транспортировании.

Профилактика пищевых токсикоинфекций должна включать мероприятия, направленные на ликвидацию сальмонеллезной инфекции, а также соблюдение санитарно-гигиенических условий при получении молока, транспортировании и хранении молочных продуктов.

Кишечные палочки рода *Escherichia* (Эшерихия). Будучи постоянными обитателями кишечника человека и животных, бактерии рода эшерихия (*E. coli*) при определенных условиях приобретают патогенные свойства и становятся возбудителями различных патологических процессов. Они обуславливают колибактериоз молодняка животных, колитэнтериты у детей, вызывают маститы и др.

Различают разновидности эшерихий: энтеропатогенные, энтероцитогенные, энтероинвазивные и энтерогеоморфические.

Типовым видом рода *Escherichia* является *E. coli*, кроме того, в этот род включены еще четыре вида: *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris* и *E. blattae*, отличающиеся по биохимическим и серологическим признакам.

Кишечные палочки, вызывающие пищевые токсикоинфекции, называют энтеропатогенными. Их часто обнаруживают в молочных, мясных и других продуктах, но пищевые отравления они вызывают сравнительно редко. Это объясняется тем, что эшерихии не всегда накапливаются в продуктах в количестве, необходимом для возникновения заболевания, а главное, тем, что сравнительно немногие штаммы кишечных палочек являются патогенными для человека.

Источники патогенных штаммов кишечных палочек - большие животные, а также люди, нарушающие санитарно-гигиенический режим на производстве молочных продуктов.

Основной токсин эшерихий - термостабильный эндотоксин, выдерживающий нагревание до 90-100 °С. Он представляет собой типоспецифичный эндотропный яд.

Кишечные палочки не обладают выраженной устойчивостью. Они обезвреживаются при режимах пастеризации молока. При 60 °С погибают через 15 мин, 1%-ный раствор фенола вызывает гибель микроорганизмов через 5-15 мин.

Для профилактики пищевых токсикоинфекций, вызываемых кишечными палочками, необходимо соблюдать правила личной гигиены работниками молочной промышленности, повышать санитарную культуру населения, предупреждать фекальное загрязнение воды и пищевых продуктов.

Бактерии рода *Proteus* (Протеус) включают четыре вида (*P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *P. myxofaciens*, *P. penneri*), относящиеся к семейству Enterobacteriaceae.

Это прямые полиморфные палочки, размером 0,4-0,8 x 1-3 мкм, грамтрицательные, подвижные за счет перитрихальных жгутиков, спор и капсул не образуют (рис. 37).



Рис. 37. *Proteus vulgaris*

По отношению к кислороду бактерии рода *Proteus* являются факультативными анаэробами, а по типу обмена веществ - хемоорганотрофами, обладающими и дыхательными и броуидальными типами метаболизма. Оптимальная температура развития 37 °С. Большинство штаммов не образуют колоний на плотных питательных средах. Они растут в виде тонкого вуалеобразного налета с образованием концентрических зон или

распространяются по влажной поверхности питательной среды в виде однородной пленки.

Бактерии ферментируют глюкозу с образованием кислоты и часто газа. Некоторые виды сбраживают глицерол, D-ксилозу, мальтозу, сахарозу и трегалозу.

Палочки рода *Proteus* осуществляют окислительное дезаминирование фенилаланина и триптофана, гидролизуют мочевину. Обычно образуют сероводород, иногда индол, восстанавливают нитраты.

Встречаются в кишечнике человека и разнообразных животных, а также в навозе, почве, загрязненных водах, в гниющих органических субстратах. Вид *P. mufocaciens* выделен только из личинки непарного шелкопряда.

Многие штаммы бактерий рода *Proteus* патогенны для человека: кроме пищевых токсикоинфекций могут вызывать инфекции мочевых путей, а также вторичные поражения, приводящие к образованию септических очагов, особенно при ожогах.

Чаше возбудителем пищевых токсикоинфекций является *Proteus vulgaris*. Он широко распространен в природе - в почве, воде, содержащем желудочно-кишечного тракта, а также в гниющих органических субстратах.

Источником пищевых отравлений являются употребляемые человеком продукты, обильно обсемененные этими микроорганизмами.

Многие штаммы *Proteus vulgaris* образуют термостабильные эндотоксины, представляющие глицидо-липоидно-полипептидные комплексы, обладающие гемолитической активностью.

Пищевые отравления обусловлены также действием высокоактивных ферментов, выделяемых *P. vulgaris* и способствующих накоплению токсических продуктов распада белков - аминов.

Бактерии рода *Proteus* устойчивы к низким температурам, переносят трехкратное попеременное замораживание и оттаивание. Режимы пастеризации молока обезвреживают возбудителя, 1%-ный раствор фенола вызывает гибель палочек протея через 30 мин.

Профилактика пищевых токсикоинфекций, обусловленных бактериями рода *Proteus*, такая же, как и при пищевых токсикоинфекциях, вызванных бактериями рода эшерихия.

Клостридии перфрингенс (*Cl. perfringens*). Токсикоинфекция, вызываемые *Cl. perfringens*, занимают третье место после пищевых отравлений сальмонеллезного и стафилококкового происхождения.

Название возбудителя связано со способностью образовывать большое количество газа, который разрывает окружающую плотную питательную среду. Термин «перфрингенс» в переводе с латинского языка означает «проламывающий», «прорывающий», «прокладывающий дорогу силой».

Вид *Cl. perfringens* разделяется на 6 сероваров: А, В, С, D, Е и F, которые различаются между собой по антигенным свойствам и специфичности образуемых ими токсинов.

Клостридии представляют собой крупные неподвижные грамположительные палочки. В организме людей и животных образуют капсулу. Медленно образуют споры (рис. 38).

Cl. perfringens - анаэроб, но может расти в присутствии небольшого количества кислорода. Микроорганизмы этого вида хорошо растут на мясных и казеиновых питательных средах. Быстрый рост наблюдается на средах, содержащих глюкозу, лактозу, мальтозу или маннозу. На плотных питательных средах образуют гладкие (S), шероховатые (R) и слизистые (M) колонии размером от 1 до 5 мм.

Cl. perfringens развивается при температуре от 15 до 50 °С. Оптимальная температура для наиболее быстрого роста составляет 37 °С.

Особенностью *Cl. perfringens* является способность к быстрому размножению. Продолжительность его регенерации составляет 10 мин. При росте в молоке образует сгусток и большое количество газа (пены).

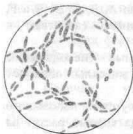
Возбудитель сбраживает глюкозу с образованием солей молочной, уксусной и масляной кислот, этилового спирта, углекислого газа и водорода, может ферментировать фруктозу, галактозу, маннозу, мальтозу, лактозу, сахарозу, рибозу, крахмал, декстрин и гликоген. Ферментация глицерина непостоянная, а маннит не ферментируется.

Cl. perfringens образует сероводород и не образует индола. Большинство штаммов восстанавливают нитраты до нитритов, разжижают желатин. Он вырабатывает несколько типов токсинов. Энтеротоксин образуется некоторыми штаммами сероваров А, С и D. Это белок с молекулярной массой 36 000. Он содержит 19 аминокислот, доминирующими являются аспарагиновая кислота, серин, лейцин и глутаминовая кислота. Это термолabileный токсин, который при температуре 60 °С за 4 мин инактивируется на 90 %, т. е. его количество уменьшается в 10 раз.



Энтеротоксин вырабатывается клетками *Cl. perfringens* при образовании спор. Вегетативные формы возбудителя чувствительны к кислороду, солнечному свету, высокой температуре, кислотам, дезинфицирующим средствам, а также многим антибиотикам, действующим на грамположительные бактерии. Они чувствительны к низким температурам (подвержены повреждению холодом на всех

Рис. 38. *Clostridium perfringens*

Рис. 39. *Bacillus cereus*

стадиях роста. Споры более устойчивы, чем вегетативные клетки. При кипячении они погибают в течение 15-30 мин.

C. perfringens широко распространен в почве, содержащем кишечника и, следовательно, может заражать многие пищевые продукты.

Профилактика пищевых отравлений, вызываемых *C. perfringens*, включает те же мероприятия, что и при пищевых токсикоинфекциях, вызываемых сальмонеллами и кишечными палочками.

Bacillus cereus - латинское слово «*cereus*» обозначает «восковой», видимо, подразумеваются крупные палочки с обрубленными концами, напоминающие восковые свечи (рис. 39). Основной средой его обитания является почва с нейтральной или слабощелочной реакцией, из которой он попадает в воздух и воду, а потом на пищевые продукты. Микроб может вызвать мастит у коров.

В результате выделения этим микроорганизмом фермента лецитиназы образуются продукты расщепления лецитина (фосфохолин и др.), оказывающие токсическое действие на макроорганизм.

Токсикоинфекции обусловлены также образованием *Bac.cereus* термостабильного энтеропатогенного, а также термолабильного нейротропного эндотоксинов.

Микроорганизм образует споры, поэтому относится к высокоустойчивым. Он часто (до 86 %) обнаруживается в пастеризованном молоке, в молочных и мясных консервах. Может развиваться при концентрации поваренной соли в субстрате до 10-12 %, сахара до 30-60 %. На жизнедеятельность *Bac. cereus* отрицательно влияет кислая реакция среды. Продукты с pH 4,5 и ниже являются неблагоприятной средой для развития этих микроорганизмов.

Профилактика направлена на устранение причин, способствующих попаданию *Bac. cereus* в молоко и молочные продукты из почвы, воздуха и воды.

11.2 ВОЗБУДИТЕЛИ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЧЕЛОВЕКА

Специфическими кишечными инфекционными болезнями являются дизентерия, холера, брюшной тиф и паратиф.

Механизм развития пищевых инфекций во многом сходен с развитием пищевых токсикоинфекций. Принципиальное различие заключается в том, что для возникновения кишечной инфекции достаточно, чтобы в пищевом продукте находилось небольшое

количество микроорганизмов, которые, попав в организм, активно размножаются в нем, вызывая специфический патологический процесс.

Пищевые же токсикоинфекции возникают при употреблении пищевых продуктов, содержащих большое количество живых бактериальных клеток, которые в последующем разрушаются, и из них освобождается эндотоксин, обуславливающий интоксикацию.

Возбудителями бактериальной дизентерии у людей являются микроорганизмы рода *Shigella*, которые вызывают заболевание и у обезьян. При этом заболевании бактерии поражают слизистые оболочки и другие ткани толстого кишечника. Клинически заболевание проявляется частым болезненным стулом с симптомами интоксикации, иногда с наличием крови в испражнениях.

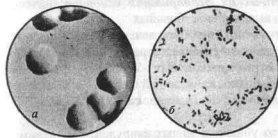
В чистой культуре возбудитель был выделен японским исследователем Шига в 1898 г., поэтому данный род бактерий получил название *Shigella*.

Этот род, относящийся к семейству кишечных бактерий (*Enterobacteriaceae*), включает четыре вида: *S.dysenteriae*, *S.flexneri*, *S.bouidii* и *S.sonnei*. Часто их определяют как подгруппы А, В, С и D соответственно. Типовым видом является *S.dysenteriae*.

Бактерии рода *Shigella* - это мелкие прямые неподвижные грамотрицательные палочки, спор и капсул не образуют (рис. 40). Факультативные анаэробы-хемоорганотрофы, обладающие дыхательным (с использованием кислорода) и броуильным типом метаболизма. Оптимальная температура развития 37 °С. Растут на обычных средах. На МПА образуют колонии двух типов S- и R- формы. Ферментируют глюкозу, маннозу, мальтозу, трегалозу, маннит, арабинозу, глицерин и другие углеводы с образованием кислоты; небольшое число штаммов образует газ.

Шигеллы не разжижают желатин, не гидролизуют мочевины, не образуют сероводорода, нидола и ацетилметилкарбинола, дают положительную реакцию с метиловым красным, восстанавливают нитраты, продуцируют фермент каталазу.

По биологическим свойствам шигеллы сходны с лактозоотрицательными штаммами эшерихий и сальмонеллами. Их дифференцируют по биохимическим

Рис. 40. *Shigella dysenteriae*: а - колонии; б - клетки

признакам и при помощи серологических реакций, т.е. по антигенной структуре.

Возбудители дизентерии могут *сохраняться* в течение 10-15 дней в почве, пищевых продуктах, на различных предметах домашнего обихода. При нагревании до 60°C погибают через 10 мин; под воздействием прямого солнечного света - через 20-30 мин; в растворах хлорной извести, хлорамина - через 5-6 мин.

Источником возбудителей дизентерии является больной человек. Особую опасность представляют хронически больные и бактерионосители, так как они не выявляются и не подвергаются лечению.

Возбудители дизентерии передаются главным образом через пищевые продукты, воду, предметы домашнего обихода, бывшие в употреблении у больного, а также путем прямого контакта через руки больных, которые не соблюдают элементарных санитарно-гигиенических правил. Поэтому кишечные инфекции называют «болезнями грязных рук».

В последнее время чаще заболевание вызывают бактерии Зонне и Флекснера. Наиболее высокая заболеваемость дизентерией регистрируется в весенне-летний период, когда создаются благоприятные условия для сохранения бактерий во внешней среде и пищевых продуктах. Это связано с увеличением количества переносчиков бактерий - мух.

Заболевание после заражения начинается через 3-5 дней. У больного повышается температура и появляются частые позывы на дефекацию, сопровождающиеся сильными болезненными спазмами кишечника. Большой испражняется до 30-50 раз в сутки, но количество фекалий очень небольшое; они имеют вид слизистых масс часто с примесью крови. Заболевание заканчивается на 7-10-й день. Если в кишечнике развиваются язвы, то заболевание приобретает затяжной, хронический характер.

В системе **профилактических мероприятий** основное значение имеют: своевременное выявление больных дизентерией и бактерионосителей; ранняя их госпитализация и лечение с целью полного освобождения организма от возбудителя; проведение санитарно-коммунального благоустройства населенных пунктов, снабжение населения доброкачественной водой, санитарный надзор за пищевыми предприятиями, борьба с мухами; повышение санитарной культуры населения.

Разработаны вакцины из убитых и живых авирулентных штаммов дизентерийных бактерий. В очагах инфекции применяется поливалентный бактериофаг, который дается больным и лицам, находившимся в контакте с больными или бактерионосителями.

Для **лечения** больных дизентерией применяют сульфаниламидные препараты (фалазол, сульгин и др.) и антибиотики (синтомицин, левомицетин, тетрациклин и др.). Рекомендуется комбинированное назначение антибиотиков и сульфаниламидных препаратов.

Возбудитель холеры - *Vibrio cholerae* - относится к семейству Vibrionaceae включающему около сорока видов вибрионов.

Другие виды вибрионов являются преимущественно водными организмами. Они обитают в морской и пресной воде, а также в ассоциациях с водными животными. Несколько видов патогенны для рыб, угреобразных и лягушек, а также для других позвоночных и беспозвоночных. Эти вибрионы называют холероподобными, паракхолерными или водными.

Холера - острое инфекционное заболевание с большой тенденцией к широкому эпидемическому распространению. Характеризуется поражением желудочно-кишечного тракта с симптомами тяжелого гастроэнтерита (нонос, рвота), интоксикацией с высокой смертностью, достигающей 40-50%.

Возбудитель болезни - холерный вибрион - был выделен Кохом в 1883 г. Поэтому микроб называют вибрионом Коха (коховская запятая), иногда - вибрионом азиатской холеры.

Холерный вибрион имеет форму палочки, изогнутой в виде запятой, длиной 1,5-4 мкм и шириной 0,2-0,4 мкм (рис. 41).

В мазках из испражнений больного клетки возбудителя располагаются скоплениями, напоминающими стайки рыб. В культурах вибрионы характеризуются большим полиморфизмом: могут встречаться в виде длинных нитей, крупных шаров, мелких гранул. Они имеют один жгутик, расположенный на конце тела, спор и капсул не образуют, по Граму красятся отрицательно.

Возбудитель - факультативный анаэроб, относится к хемоорганотрофам, обладающим дыхательным и броидильным типом метаболизма. Хорошо растет на всех питательных средах с щелочной реакцией (pH 7,6-8,0) при оптимальной температуре 37°C. В 1%-ной пептонной воде с 0,5% NaCl

вибрион дает рост в виде слабого помутнения и нежной пленки через 6-8 ч, в то время как другие микробы на этой среде вырастают только через 20-24 ч. На поверхности щелочного МПА образует круглые, прозрачные колонии с гладкой поверхностью и ровными краями.

Холерный вибрион вырабатывает протеолитические ферменты, под влиянием которых происходит разжижение желатина,

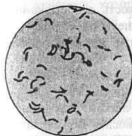


Рис. 41. *Vibrio cholerae*

свернутой сыворотки, яичного белка, фибрина и плазмы. В результате расщепления белков образуются сероводород и индол. Под действием сахаролитических ферментов возбудитель ферментирует глюкозу, мальтозу, маннит и другие углеводы с образованием кислоты без газа.

Некоторые штаммы холерных вибрионов могут продуцировать **экзотоксины**. Патогенное действие возбудителя обуславливается также эндотоксинами.

Вибрионы не обладают высокой **резистентностью**. При температуре 56°C они погибают через 25-30 мин. Хлористо-водородная и серная кислоты в разведении 1:100 000 убивают вибрионы в течение нескольких мин, а хлор в концентрации 1 мг на 1 л воды - через 15 минут. Вибрионы очень чувствительны к действию солнечного света. При низких температурах могут сохраняться в испражнениях, почве и воде от нескольких недель до 2-3 месяцев. На различных пищевых продуктах, на овощах, фруктах с щелочной или нейтральной реакцией при температуре 20-25 °C вибрионы могут сохраняться в течение 2-3 сут, но быстро погибают в кислой среде.

Единственным **источником** инфекции является больной человек - вибрионоситель. Особую опасность представляет легкая форма холеры, так как она диагностируется с большим опозданием. Заражение, как и при всех кишечных инфекциях, происходит контактным путем через загрязненные руки, пищевые продукты, воду. Плохие санитарно-гигиенические условия жизни, скученность и низкая культура населения способствуют быстрому распространению холеры (в начале 19-го века болезнь охватила большинство материков, при этом холера унесла миллионы человеческих жизней).

Заболевание обычно начинается через 2-3 дня после проникновения холерного вибриона в кишечник, но в некоторых случаях **инкубационный период** продолжается 5-6 дней, а иногда сокращается до нескольких часов.

Клиническая картина начинается с частого поноса. Испражнения обильные, водянистые; они не имеют фекального запаха, напоминают рисовый отвар и представляют собой мутную жидкость с обрывками эпителия. Почти одновременно с поносом появляется неукротимая рвота. Температура при холере в отличие от большинства инфекционных болезней падает ниже нормы. Наступает сильное обезвоживание организма, при этом наблюдаются синюшность, судороги, упадок сердечной деятельности, задержка мочеотделения, потеря голоса.

В некоторых случаях холера протекает по типу легкого энтерита с высокой температурой. Иногда наблюдается молниеносная форма, при которой смерть наступает вследствие острой интоксикации без явления поноса и рвоты.

Для специфической **профилактики** холеры применяют вакцины, приготовленные из убитых культур возбудителя. Для предохранения лиц, контактировавших с больными, персонала больниц, пищевых предприятий и работников коммунального хозяйства, обслуживающего источники водоснабжения, применяют бактериофаг.

Основными средствами борьбы с инфекцией являются раннее выявление больных и вибрионосителей, их госпитализация, выявление всех контактировавших лиц и их профилактическое лечение. Большое внимание уделяется вопросам санитарно-коммунального благоустройства населенных мест, обеспечению населения доброкачественной питьевой водой. Устанавливается строжайший санитарный контроль за пищевыми предприятиями и торговлей пищевыми продуктами. Если возникает опасность распространения заболевания из очага инфекции в другие населенные местности, устанавливается карантин, т.е. запрещение выезда населения из этого очага и въезда в него.

Для **лечения** больных применяют антибиотики тетрациклинового ряда и сульфаниламидные препараты.

Возбудители брюшного тифа и паратифов А и В (Salmonella typhi и Salmonella paratyphi А и В). Возбудитель брюшного тифа впервые был обнаружен в 1880 г. По схеме Кауфмана-Уайта S.typhi относится к группе D сальмонелл. В 1896 г. было установлено, что заболевание с симптомами брюшного тифа вызывается также микробами, которые по своим антигенным свойствам отличаются от возбудителя брюшного тифа. Эти бактерии были названы паратифозными и разделены на два вида. Возбудитель паратифа А относится к группе А сальмонелл и поэтому называется S.paratyphi А, а паратифозный В микроб относится к группе сальмонелл В и называется S.paratyphi В.

Все три возбудителя тифо-паратифозных заболеваний обладают **морфологическими, культуральными и ферментативными свойствами**, присущими бактериям рода сальмонелл (см. Возбудители токсикоинфекций).

Тифо-паратифозные бактерии образуют термостабильный **эндотоксин**, который выделяется в организме больного при гибели и лизисе бактерий. Он представляет собой глюкоидо-липидо-протеиновый комплекс.

При внутривенном или внутривибрионном введении лабораторным животным небольших доз эндотоксина у них появляются парезы, судороги, температура падает. При больших дозах животные погибают.

Бактерии брюшного тифа и паратифов обладают достаточно выраженной **резистентностью**. При нагревании до 50 °C они погибают через один час, при 58 °C - через 30 мин и при 100 °C - через 1-2 мин. 3% раствор хлорамина убивает бактерии в течение 2-3 мин. Они могут длительно сохраняться во внешней среде: в пищевых продуктах 1-3 мес,

в текучей воде - до 5-10 дней, в стоячей - до 4-х недель, в иле в колодцах в течение 4-6 мес.

Единственным **источником** тифо-паратифозных бактерий является больной человек или бактерионоситель. Заражение осуществляется разными путями: оно может произойти в результате непосредственного общения здорового человека с больными или бактерионосителями, если бактерии с испражнениями больного попадают на руки здорового человека, который заносит их с пищей в рот. Чаще заражение происходит через воду и пищевые продукты, почву, вещи, находящиеся в пользовании больного. В распространении тифо-паратифозных заболеваний существенное значение имеют мухи, которые могут переносить бактерии от больного человека на пищевые продукты и предметы домашнего обихода.

С пищевыми продуктами возбудители попадают в тонкий кишечник, где они проникают внутрь слизистой оболочки и внедряются в лимфатические узлы кишечника. Здесь происходит усиленное размножение бактерий, вследствие чего возникают воспалительные процессы.

Из лимфатических узлов кишечника бактерии проникают в кровеносное русло. Период от поступления бактерий в организм до их проникновения в кровь составляет приблизительно 10-14 дней и соотвечствует **инкубационному периоду**.

С момента поступления бактерий в кровь появляются первые **симптомы заболевания**: головная боль, недомогание, повышение температуры. Через 6-7 дней в лимфатических узлах происходит распад бактерий и выделение эндотоксина. Это сопровождается значительным повышением температуры, нарушениями функций сердечно-сосудистой и центральной нервной систем (слабость, учащение пульса, адинамия, головная боль в лобной и затылочной областях, бессонница, появляется бред, мышечные боли, боли в суставах). Развивается бронхит, часто отмечается задержка стула. Болезнь протекает 5-6 недель.

Основными средствами **профилактики** тифо-паратифозных заболеваний являются мероприятия санитарно-противоэпидемического порядка: обеспечение населения доброкачественной водой, санитарный контроль за хранением пищевых продуктов, правильное устройство системы удаления нечистот, поднятие уровня санитарной культуры населения, а также выявление больных и бактерионосителей и их лечение. Для специфической профилактики применяют предохранительные прививки (вакцинация).

Для **лечения** больных применяют различные антибиотики: левомецетин, хлортетрациклин и др.

11.3. ВОЗБУДИТЕЛИ ЗООАНТРОПОНОЗОВ

Зооантропонозами называют болезни, общие для животных и людей. Люди могут заразиться при уходе за больными животными, переработке больного скота, употреблении в пищу инфицированных продуктов. К числу наиболее опасных и часто встречающихся болезней, которые могут передаваться с молоком и молочными продуктами, относятся туберкулез, бруцеллез, сибирская язва, ящур.

Возбудитель туберкулеза. Возбудитель открыт Кохом в 1882 г. В зависимости от патогенности и происхождения различают три вида возбудителей: человеческий (*Mycobacterium tuberculosis*), бычий (*M. bovis*) и птичий (*M. avium*), относящиеся к семейству *Mycobacteriaceae*.

Возбудитель туберкулеза представляет собой стройную, тонкую, слегка изогнутую грамположительную неподвижную палочку. Спор и капсул не образует. Часто наблюдается неравномерное окрашивание клеток, из-за этого они имеют вид зернистых палочек, которые располагаются в местах поражения локально, т. е. в виде скоплений (рис. 42).

По отношению к кислороду микобактерии являются облигатными аэробами. Оптимальная температура развития 37-38 °С, температурные пределы роста 30-42 °С. Возбудитель на обычных средах не растет. Его культивируют длительное время (до 30 дней) на специальных средах, например среде Петраньяни, представляющей собой яичную среду с молоком, картофельной мукой и глицерином.

Количество клеток в молоке больных коров может достигать 5×10^6 в 1 см³. Микобактерии являются устойчивыми к кислотам, щелочам, спирту. Это обусловлено большим содержанием липидов в клеточной стенке бактерий. Режимы пастеризации молока должны обезвреживать возбудителя. При температуре 75-76 °С микобактерии погибают через 15-20 с. В высушенном состоянии возбудитель выживает в течение 2-7 мес, в воде - 6, в почве - 7 мес. Под действием солнечных лучей он погибает через 1,5-2 ч.

Туберкулез - инфекционное хроническое заболевание людей и многих видов животных. Характеризуется образованием в различных органах и тканях (легком, печени, вымени, кишечнике, лимфатических узлах, на серозной оболочке грудной полости и др.) мелких туберкулезных очагов.

Заражение возбудителем туберкулеза чаще происходит воздушно-капельным и воздушно-пылевыми

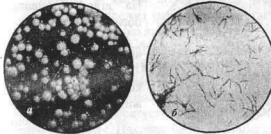


Рис. 42. *Mycobacterium tuberculosis*: а - колонии; б - клетки

путями, а также с пищей, т.е. алиментарным путем. Возбудителем, поступающим с молоком, наиболее часто заражаются дети. С целью профилактики распространения возбудителя туберкулеза молоко, полученное от животных, положительно реагирующих на туберкулин, обезжиривают кипячением с последующим использованием его внутри хозяйства. Допускается использовать молоко от таких животных для переработки на топленое масло. Обезжиренное молоко обезжиривают кипячением и применяют на корм скоту внутри хозяйства. Молоко, полученное от животных с клиническими признаками туберкулеза, кипятят в течение 10 мин и используют для кормления животных.

Возбудители бруцеллеза. Впервые обнаружил в 1886 г. английский врач Д. Брюс, в честь которого и назван род возбудителя *Brucella* - бруцелла. Основными возбудителями бруцеллеза являются три вида: *Br. melitensis*, *Br. abortus*, *Br. suis*, которые соответственно вызывают бруцеллез у овец и коз, крупного рогатого скота и свиней. В состав *Br. abortus* входит 9 биоваров, *Br. suis* содержит 4 биовара, а *Br. melitensis* - три. Кроме перечисленных имеются еще три вида бруцелл: *Br. canis*, *Br. ovis* и *Br. leontomae*, патогенные соответственно для собак, овец и грызунов (крыс).

Бруцеллы - мелкие, коккоподобные, короткие неподвижные палочки размером 0,6-1,5 x 0,5-0,7 мкм. По Граму красятся отрицательно, спор не образуют (рис. 43). При выращивании на питательных средах, содержащих иммунную сыворотку, могут образовывать микрокапсулу.

По отношению к кислороду бруцеллы являются строгими аэробами, метаболизм дыхательного типа. У некоторых видов, в частности *B. abortus*, при посеве возбудителя из исследуемого материала рост в первых поколениях происходит в присутствии повышенной (5-10 %) концентрации диоксида углерода. Эти бруцеллы относят к микроаэрофилам. Оптимальная температура роста 37 °С, рН 6,6-7,4. Предельные температуры развития 20-40 °С.

Для культивирования бруцелл используют сывороточно-глюкозные, кровяные и печеночные среды. На агаре бруцеллы образуют мелкие, бесцветные, выпуклые, с гладкой поверхностью колонии (рис. 43). На жидких средах вызывают равномерное

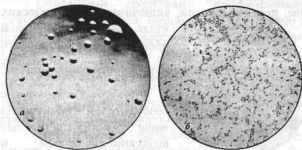


Рис. 43. *Brucella suis*: а - колонии; б - клетки

помутнение, пленки не образуют.

Все виды бруцелл хемоорганотрофы, усваивают глюкозу, многие расщепляют рибозу, галактозу, аланин, аспарагин, глутаминовую кислоту. Большинство штаммов бруцелл нуждается для роста в сложных средах, содержащих несколько аминокислот, тиамин, никотинамин и ионы магния. Желатин не разжижают, эритроциты не лизируют, ацетилметилкарбинол и индол не образуют. Проба с метиловым красным отрицательная. Продуцируют каталазу.

Режимы пастеризации молока, принятые в молочной промышленности, обеспечивают уничтожение бруцелл в молоке. На холоде возбудитель сохраняется месяцами, в воде - от 6 до 150 сут, во влажной почве - до 3 мес, но погибает в течение 1 ч при воздействии прямых солнечных лучей.

Бруцеллы очень устойчивы в высушенных субстратах. Длительное время могут сохраняться в пищевых продуктах (сут): в охлажденном молоке - 40, в масле - 67, в брызге - 45, в мороженом мясе - 60.

При воздействии 1-3%-ного раствора фенола бруцеллы погибают через 1 ч, 1-2%-ного раствора формалина - через 3; 5%-ного раствора свежесжженной извести - через 2 ч.

Бруцеллез - хроническая инфекционная болезнь многих видов животных и человека, характеризующаяся главным образом массовыми абортными у коров, овец и свиноматок. У человека болезнь характеризуется затяжной лихорадкой, поражением суставов, печени и других внутренних органов.

Человек заражается чаще всего через сырое молоко и во время ухода за больными животными. При этом наиболее вирулентным для людей является *B. melitensis*.

Молоко, полученное от животных в хозяйствах, неблагополучных по бруцеллезу, подлежит обезжириванию непосредственно в хозяйстве путем пастеризации при температуре 70 °С в течение 30 мин или при температуре 85-90 °С в течение 20 с, а при отсутствии пастеризаторов - кипячением. После обезжиривания молоко доставляют на молокозавод или используют внутри хозяйства.

Молоко от коров, положительно реагирующих при исследовании на бруцеллез, подлежит переработке на топленое масло или кипячению и использованию только внутри хозяйства.

Возбудитель сибирской язвы. Название болезни было дано С. С. Андриевским, который изучал ее на Урале в конце 80-х годов XVIII столетия. Возбудитель *Bac. anthracis* представляет собой крупную грамположительную палочку размерами 5-8 x 1,2 мкм, неподвижен, во внешней среде образует споры, в организме человека и животных образует капсулу. Палочки часто располагаются цепочками, вид которых напоминает бамбуковую трость (рис. 44). Споры округлые, не

превышают ширины клетки, распространяется центрально.

По отношению к кислороду возбудитель сибирской язвы является аэробом. Хорошо растет на обычных питательных средах, на МПА образует серебристо-серые средних размеров колонии. Под малым увеличением микроскопа край колонии имеет локонообразную структуру (рис. 44). При росте в бульоне образуются нежные беловатые хлопья, осаждающиеся на дно. Бульон при этом становится прозрачным. При легком встряхивании пробирки осадок поднимается в виде комочка ваты.

Возбудитель сибирской язвы не разжижает желатина, а дает характерный рост в виде опрокинутой елочки, т. е. по холоду укола образуется беловатый тяж, от которого отходят нежные отростки, уменьшающиеся книзу (в глубину питательной среды). Оптимальная температура роста 35-37°C, оптимальное значение pH 7,2-7,6.

Возбудитель сбраживает глюкозу с образованием органических кислот и апетона, гидролизует крахмал, казеин, восстанавливает нитраты, медленно разжижает и свертывает молоко (через 5-7 сут), в отличие от гнилостных бактерий не вызывает гемолиза (растворения эритроцитов).

Вегетативная форма не обладает высокой устойчивостью к факторам внешней среды. Споры характеризуются высокой резистентностью (устойчивостью). Они десятки лет могут сохраняться в почве. Растворы дезинфицирующих веществ - 5%-ный раствор карболовой кислоты, 5-10%-ный раствор хлорамина - убивают споры через несколько часов. При кипячении они обезвреживаются в течение 15 мин.

Сибирская язва чаще протекает в виде септической формы (возбудитель размножается в крови). В зависимости от места первичного

поражения различают кожную, кишечную и легочную формы. По характеру течения болезнь проявляется в молниеносной, острой, подострой и хронической формах.

Для предупреждения распространения возбудителя сибирской

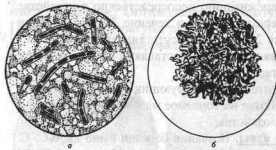


Рис. 44. *Bacillus anthracis*: а - клетки; б - колония

язвы молоко, полученное от коров, больных и подозрительных по заболеванию, на пищевые и кормовые цели не допускают и уничтожают. Молоко от остальных животных карантинизируемого пункта разрешают в пищу только в кипяченом виде.

Возбудитель ящура. Возбудителем ящура является вирус. Вирусная природа возбудителя установлена Ф. Леффлером и П. Фрошем в 1898 г. Известно 7 серологических типов вируса ящура: А, О, С, «Азия-1», «Азия-2», САТ, «Иран». В России чаще встречаются серотипы О и С.

Вирусные частицы имеют сферическую форму размером 22-30 нм в диаметре. Капсид построен по типу куба. Вирусы культивируют в клетках эпителия телят, а также в культурах клеток почек овец, коз, свиней. Оказывает цитопатическое, т. е. разрушающее клетку, действие. Вирус не разрушается эфиром, сохраняется в выделениях больных животных до 2 мес, в шерсти — до 2 недель, в мясе погибает через 1-2 сут. Очень чувствителен к кислотам, поэтому в кисломолочных продуктах быстро погибает, чувствителен также к формалину.

Ящур проявляется у парнокопытных животных в виде афт - пузырьков, в которых находится лимфоидная жидкость и локализуется вирус. Поражается кожа межкопытных щелей, вымени, пятачка, слизистой оболочки ротовой полости.

В организм человека вирус проникает через слизистую рта с молоком, реже - через поврежденную кожу. Афты появляются на губах, языке, твердом и мягком небе, внутренней поверхности щек. Когда они лопаются, на месте афт появляются язвы.

Молоко, полученное от коров в ящурном очаге, перерабатывают на месте на топленое масло. На пищевые и кормовые цели используют только молоко, обезвреженное путем кипячения в течение 5 мин или пастеризации при температуре 80 °С в течение 30 мин.

11.4. ВОЗБУДИТЕЛИ МАСТИТА

Мастит (Mastitis) - воспаление молочной железы, преимущественно у коров и коз, реже у самок других млекопитающих.

Возбудителями мастита чаще являются патогенные стрептококки видов *Str. agalactiae* и *Str. dysgalactiae*, а также стафилококки - *Staph. aureus*. Маститы кокковой этиологии встречаются примерно в 60-70 % случаев. Кишечные палочки рода эшерихия являются возбудителями маститов в 2-3 % случаев.

Возникновение маститов может обуславливаться также развитием других микроорганизмов: сальмонелл, синегнойных палочек (*Ps. aeruginosa*), *Vac. cereus*, пастерелл, коринебактерий, микоплазм, а также дрожжей рода *Candida*. Различают также маститы так называемой ящурной, туберкулезной и актиномикозной этиологии.

Способствуют возникновению маститов неправильные условия

содержания и кормления дойных коров, плохой уход за выменем, травмы сосков, простуда, неполное выдаивание, нарушение правил машинного доения.

В молочную железу микроорганизмы проникают через сосковый канал, раны вымени, а также эндогенно с кровью из других пораженных органов, например при эндометрите (воспалении матки) и энтерите (воспалении кишечника) или при инфекционных болезнях. Известны случаи заболевания маститом коров, которых обслуживали доярки с ранками на руках, инфицированными стрептококками.

Возбудитель может передаваться также через доильные стаканы аппаратов машинного доения. При заболевании резко снижается удой молока и ухудшается его качество. Реакция маститного молока, как правило, щелочная, редко - кислая. В нем уменьшается количество казеина, молочного сахара, жира, кальция. При тяжелой форме заболевания в молоке появляются хлопья и сгустки. При рассмотрении микроскопического препарата, приготовленного из такого молока, видны цепочки стрептококков, стафилококки или другие микроорганизмы. Выявляется большое количество лейкоцитов.

Если в сборном молоке имеется примесь маститного, в нем плохо развиваются молочнокислые бактерии, оно становится непригодным для выработки молочных продуктов. Такое молоко является источником распространения возбудителей пищевых отравлений. При клинически выраженном мастите наблюдаются характерные изменения внешнего вида вымени (припухлость, болезненность, повышение температуры и др.). При скрыто протекающих маститах, так называемых субклинических формах, многие из этих признаков отсутствуют.

Для диагностики скрыто протекающего мастита у коров применяют пробу с димастинном, бромтимоловую пробу и пробу отстаивания. В лаборатории подсчитывают количество лейкоцитов, определяют рН и активность лизоцима молока, секрет вымени исследуют бактериологически.

Проба с димастинном. Из каждой доли вымени берут по 1 см³ молока, добавляют к нему по 1 см³ 5%-ного раствора димастина и размешивают деревянной палочкой в течение 7-15 с. Молоко, взятое из большой доли вымени, образует с реактивом сгусток различной плотности. Здоровое молоко сгустка не образует.

Проба с бромтимоловым синим. Из отдельных долей вымени берут по 5 капель молока и смешивают с одной каплей 0,2%-ного раствора бромтимолового синего в 60%-ном спирте. При этом молоко от здоровых коров окрашивается в желтый цвет, а от коров, больных маститом, - в зеленый или синий.

Проба отстаивания. Из каждой доли вымени берут по 10-15 см³ молока и выдерживают в пробирках при 4-8 °С. Просматривают молоко через 2-3 ч, затем повторно - через 16-24 ч. При этом обращают внимание на цвет молока, наличие осадка и примесей, высоту слоя сливок и их цвет.

При субклинических формах мастита молоко бывает водянистым, синеватого цвета. Слой сливок менее 0,5 см³, розовый цвет сливок, наличие в них слизи и хлопьев свидетельствуют о патологическом процессе.

Увеличение количества лейкоцитов в молоке является показателем заболевания маститом. В молоке здоровых коров в середине лактационного периода содержится до 500 тыс., реже - 1 млн клеток в 1 см³. Количество лейкоцитов в 1 см³ секрета вымени при серозном мастите достигает 3 млн, при геморрагическом - 9 млн, при гнойном - 18 млн. клеток. В отдельных случаях количество лейкоцитов может достигать до 40 млн клеток в 1 см³.

При воспалении молочной железы изменяется рН молока. Среднее значение рН нормального молока равно 6,6, а молока из пораженных долей - 7,8 и выше. При наличии мастита лизоцим М в основном отсутствует. Титрация лизоцима М в молоке отдельных долей вымени служит дополнительным методом диагностики маститов.

Определяют общую бактериальную обсемененность молока. Если в молоке отдельных долей вымени количество микроорганизмов будет больше в несколько раз, то это свидетельствует о наличии инфекционного процесса. Параллельно с общей обсемененностью выявляют наличие основных возбудителей маститов (стрептококков, стафилококков, кишечных палочек).

Для лечения коров, больных маститом, применяют антибиотики. Поэтому молоко, полученное от животных, подвергавшихся лечению, нельзя использовать для выработки молочных продуктов в течение 3 дней.

Для предупреждения маститов необходимо поддерживать чистоту в животноводческих помещениях, особенно в родильных отделениях, регулярно проводить текущую дезинфекцию, устранять факторы, predisposing к возникновению маститов.

САНИТАРНО-ПОКАЗАТЕЛЬНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

12.1. ПОНЯТИЕ О САНИТАРНО-ПОКАЗАТЕЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМАХ

Основными источниками распространения возбудителей большинства инфекционных болезней являются больные люди и теплокровные животные. Наиболее массовое выделение ими микроорганизмов в окружающую среду происходит с фекалиями.

При санитарно-микробиологическом исследовании решают вопрос о наличии или отсутствии в пищевых продуктах и других объектах внешней среды опасных для человека микроорганизмов. Прямое обнаружение возбудителей инфекционных болезней имеет целый ряд трудностей. Во-первых, патогенные микроорганизмы находятся в окружающей среде непостоянно; сравнительно легко их можно обнаружить во время эпидемии, но очень трудно - в межэпидемические периоды. Во-вторых, количество патогенных микроорганизмов, попавших в окружающую среду, значительно уступает непатогенным, и распространение их в загрязненных объектах неравномерно. Трудности возникают и при выращивании патогенных микробов на питательных средах, поскольку их развитие подавляется сапрофитной микрофлорой.

В связи с этим санитарную оценку различных объектов проводят не прямым, а косвенным путем, т. е. устанавливают факт загрязнения этих объектов не возбудителями кишечных инфекций, а кишечными выделениями человека или теплокровных животных. Чем обильнее это загрязнение, тем более вероятно попадание в объект патогенных микробов.

Для многих видов микробов (обитателей тела здорового человека) кишечник является биотопом — единственной природной средой обитания, и выявление таких микробов вне организма свидетельствует о загрязнении внешней среды выделениями из кишечника и возможном присутствии патогенных микробов-возбудителей кишечных инфекций. Выделяемые в этих случаях микробы служат показателями санитарного неблагополучия, потенциальной опасности исследуемых объектов, а потому названы санитарно-показательными.

Количественный учет санитарно-показательных микроорганизмов выявляет уровень загрязнения внешней среды, что в свою очередь определяет степень эпидемиологической опасности исследуемых объектов: чем больше в них обнаруживаются санитарно-показательных микроорганизмов, тем больше вероятность наличия здесь специфических для данного экскрета и данного объекта возбудителей инфекционных заболеваний.

Санитарно-показательные микроорганизмы являются обитателями естественных полостей человеческого или животного организма. Это, как правило, комменсалы, но при изменении условий сосуществования с хозяином они могут вызывать болезнетворные процессы, т. е. проявлять условно-патогенные свойства.

Разработаны принципы оценки пригодности микроорганизмов в качестве санитарно-показательных.

В связи с этим не все микроорганизмы, входящие в состав нормальной флоры организма человека или животных, могут быть признаны санитарно-показательными. Они должны отвечать следующим **требованиям**:

- постоянное содержание в фекалиях и постоянное поступление в окружающую среду в больших количествах;
- отсутствие другого природного резервуара, кроме организма человека и животных;
- сохранение жизнеспособности в окружающей среде в течение сроков, близких к срокам выживания патогенных микробов, выводимых из организма теми же путями; устойчивость должна быть не ниже, а по возможности несколько выше устойчивости соответствующих патогенных микробов;
- отсутствие размножения в окружающей среде;
- простота обнаружения, т. е. они должны хорошо расти на искусственных питательных средах и не иметь во внешней среде аналогов-сапрофитов, сходство с которыми потребовало бы сложных и многочисленных приемов дифференцирования;
- постоянство свойств, т. е. они не должны изменяться под воздействием факторов внешней среды;
- отсутствие зависимости от наличия других микроорганизмов, т. е. не подавляться и не стимулироваться другими микроорганизмами;
- равномерное распределение в исследуемых объектах внешней среды.

Приведенному перечню требований не отвечает в полной мере ни один санитарно-показательный микроорганизм, однако чем большему количеству требований он удовлетворяет, тем в большей степени соответствует идеалу санитарно-показательного микроорганизма.

Идея использования микроорганизмов, постоянно обитающих в кишечнике человека, для характеристики загрязнения внешней среды принадлежит Мэсе (1888). Он установил, что при исследованиях воды с целью обнаружения возбудителя брюшного тифа постоянно выделяются в большом количестве кишечные палочки. В связи с этим предложил исследовать воду на наличие кишечной палочки (*Escherichia coli*) как индикатора фекального загрязнения воды вместо возбудителя брюшного

тифа (*Salm. typhi*).

Позже в качестве индикаторных микроорганизмов было предложено использовать представителей семейства Enterobacteriaceae, морфологически подобных *E. coli*. Эта группа микроорганизмов получила название «колиформы», которое обозначает «бактерии группы кишечных палочек».

Бактерии группы кишечных палочек являются самыми распространенными санитарно-показательными микроорганизмами, однако в качестве показателя фекального загрязнения используются также и другие постоянные обитатели кишечника человека и животных — энтерококки, споровый анаэробный микроорганизм — *Cl. perfringens*, палочка протей, кишечные бактериофаги и др.

Гордон (1902) расширил рамки применения санитарно-показательных микроорганизмов, указав, что они могут быть не только показателями фекального загрязнения, но и свидетелями о загрязнении внешней среды, преимущественно воздуха, выделениями верхних дыхательных путей человека. Показателями такого загрязнения было предложено считать гемолитических и зеленящих (обуславливают β- и α-гемолиз) стрептококков и золотистых стафилококков — постоянных обитателей слизистой оболочки рта и носоглотки.

При исследовании молока существенными свойствами, снижающими санитарно-показательную ценность микроорганизмов-индикаторов, являются их способность размножаться в молоке, подавляться молочнокислыми бактериями закваски и проявлять при этом изменчивость биологических свойств.

Во многих стандартах на молочные продукты наряду с определением санитарно-показательных микроорганизмов в качестве косвенного показателя санитарного состояния продукта и санитарно-гигиенических условий производства учитывают общую бактериальную обсемененность продуктов, оборудования и других объектов, т.е. определяют количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных бактерий, или показатель КОЕ (колониобразующие единицы).

При эпидемических показаниях (например, пищевых отравлениях) органы санитарно-эпидемического надзора проводят исследования для непосредственного обнаружения патогенных микроорганизмов (*сальмонелл* и др.)

12.2. БАКТЕРИИ ГРУППЫ КИШЕЧНЫХ ПАЛОЧЕК

Основными санитарно-показательными микроорганизмами являются бактерии группы кишечных палочек (БГКП), объединяющие 3 рода микроорганизмов — *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, входящих в семейство Enterobacteriaceae. Они обладают многими общими

морфологическими, культуральными и ферментативными свойствами.

В соответствии с ГОСТ 2874-82 и ГОСТ 18963-73 к БГКП относят мелкие подвижные грамотрицательные, не образующие спор палочки, не обладающие окислительной активностью, ферментирующие лактозу и глюкозу с образованием кислоты и газа при температуре 37 °С (в течение 5-24 ч) (рис. 45).

Кишечные палочки (бактерии группы кишечных палочек) — это факультативные анаэробы, хорошо растущие в универсальных питательных средах, устойчивые к действию многих анилиновых красителей. Им свойственна широкая приспособительная изменчивость, в результате которой возникают разнообразные варианты, что усложняет их классификацию.

В последнем издании «Определителя бактерий Берджи» (1994 г.) в род *Escherichia* отнесены пять видов микроорганизмов: *E. coli*, *E. blattae*, *E. fergussonii*, *E. hermannii* и *E. vulneris*. Их дифференцирующие особенности представлены в табл. 20.

Род *Citrobacter* включает 3 вида: *C. amaloniticus*, *C. diversus*, *C. freundii* (табл. 21), а род *Enterobacter* объединяет 12 видов (табл. 22).

Из всех бактерий группы кишечных палочек наибольшее санитарно-показательное значение имеют микроорганизмы рода *Escherichia*.

По способности расщеплять лактозу при температуре 37°С БГКП делят на лактозотрицательные и лактозоположительные кишечные палочки (ЛКП), или колиформные, которые нормируются по международным стандартам. Из групп ЛКП выделяют фекальные кишечные палочки (ФКП), которые способны ферментировать лактозу при температуре 44,5 °С. К ним относится *E. coli*, не растущая на цитратной среде.

Для дифференциации бактерий группы кишечных палочек используют среду Эндо, на которой *E. coli* дает характерный рост в виде колоний красного цвета с металлическим блеском.

Среда Эндо является селективной средой для энтеробактерий, выпускается в сухом виде. В ее состав входят МПА, лактоза, фуксин основной, сульфат и фосфат натрия.

Приготовление среды: в 100 см³ дистиллированной воды растворяют 5 г. сухой среды, кипятят при постоянном помешивании

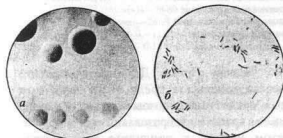


Рис. 45. *Escherichia coli*: а — колонии; б — клетки

20. Биохимическая дифференциация видов рода *Escherichia*

Виды	<i>Esch. blatae</i>	<i>Esch. coli</i>	<i>Esch. coli</i> не-активн	<i>Esch. Fergus-sonii</i>	<i>Esch. hermannii</i>	<i>Esch. vulneris</i>
Тест						
Образование индола	-	+	(+)	+	+	-
Проба с метиловым красным	+	+	+	+	+	+
Реакция Фогеса-Проксуэра	-	-	-	-	-	-
Использование цитрата (среда Симмонса)	±	-	-	(-)	-	-
Образование кислоты из:						
Адонитола	-	-	-	+	-	-
L-арабинозы	+	±	(+)	+	+	+
Глицерола	+	±	±	(-)	-	(-)
Дульцитоло	-	±	±	±	(-)	-
D-ксилозы	+	+	±	+	+	+
Лактозы	-	+	(-)	-	±	(-)
Мальтозы	+	+	(+)	+	+	+
D-маннитола	-	+	+	+	+	+
D-маннозы	+	+	+	+	+	+
L-рамнозы	+	(+)	±	+	+	+
Рафинозы	-	±	-	-	±	+
Салицина	-	±	-	±	±	±
Сахарозы	-	±	(-)	-	±	-
D-сорбитола	-	+	(+)	-	-	-
Трегалозы	(+)	+	+	+	+	+
Целлобиозы	-	-	-	+	+	+
Мулата	±	+	±	-	+	(+)
D-глюкозы	+	+	+	+	+	+
Образование газа из D-глюкозы	+	+	-	+	+	+
Использование ацетата	-	+	±	+	(+)	±
Гидролиз эскулина	-	±	-	±	±	(-)
Восстановление нитрата	+	+	+	+	+	+
Образование H ₂ S	-	-	-	-	-	-
Гидролиз мочевины	-	-	-	-	-	-
Аргининдигидролаза	-	(-)	-	-	-	±
Гидролиз желатина (22 °C)	-	-	-	-	-	-
Рост в присутствии KCN	-	-	-	-	+	(-)
Липаза	-	-	-	-	-	-
Образование каталазы (24 ч)	+	+	+	+	+	+

Обозначения:
 +++ - 90-100 % штаммов положительные;
 ++ - 76-89 % штаммов положительные;
 ± - 26-75 % штаммов положительные;
 (-) - 11-25 % штаммов положительные;
 +- - 0-10 % штаммов положительные

2-3 мин и разливают по по чашкам Петри. Для предотвращения образования большого количества конденсата среду после кипячения охлаждают до 50 °C. Готовая среда имеет розовый цвет. Колонии лактозоположительных штаммов красные (образованная молочная кислота реагирует с сульфатом натрия, в результате чего фуксин восстанавливает свой цвет), лактозоотрицательные – бесцветные или

21. Биохимическая дифференциация видов рода *Citrobacter*

Виды	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	<i>Citrobacter diversus</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
Тест			
Образование индола	+	+	-
Проба с метиловым красным	+	+	+
Реакция Фогеса-Проксуэра	-	-	-
Цитрат (среда Симмонса)	(+)	+	+
Образование сероволодора (H ₂ S)	-	-	(+)
Гидролиз мочевины	(+)	±	±
Аргининдигидролаза	(+)	±	±
Орнитиндекарбоксилаза	+	+	(-)
Рост в присутствии KCN	+	+	+
Использование малоната	-	+	(-)
Гидролиз желатины (22 °C)	-	-	-
Образование кислоты из:			
D-глюкозы	+	+	+
Образование газа из D-глюкозы	+	+	+
Образование кислоты из:			
Адонитола	-	+	-
L-арабинозы	+	+	+
Глицерола	±	+	+
Дульцитоло	-	±	±
D-ксилозы	+	+	+
Лактозы	±	±	±
Мальтозы	+	+	+
D-маннитола	+	+	+
D-маннозы	+	+	+
L-рамнозы	+	+	+
Рафинозы	-	-	±
Салицина	±	(-)	-
Сахарозы	(-)	±	±
D-сорбитола	+	+	+
Трегалозы	+	+	+
Целлобиозы	+	+	±
Мулата	+	+	+
Гидролиз эскулина	-	-	-
Использование ацетата	(+)	(+)	(+)
Дезоксирибонуклеаза (25 °C)	-	-	-
Восстановление нитрата	+	+	+
Липаза	-	-	-
Образование каталазы	+	+	+

Обозначения:
 +++ - 90-100 % штаммов положительные;
 ++ - 76-89 % штаммов положительные;
 ± - 26-75 % штаммов положительные;
 (-) - 11-25 % штаммов положительные;
 +- - 0-10 % штаммов положительные

слегка розовые.

При росте БГКП на жидких питательных средах (МПБ) наблюдаются значительные помутнение среды и образование сероватого, легко разбивающегося осадка. Пленка на поверхности бульона обычно не образуется.

На МПА БГКП образуют средних размеров округлые гладкие

22. Биохимическая дифференциация видов рода *Enterobacter*

Виды / Тесты	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. agglomerans</i>	<i>E. amnigenus</i>	<i>E. asburiae</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. edwardsii</i>	<i>E. gergoviae</i>	<i>E. hermannii</i>	<i>E. intermedius</i>	<i>E. indologens</i>	<i>E. sakazakii</i>	<i>E. tylosae</i>
	Образование индола	-	(-)	-	-	-	-	-	-	-	-	(-)
Проба с метиловым красным	-	±	±	+	-	-	-	±	+	-	-	-
Реакция Фогеса-Проскауэра	+	±	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Цитрат (среда Симмонса)	+	±	±	+	+	+	+	+	±	-	-	-
Образование кислоты из:												
Адонитол	+	-	-	-	(-)	-	-	-	-	-	-	-
D-арабиноз	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Глицерол	+	±	-	(-)	±	-	+	-	+	-	(-)	-
Дульцитол	(-)	(-)	-	(-)	(-)	-	-	(+)	+	-	-	-
D-ксилоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Лактоза	+	±	±	(+)	+	±	±	-	+	+	+	+
Мальтоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-маннитол	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-манноза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-рамноза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Рафиноза	+	±	+	(+)	+	+	+	-	+	-	-	-
Салицил	+	±	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+
Сахароза	+	(+)	±	+	+	+	+	±	-	-	-	-
D-сорбитол	+	±	±	+	+	+	-	-	+	+	-	-
Трегалоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Целлобиоза	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Муката	+	±	±	(-)	(+)	+	-	+	+	+	+	(+)
D-глюкоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Образование газа из D-глюкозы	+	(-)	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+
Использование ацетата	±	±	-	(+)	(+)	+	+	±	-	-	+	±
Гидролиз эскулина	+	±	+	+	±	+	+	-	+	+	+	+
Восстановление нитрата	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Образование H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Гидролиз мочевины	-	(-)	-	±	±	+	+	(+)	-	-	-	-
Аргининдигидролаза	-	-	±	(-)	+	+	+	(+)	-	+	+	+
Гидролиз желатина (22 °C)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Рост в присутствии KCN	-	±	+	+	+	+	-	+	±	+	+	+
Лизис	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
Образование каталазы (24 ч)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Обозначения: Те же (см табл. 20).

блестящие полупрозрачные колонии.

Кишечные палочки не разжижают желатин, способны ферментировать целый ряд углеводов - лактозу, глюкозу, мальтозу, сахарозу с образованием кислоты и газа. Ферментативные свойства (сбраживание углеводов) непостоянны, поэтому при дифференциации БГКП их учитывают не самостоятельно, а в комплексе с другими тестами.

В молоке бактерии группы кишечных палочек хорошо размножаются, доводя его кислотность до 60-80 °Т и образуя в нем неровный незрелый сгусток. В присутствии молочнокислых бактерий под влиянием выделяемых ими антибиотических веществ и кислоты рост кишечных палочек тормозится. При режимах пастеризации, принятых в молочной промышленности, кишечные палочки погибают. Обычные дезинфицирующие средства в общепринятых разведениях обеззараживают оборудование от этих бактерий.

Санитарно-показательное значение отдельных родов бактерий группы кишечных палочек неодинаково. Обнаружение бактерий рода *Escherichia* в пищевых продуктах, в воде, почве, на оборудовании свидетельствует о свежем фекальном загрязнении этих объектов, что имеет большое санитарное и эпидемиологическое значение.

Иногда считают, что бактерии родов *Citrobacter* и *Enterobacter* представляют собой измененные эшерихии после пребывания их во внешней среде. Следовательно, *Citrobacter* и *Enterobacter* являются показателями более давнего (несколько недель) фекального загрязнения и поэтому они имеют меньше санитарно-показательное значение по сравнению с бактериями рода *Escherichia*.

Дифференциацию бактерий группы кишечных палочек проводят с учетом различий физиологических свойств микроорганизмов. На этой основе разработаны специальные тесты, используемые для распознавания фекальных и нефекальных кишечных палочек, основным из которых является комплекс признаков ТИМАЦ (ТЛИМАЦ):

Т – температурный тест;

И – тест индолообразования;

М – реакция с метиловым красным;

А – реакция на ацилметилкарбинол (реакция Фогес-Проскауэра);

Ц – цитратный тест;

Л – ферментация лактозы.

Температурный тест (тест Эймана) – способность ферментировать глюкозу и другие углеводы (лактозу, маннит) с образованием газа при температуре 44-46 °С (чаще 44,5 °С). Для эшерихий температурный тест положительный, представители родов *Citrobacter* и *Enterobacter* такой способностью не обладают. Этот тест определяют на специальных средах Эймана, Кесслер, Булижа.

Среда Эймана (глюкозопептонная среда): пептон – 10 г; хлористый натрий – 5 г, глюкоза – 5 г; вода водопроводная 1 000 см³. В концентрированной среде состав всех ингредиентов, кроме воды, увеличен в 10 раз. Среду разливают в пробирки или колбы с бродильными трубками (газовками), стерилизуют текущим паром по 30 мин в течение 3 дней (допускается стерилизация в автоклаве при 112 °С – 15 мин).

Тест индолообразования – способность расщеплять аминокислоту триптофан, входящую в состав многих белков, с выделением ряда продуктов, в том числе индола, окрашивающего среду при взаимодействии с реактивами, содержащими парадиметиламидобenzальдегид в красный цвет. Индол продуцируют эшерихии, бактерии из родов *Citrobacter* и *Enterobacter* индола не образуют. Наличие индола определяют в старых бульонных культурах (лучше в бульоне Хоттингера с содержанием 200-300 мг % триптофана) при помощи реактива Эрлиха.

Реактив Эрлиха: парадиметиламидобenzальдегида – 4 г; 96° этилового спирта – 380 см³; концентрированной хлористо-водородной (соляной) кислоты – 80 см³. Перед добавлением (0,5-1 см³) реактива Эрлиха к культуре в нее вносят 0,5-1 см³ солянокислого эфира (для экстрагирования индола).

Исследования биохимических свойств *E. coli* после развития в молоке с заквасками показали непостоянство индольного признака, 36 % штаммов *E. coli* могут терять способность продуцировать индол. Поэтому применение этого признака при контроле кисломолочных продуктов может привести к неверным результатам.

Реакция с метиловым красным (реакция Кларка) заключается в определении интенсивности кислотообразования при ферментации глюкозы в питательной среде. В качестве индикатора используют метиловый красный, несколько капель которого добавляют к 3-5-суточной культуре, выращенной на среде Кларка. При pH 5 и ниже индикатор изменяет светло-желтый цвет на красный, что свидетельствует об интенсивном кислотообразовании. Представители родов *Escherichia* и *Citrobacter* дают красное окрашивание среды, а *Enterobacter* – желтое.

При pH выше 5 среда остается светло-желтой.

Среда Кларка: протеоза (или другой пептон) – 5 г; декстроза – 5 г; K₂HPO₄ – 5 г; дистиллированная вода до 800 см³. Смесь нагревают 20 мин, периодически помешивая, фильтруют, охлаждают, доводят объем до 1 000 см³ дистиллированной водой. Разливают в пробирки по 10 см³, стерилизуют при 121 °С 15 мин.

Индикатор: метилового красного – 0,1 г; этилового спирта 300 см³. После растворения индикатора прибавляют 200 см³ дистиллированной воды.

Реакция на ацетилметилкарбинол (Фогес-Проскауэра, 1898 г.) выявляет способность микроорганизмов образовывать в среде с глюкозой ароматическое вещество ацетилметилкарбинол (ацетон).

Для постановки реакции к 5 см³ 4-5-суточной культуры, выращенной на пептонной среде с глюкозой или среде Кларка, добавляют такой же объем 40%-ного раствора KOH. Для ускорения реакции к 100 см³ щелочи добавляют 0,3 г креатина [реактив O'Meara (Мира)]. При наличии ацетилметилкарбинола среда окрашивается в розовый цвет.

Ацетилметилкарбинол (ацетон) образуют бактерии рода *Enterobacter*. Эшерихии и представители рода *Citrobacter* такой способностью не обладают.

Цитратный тест – способность микроорганизмов усваивать в качестве единственного источника углерода лимонную кислоту или ее соли. Изучаемую культуру высевает на цитратную синтетическую среду Козера или плотную среду Симмонса.

Бактерии родов *Citrobacter* и *Enterobacter* растут на цитратных средах (вызывают помутнение и изменение цвета в жидких и образование специфических колоний на плотных средах) и получили название **цитратположительные или цитратассимилирующие бактерии**, тогда как эшерихии не дают роста на указанных средах и называются **цитратотрицательными**.

Цитратная синтетическая среда Козера: MgSO₄ × 7H₂O – 0,2 г; NH₄H₂PO₄ – 1,5 г; K₂HPO₄ – 1 г; цитрата натрия × 5 H₂O – 2,53 г; дистиллированная вода – 1 000 см³. Для определения изменения реакции среды прибавляют 10 см³ 0,5%-ного спиртового раствора бромтимолового синего.

Среда Симмонса: к среде Козера добавляют 2% агара, доводят pH до 7,2-7,4, стерилизуют в автоклаве при 112 °С в течение 15 мин. Индикатор добавляют после стерилизации, перед разливкой в стерильные пробирки. Среда имеет оливково-зеленый цвет.

При определении содержания цитратотрицательных эшерихий в кисломолочных продуктах можно получить завышенные результаты вследствие дополнительного учета представителей рода *Enterobacter*, потерявших способность утилизировать цитраты.

Цитратный тест должен сопровождаться микроскопией препаратов так как *Enterococcus faecalis* усваивает цитраты и может приниматься за цитратположительные кишечные палочки.

Ферментация лактозы присуща большинству видов семейств *Enterobacteriaceae*. Представители рода *Escherichia* (за исключением лактозотрицательных вариантов) сбраживают лактозу, *Citrobacter* и *Enterobacter* ферментируют лактозу непостоянно. Способность микроорганизмов ферментировать лактозу изучают на специальных

лактозосодержащих средах с различными индикаторами (среда Эндо, среды Гисса и др).

Довольно часто кишечные палочки могут иметь нетипичные признаки комплекса ТИМАЦ (ГЛИМАЦ), что затрудняет их дифференциацию. Это объясняется тем, что во внешней среде кишечные палочки подвергаются воздействию различных факторов, в результате чего происходит изменение ряда их биологических свойств. Например, после пребывания во внешней среде *E. coli* утрачивает способность сбраживать лактозу, ферментировать углеводы при 43 °С и даже при 37 °С, но приобретает свойство ассимилировать (усваивать) цитраты.

При длительном применении антибиотиков, других лечебных препаратов в кишечнике человека также обнаруживают лактозоотрицательные варианты эшерихий.

В комплексе признаков ТИМАЦ основными являются температурный и цитратный тесты. Они наиболее стабильные, что позволяет дифференцировать бактерии группы кишечных палочек фекального происхождения от кишечных палочек, обитающих во внешней среде.

Дополнительными признаками, при помощи которых дифференцируют бактерии группы кишечных палочек, являются уреазная активность, рост на средах с цианистым калием, ферментация различных углеводов и другие биохимические свойства, представленные в табл. 20, 21, 22.

Наибольшее санитарно-показательное значение имеют кишечные палочки, не растущие в среде Козера с цитратами (как единственным источником углеродного питания) и ферментирующие углеводы при 43-45 °С (*E. coli*). Они являются показателями свежего фекального загрязнения.

В молочной промышленности в качестве санитарно-показательных микроорганизмов выявляют бактерии группы кишечных палочек, посева производят на среду Кесслер, культивируют при 37 °С 24 ч.

Приготовление модифицированной среды Кесслер: 16 г сухой среды Кесслер помещают в колбу и доливают питьевой водой до 1 000 см³. Смесь кипятят при помешивании 25 мин. Объем доводят питьевой водой до 1 000 см³ и фильтруют через вату. Разливают в пробирки с поплавками по 5 см³ или колбочки с поплавками по 40-50 см³ и стерилизуют при 121°С в течение 10 мин. Среда имеет темно-фиолетовый цвет.

Допускается приготовление среды Кесслер из отдельных ингредиентов.

Для этого к 1 000 см³ питьевой воды прибавляют 10 г пептона и 50 см³ стерильной желчи (желчь бычьа или других сельскохозяйственных

животных), кипятят смесь при помешивании 25 мин и фильтруют ее через вату. В полученном фильтрате растворяют 2,5 г лактозы и доводят объем питьевой водой до 1 000 см³, устанавливают рН 7,4-7,6, после чего добавляют 2 см³ раствора кристаллического фиолетового с массовой концентрацией 10 г/дм³, разливают в пробирки с поплавками или колбочки с поплавками по 40-50 см³ и стерилизуют при 121 °С в течение 10 мин. Готовая среда должна иметь темно-фиолетовый цвет.

Критерии санитарной оценки пищевых продуктов и других объектов внешней среды по присутствию санитарно-показательных микроорганизмов предусмотрены ГОСТами и Санитарными правилами и нормами, где указывается, что бактерии группы кишечных палочек не должны обнаруживаться в определенных количествах продукта, т.е. нормируется количество санитарно-показательных микроорганизмов в единице продукта. Так, например, в пастеризованном молоке кишечные палочки не должны выявляться в 1 см³, в жидкой закваске для кефира бактерии группы кишечных палочек не допускаются в 3 см³, в сметане и твороге - в 0,001 см³ (г) и т.д.

12.3. ЭНТЕРОКОККИ

Систематика и биологические свойства энтерококков представлены в главе 10.

Энтерококки наряду с бактериями группы кишечных палочек являются постоянными обитателями кишечника человека и теплокровных животных, в большом количестве выделяются во внешнюю среду, и обнаружение их в пищевых продуктах, воде, почве свидетельствует о фекальном загрязнении этих объектов.

Преимущества энтерококков как санитарно-показательных микробов заключается в их большей устойчивости к физическим и химическим воздействиям, в наличии избирательных сред, позволяющих обнаружить энтерококков в сильно загрязненных объектах, в несложности дифференцировки их от сходных видов и некотором отличии энтерококков человеческого и животного происхождения, что имеет существенное значение с эпидемиологической точки зрения.

Установлено, что в кишечнике человека преобладают *Ent. faecalis* и его варианты, в меньшем количестве обнаруживают *Ent. faecium*. В содержимом кишечника крупного рогатого скота, свиней, овец, лошадей преобладают *Ent. faecium*. Обнаружение во внешней среде *Ent. faecalis* и его вариантов имеет определенное санитарное и эпидемиологическое значение как показатель загрязнения объекта фекалиями человека; обнаружение *Ent. faecium* является показателем загрязнения фекалиями животных.

Другими преимуществами энтерококков как санитарно-показательных микроорганизмов является то, что они не размножаются

вие кишечника человека и животных (за исключением пищевых продуктов); во внешней среде не подвергаются столь глубоким изменениям, как кишечные палочки, и дольше по сравнению с ними сохраняются во внешней среде.

Имеются селективные питательные среды, позволяющие выделить энтерококки в чистой культуре из объектов, сильно обсемененных посторонней микрофлорой. Для определения энтерококков чаще используют молочную среду с полимиксином по Калине (см главу 10).

Энтерококки чрезвычайно устойчивы к низким температурам, нагреванию, хлорированию, к повышенным концентрациям сахара и соли, к высокой кислотности. Они выдерживают температуру нагревания 60-56 °С в течение 30 мин (режимы пастеризации должны обезвреживать энтерококков), способны расти в присутствии 6,5 % NaCl, 40 % желчи, в средах с pH 9,6-10. В связи с этим для продуктов, не подвергающихся хранению, показателем санитарного состояния являются бактерии группы кишечных палочек, а для продуктов, которые длительно хранятся при низкой температуре, лучше в качестве санитарно-показательных микроорганизмов определять энтерококки. Это объясняется тем, что кишечные палочки погибают быстрее энтерококков и присутствие или отсутствие их не отражает санитарного состояния таких продуктов.

Количество энтерококков в пищевых продуктах колеблется в довольно значительных пределах - от 10^3 до 10^6 в 1 г или 1 см².

Наличие большого количества энтерококков в продуктах, подвергшихся тепловой обработке, свидетельствует о слабой эффективности пастеризации (нарушение режимов), о послепастеризационном загрязнении или о хранении их в условиях, благоприятных для развития энтерококков.

В официальных документах - Международном стандарте по исследованию питьевой воды, в Стандарте по исследованию питьевой воды и сточных вод, принятом в США, в Европейском стандарте - энтерококки приняты как дополнительный показатель санитарно-гигиенического качества воды, причем в Международном стандарте подчеркивается, что при обнаружении в исследуемой воде атипичных кишечных палочек наличие или отсутствие энтерококков являются решающим для суждения о фекальном загрязнении.

В нашей стране энтерококки наряду с бактериями группы кишечных палочек используют в качестве санитарно-показательных микроорганизмов при санитарной оценке воды открытых водоемов, особенно колодезь, вода которых используется в технологическом процессе.

Энтерококки также рекомендуют использовать в качестве санитарно-показательных микроорганизмов при оценке качества

хлорирования питьевой воды, при исследовании воды минеральных источников, а также пищевых продуктов с повышенной концентрацией соли (мясных продуктов).

12.4. СУЛЬФИТРЕДУЦИРУЮЩИЕ КЛОСТРИДИИ

Среди многочисленных патогенных и сапрофитных видов рода *Clostridium* в качестве санитарно-показательных привлекают микроорганизмы, постоянным местом пребывания которых является кишечник человека и теплокровных животных.

Поскольку только клостридии кишечного происхождения обладают редуцирующими (восстанавливающими) свойствами при росте на железосульфитных средах, этот признак является основным для суждения о санитарной показателности таких микроорганизмов.

Наиболее частым обитателем кишечника человека является *Cl. perfringens*, и, следовательно, именно этот микроорганизм может служить основным показателем фекального загрязнения.

В испражнениях новорожденных детей *Cl. perfringens* уже на 3-й день жизни обнаруживается в 3-4 %, на 5-й день - в 6 %, на 7-й день - в 69 %. У взрослых людей сульфитредуцирующие клостридии находят до 72-98 %, при этом титры достигают 10^8 - 10^{10} .

Биологические свойства *Cl. perfringens* представлены в главах 10, 11.

Использование *Cl. perfringens* в качестве санитарно-показательного микроорганизма основывается также на том, что споры его во внешней среде не обладают высокой устойчивостью, в пищевых продуктах он размножается только при температуре 18-20°C и выше. Начиная с 6-8 ч. хранения, по мере нарастания общего количества бактерий размножение его замедляется, а затем полностью прекращается. Особенно чувствителен *Cl. perfringens* к кислой реакции среды.

Сульфитредуцирующие анаэробы выделяются из кишечника людей и животных преимущественно в виде вегетативных клеток, а в почве, как правило, сохраняются в форме спор. По отношению количества обнаруженных в исследуемом объекте вегетативных форм к числу спор можно судить о свежести фекального загрязнения. Это достигается путем сопоставления титров, полученных при исследовании нагретого в течение 15 мин при 80 °С (только споры) и ненагретого (споры и вегетативные клетки) материала.

Однако прогретые пробы могут показывать большее содержание сульфитредуцирующих анаэробов, чем непрогретые. Причиной является способность 95 % спор *Cl. perfringens* прорасть только после так называемого "теплового шока" (нагревание при 70 °С в течение 30 мин), что затрудняет количественный учет этого микроорганизма в непастиризованных материалах.

Присутствие *Cl. perfringens* было обнаружено в 16-18 % пробы молока после его промышленной пастеризации. При наличии оптимальных условий этот микроорганизм может интенсивно размножаться в пищевых продуктах и вызывать пищевые токсикоинфекции при их употреблении.

Сульфитредуцирующие клостридии используются в качестве санитарно-показательных микроорганизмов при исследовании пищевых казеинатов, также колбасных изделий, икры, специй, пряностей и др.

Определение сульфитредуцирующих клостридий основано на высеве определенного количества продукта и его разведений в ряд пробирок с полужидкой селективно-диагностической сульфит-железной средой, культивировании посевов при 37°C в течение 24-72 ч, учете результатов и определении минимального количества продукта, в котором обнаружены грамположительные неподвижные палочки, образующие яйцевидные или шарообразные споры и редуцирующие сульфит.

В 1 г казеината допускается не более 200 клеток *Cl. perfringens*.

Приготовление сульфит-железной агаровой полужидкой среды. К 100 см³ мяско-пептонного бульона или 100 см³ гидролизованного молока добавляют 1 г сухого дрожжевого экстракта или 5 см³ жидкого дрожжевого экстракта, 0,6-0,7 г агара, устанавливают рН 7,3 после стерилизации его показатель составит 7,1. Стерилизуют при 121°C в течение 15 мин.

После стерилизации добавляют по 1 см³ горячих (75 °С) 5 %-ных водных растворов сульфата натрия и лимоннокислого железа, стерилизованных или приготовленных в асептических условиях без стерилизации на стерильной дистиллированной воде. Допускается замена сульфата натрия на гипосульфит натрия в количестве 0,1 г на 100 см³ среды, лимоннокислого железа на хлорное железо в тех же концентрациях. Среду перемешивают, разливают в стерильные пробирки по 10-12 см³ и используют для посева.

Сульфитредуцирующие клостридии на этой среде образуют колонии черного или серо-черного цвета на глубине не менее 1 см от поверхности среды (образуется черного цвета сернистое железо FeS).

При оценке эффективности технологии обработки питьевой воды определяют количество спор сульфитредуцирующих клостридий методом мембранной фильтрации или прямым посевом на железо-сульфитный агар. Споры сульфитредуцирующих клостридий не должны обнаруживаться в 20 см³ питьевой воды.

В качестве санитарно-показательного микроорганизма *Cl. perfringens* используют также для контроля очистки сточных вод. Его

преимущество перед кишечными палочками состоит в том, что он не размножается в отстойниках.

При комплексной санитарной оценке почвы и воды открытых водоемов наряду с кишечными палочками, энтерококками и бактериофагом учитывают *Cl. perfringens*, что позволяет определить давность фекального загрязнения.

12.5. БАКТЕРИИ РОДА *PROTEUS*

Биологические свойства бактерий рода *Proteus* приведены в главах 10 и 11.

Эти микроорганизмы широко распространены в природе, в основном их накопление происходит в местах, где протекают аэробные процессы гнилостного распада. Из содержимого кишечника эти микроорганизмы выделяются у 5-10 % здоровых людей. В испражнениях лошадей, рогатого скота, грызунов и других животных присутствие палочек протей бывает более частым.

Температурные границы роста бактерий группы протей лежат в пределах 10-40 °С. Они нетерmostойкие - погибают при принятых в промышленности режимах пастеризации, устойчивы к замораживанию, антибиотикам и химио-терапевтическим препаратам.

Бактерии группы протей могут размножаться в пищевых продуктах, содержащих белки и подверженных гниению. Чистые культуры при обильном размножении в течение 2-3 сут могут не вызывать изменений органолептических свойств, внешние признаки гниения появляются лишь в результате совместного действия протей и спорообразующих гнилостных аэробов.

В пищевые продукты могут попадать бактерии группы протей при нарушении санитарного режима. При 20 °С они быстро размножаются только в аэробных условиях. В анаэробных условиях протей размножается гораздо медленнее, подавляется также его ферментативная активность.

В парном и свежем молоке бактерии рода *Proteus* почти не размножаются и частично вытесняются благодаря размножению молочнокислых бактерий. В стерилизованном молоке они размножаются быстро. В стерилизованном бульоне, различных консервах, зараженных бактериями группы протей и выдержанных при 25 °С, они интенсивно размножаются и через 48 ч отмечается максимальное накопление их в количестве 1-2 млрд в 1 см³. При дальнейшем хранении это количество почти не изменяется и лишь через 10-14 дней наблюдается отмирание. При указанном содержании палочек протей пищевые продукты опасны для употребления, так как могут послужить причиной пищевого отравления.

Группа протей не имеет самостоятельного значения как показатель

фекального загрязнения. Однако ее присутствие в больших количествах пищевых продуктов свидетельствует о наличии энергичного разложения белка.

Учитывают бактерии рода *Proteus* при обследовании предприятий общественного питания по эпидемиологическим показаниям.

Как санитарно-показательные микроорганизмы бактерии рода *Proteus* используют при санитарной оценке таких продуктов как запеканка и пудинг из творога. Они не должны выявляться в 0,1 г продукта. Бактерии рода *Proteus* являются санитарно-показательными также при исследовании яичного порошка, рыбы, икры, некоторых мясных продуктов.

Вместе с *E. coli*, энтерококками, *Cl. perfringens* и бактериофагами протей применяют для санитарно-гигиенической оценки почвы и воды открытых водоемов.

При загрязнении объектов внешней среды фекальными стоками преимущественно выявляют палочки протей вида *Pr. mirabilis*.

12.6. СТАФИЛОКОККИ

Биологические свойства и систематика стафилококков представлены в главе 11.

Коагулазоположительные стафилококки вызывают воспалительные процессы у людей и животных. Однако они настолько широко распространены во внешней среде, что единичное их выявление не вызывает опасений.

Как санитарно-показательные микроорганизмы патогенные стафилококки часто используют при оценке воздуха, гигиенического состояния лечебных и детских учреждений и выявлении опасности разлития в них так называемого госпитализма.

Для пищевых продуктов этот показатель имеет другое значение, так как беспокойство вызывает не патогенность стафилококков, а энтеротоксигенность, т.е. способность вырабатывать энтеротоксин, обуславливающий пищевые интоксикации.

С этой целью выявляют наличие *Staph. aureus*; его количество в молочных продуктах регламентируется Санитарными правилами и нормами. Например, в кисломолочных продуктах присутствие золотистого стафилококка не допускается в 0,1 г творога и творожных изделий; в 1 см³ сметаны всех видов, ряженки, кефира жирного, кисломолочных напитков. В жидких заквасках *Staph. aureus* не допускается в 10 см³.

Для выделения культур токсигенных стафилококков и с целью дифференциации их от сапрофитов чаще используют электроиндифференциальные питательные среды: желточно-солевой агар (ЖСА) и молочно-солевой агар (МСА). Методы обнаружения стафилококков

основаны на их способности расти на средах с повышенным содержанием поваренной соли.

Желточно-солевой агар готовят на основе солевого агара. Для его приготовления к мясо-пептонному бульону (рН 7,2-7,4) добавляют 2 % агара и 6,5 % хлористого натрия, расплавляют на водяной бане, фильтруют, разливают по 100 см³ или 250 см³, стерилизуют при 121°C в течение 30 мин.

Вместо мясо-пептонного бульона можно использовать сухой питательный агар, добавив к нему только 6,5 % NaCl.

Для приготовления желточно-солевого агара к 100 см³ стерильного расплавленного и охлажденного до 45°C солевого агара добавляют 20 см³ эмульсии яичного желтка. После полного размешивания ЖСА разливают в стерильные чашки Петри по 20-25 см³ и хранят при температуре 4-6 °C в течение до 7 суток.

Для приготовления эмульсии яичного желтка на дно стерильной чашки Петри помещают куриное яйцо, которое предварительно тщательно протирают ватой, смоченной этиловым спиртом. Стерильным пинцетом пробивают с двух противоположных сторон яйца два отверстия. Через одно из этих отверстий из яйца полностью удаляют белок, а затем, несколько увеличив отверстие, выливают желток в стерильную колбу вместимостью 200 см³. К желтку постепенно добавляют (частями по 20-30 см³) 180-200 см³ стерильного 0,8%-ного раствора хлористого натрия, тщательно встряхивают до получения гомогенной массы.

При росте патогенных стафилококков на этой среде вокруг их колоний образуются зоны помутнения среды, т.е. они дают положительную реакцию на лецитиназу. Если стафилококки, вырастающие на ЖСА, не дают лецитиназной реакции, их отсеивают на скошенный мясо-пептонный агар и в дальнейшем дифференцируют в реакции плазмокоагуляции.

Лецитиназа относится к группе ферментов фосфолипаз. Она способна расщеплять гидролизом лецитин.

Молочно-солевой агар готовят также на основе солевого агара. На 100 см³ стерильного расплавленного и охлажденного до 45 °C солевого агара добавляют 10 см³ стерильного обезжиренного теплого молока. Среду тщательно перемешивают и разливают по чашкам.

На МСА колонии стафилококков имеют форму дисков с диаметром 2-4 мм с ровными краями, могут быть пигментированы в разнообразный цвет — желтый, белый, лимонный. Не менее 5 характерных колоний отсеивают на скошенный мясо-пептонный агар и в дальнейшем с этими культурами ставят реакцию плазмокоагуляции (для дифференциации патогенных и сапрофитных стафилококков).

Реакция плазмокоагуляции. В пробирку с 0,5 см³ стерильной

плазмы крови вносят одну бактериологическую петлю агаровой или 0,1 см³ бульонной 18-24 часовой культуры испытуемого микроорганизма. Инкубируют при 37 °С и учитывают результат через 30 мин, 2, 4 и 24 ч. Положительный результат – образование плотного или рыхлого сгустка; если использовали разведенную плазму, то сгусток плавает в жидкости.

Приготовлении плазмы. Используют плазму кролика, цельную или разведенную физиологическим раствором 1:2 – 1:4. Взятую у кролика пункцией сердца кровь (около 10 см³) помещают в пробирку с 1 см³ 5%-ного стерильного раствора лимоннокислого натрия, тщательно перемешивают, центрифугируют. Плазму (надосадочную жидкость) переносит в стерильные пробирки и хранят в холодильнике 4-5 сут.

12.7. ДРОЖЖИ И ПЛЕСЕНИ

Дрожжи – это одноклеточные организмы, не образующие мицелий, округлой, овальной или удлиненной формы. Систематика и биологические свойства дрожжей представлены в главах 2, 6, 9.

Плесени называют мицелиальные нитчатые грибы или гифомицеты, их систематика и морфологические свойства описаны в главе 2.

Дрожжи и плесени часто являются индикаторами порчи, т.е. возбудителями пороков молочных продуктов, в связи с этим их называют «технически вредными» микроорганизмами. Среди них имеются и патогенные представители, которые могут вызывать микозы и микотоксикозы.

Грибы, попадая в молочные продукты и развиваясь в них, используют молочную кислоту, изменяют рН в щелочную сторону, в результате чего развиваются гнилостные бактерии. Дрожжи и плесени портят товарный вид продуктов, обладая липолитической способностью, вызывают гидролиз жира с образованием жирных кислот, что ведет к прогорканию продуктов.

Плесени обладают протеолитической активностью, они вызывают гнилостную порчу продуктов и обуславливают порок – горький вкус. Дрожжи гнилостную порчу не вызывают, но обуславливают ослизнение, что сокращает сроки хранения продуктов в охлажденном состоянии.

Характерной особенностью дрожжей является их способность развиваться в средах, содержащих до 24 % NaCl и до 60 % сахарозы.

В качестве санитарно-показательных грибов чаще используют дрожжи рода *Candida*, которые постоянно присутствуют в организме человека. Их обнаруживают в выделениях людей, не страдающих микозами, в 23-40 % случаев. При этом в верхних дыхательных путях преобладают *C. albicans*, а в содержимом кишечника – *C. tropicalis*. Дрожжи могут находиться также на коже, в полости рта, слоне и в

мокроте, на слизистой влагалища.

Количество дрожжей, содержащихся в организме человека, может резко повышаться в результате вытеснения конкурирующих с ними представителей нормальной микрофлоры при частой и энергичной антибиотикотерапии. При этом дрожжи активируются и иногда становятся причиной серьезных вторичных инфекций.

Грибы рода *Candida* встречаются и у животных, они довольно широко распространены во внешней среде – в почве, воде, на разнообразных растениях, а также на предметах человеческого обихода, особенно в больницах и предприятиях общественного питания, в банях и т.п. Эти грибы весьма часто встречаются в разнообразных пищевых продуктах, особенно в молочных и овощных.

Считается, что первоисточником при распространении этих грибов являются люди и животные, а окружающие их объекты, загрязненные выделениями, обсеменяются лишь вторично. Однако при определенных условиях дрожжи рода *Candida* размножаются в объектах, содержащих необходимые питательные вещества.

Резистентность дрожжей рода *Candida* к внешним воздействиям довольно значительна, в ряде случаев они оказываются более устойчивыми, чем патогенные бактерии.

Споры плесневых грибов постоянно обитают в воздухе, почве, навозе, в продуктах, на поверхности различных предметов, стен сырых помещений и пр. Имеется специфическая молочная плесень (*Geotrichum lactis*), преимущественно обитающая в молочных продуктах. Плесени очень устойчивы к низким температурам. Являясь психрофилами, некоторые плесени родов *Thamnidium*, *Rhizopus* и *Cladosporium* могут развиваться в холодильниках при минус 9-11 °С.

По отношению к высоким температурам вегетативные формы дрожжей и плесеней не являются термостойкими. При нагревании клетки дрожжей гибнут при 50-60 °С в течение 5 мин, а споровые формы за это же время отмирают при 70-80 °С. Вегетативные формы плесеней погибают при 60 °С за 30 мин, а споры их уничтожаются за это же время при 80 °С.

Для выявления дрожжей и плесневых грибов чаще применяется питательная среда Сабуру. При ее приготовлении к 1 000 см³ дистиллированной воды добавляют 18 г агара и оставляют на 30 мин для его набухания, затем добавляют 40 г мальтозы или глюкозы и 10 г пептона, нагревают до полного растворения (при наличии осадка фильтруют). Устанавливают рН 6,5 с помощью молочной кислоты, разливают в мерные колбы и стерилизуют при 116 °С в течение 20 мин.

Для повышения селективности, т.е. подавления развития посторонних микроорганизмов, в среду Сабуру добавляют растворы антибиотиков – пенициллина (50 ЕД/см³), левомицетина (10 мкг/см³).

Метод определения дрожжей и плесневых грибов основан на посеве определенного количества продукта или его разведений в селективную агаризованную среду Сабуро, культивировании посевов при 24°C в течение 5 сут и подсчете колоний дрожжей и плесневых грибов, типичных по макро- и микроскопической картине.

Колонии дрожжей округлые, блестящие, чаще серовато-белого, розового, желтого цвета. В препаратах из таких колоний находят крупные округлые, овальные клетки дрожжей. Колонии плесневых грибов пушистые и имеют различную окраску.

Наличие дрожжей на технологическом оборудовании контролируют следующим образом. Стерильным тампоном, смоченным стерильным раствором хлористого натрия, протирают исследуемый участок оборудования. Тампон опускают в пробирку со стерильным молоком и выдерживают 16-24 ч при 24 °С. После выдержки просматривают микроскопические препараты из молока и устанавливают наличие дрожжей.

По присутствию дрожжей и плесеней оценивают санитарное состояние заквасок, плавяных сыров, масла топленого, сухих смесей для мятого мороженого, некоторых детских молочных продуктов, сахара, воздуха и др.

В заквасках для кисломолочных продуктов (кроме кефира) количество плесеней и дрожжей не должно превышать 10 КОЕ/г, в сырах плавяных без наполнителей – не более 50 КОЕ/г, в масле коровьем топленом – не более 200 КОЕ/г. В сухих смесях для мягкого мороженого с наполнителем (овощи, грибы и т.п.) количество плесеней и дрожжей не должно превышать 100 КОЕ/г, в смеси молочной «Малыш» с рисовой, гречневой, овсяной мукой или с толокном количество плесеней допускается в количестве, не превышающем 100 КОЕ/г, а дрожжей - 50 КОЕ/г.

При посеве воздуха цеховых помещений седиментационным методом в течение 5 мин на плотной питательной среде должно обнаруживаться не более 15 колоний плесеней и 10 колоний дрожжей.

В сахаре наличие дрожжей и плесеней не допускается в 1 г.

12.8. КИШЕЧНЫЕ БАКТЕРИОФАГИ

Биологические свойства фагов описаны в главах 2, 10.

Одним из показателей фекального загрязнения является присутствие в объектах среды разнообразных бактериофагов, лизирующих гомологичные (соответствующие) им кишечные бактерии, т.е. литическое действие бактериофага характеризуется определенной степенью специфичности, так как каждый фаг вызывает лизис бактерий определенного вида. Колифаги лизируют родственные бактерии, монофаги – бактерии одного вида, типовые фаги – только определенный

тип (вариант) данного вида бактерий. В связи с этим фаги обнаруживаются всюду, где живут их хозяева и выявление специфичных для энтеробактерий фагов столь же достоверно указывает на загрязнение объекта, как и обнаружение самих микробов кишечной группы.

До недавнего времени вопрос о санитарном значении бактериофагов казался излишним по двум причинам. С одной стороны, методика обнаружения фагов более сложна, чем выявление обычных санитарно-показательных микробов-кишечных палочек и энтерококков. С другой стороны, фаги более устойчивы по отношению ко многим факторам внешней среды, чем большинство бактерий-хозяев. Обнаружение бактериофагов возможно не только при свежем фекальном загрязнении, актуальном в санитарном отношении, но и после того, как занесенные в исследуемый объект патогенные и сапрофитные энтеробактерии успевают погибнуть. Очевидно, что оценка опасности загрязнения внешней среды возбудителями кишечных инфекций возможна лишь при сопоставлении результатов поисков фагов с данными обычной колиметрии и определения энтерококков, так как заменить эти методы фаговый тест не может. Поэтому фаги используют в качестве дополнительного показателя фекального загрязнения воды патогенными энтеробактериями.

Санитарно-показательное значение бактериофагов особенно возросло в связи с появлением водных вспышек ряда вирусных заболеваний – полиомиелита, эпидемического гепатита и др. Установлено, что многие энтеровирусы и аденовирусы более стойки во внешней среде, чем кишечная, брюшнотифозная и дизентерийная палочки. Из этого следует, что в условиях, неблагоприятных для выживания патогенных и сапрофитных энтеробактерий, ряд вирусов может сохранять жизнеспособность и представлять существенную опасность для человека.

Этим объясняется, что в качестве индикаторов загрязнения воды патогенными энтеровирусами было предложено использовать бактериофаги, которые по своим биологическим свойствам стоят к энтеровирусам ближе, чем бактерии группы кишечных палочек или другие санитарно-показательные микроорганизмы.

При исследовании питьевой воды определяют наличие и количество колифагов.

Колифаги – бактериальные вирусы, способные лизировать кишечные палочки рода *Escherichia*, выращенные на питательном агаре, и формировать зоны лизиса (бляшки) на их сплошном росте (газоно). Колифаги являются индикаторами очистки питьевой воды в отношении энтеровирусов.

Принцип прямого метода определения колифагов в питьевой воде заключается в исследовании нормируемого объема воды (100 см³) путем

его прямого посева и последующего учета зон лизиса (бляшек) на сплошном росте *E. coli* в чашках Петри с питательным агаром.

Исследуемую воду 100 см^3 вносят в 5 стерильных чашек Петри по 20 см^3 в каждую. В чашки, содержащие исследуемую воду, заливают по 30 см^3 питательного агара, в который предварительно вносят сывец культуры *E. coli*. Посевы инкубируют при температуре 30°C в течение 72 ч.

Учет результатов проводят подсчетом бляшек, выросших на 5 чашках Петри. Результаты выражают в бляшкообразующих единицах (БОЕ) на 100 см^3 воды. В питьевой воде БОЕ должны отсутствовать в 100 см^3 исследуемой воды.

12.9 ОБЩАЯ БАКТЕРИАЛЬНАЯ ОБСЕМЕНЕННОСТЬ (АЭРОБНЫЕ И ФАКУЛЬТАТИВНО-АНАЭРОБНЫЕ МЕЗОФИЛЬНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ)

Принято считать, что чем выше общая микробная обсемененность объекта внешней среды, тем выше вероятность присутствия в них патогенных микробов.

Общую бактериальную обсемененность продуктов выражают показателем КОЕ (колониеобразующие единицы), который характеризует количество колоний мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ), выросших на плотной питательной среде при посевах 1 г. или 1 см^3 субстрата и культивировании посевов при 37°C в течение 24-48 ч. При исследовании воды этот показатель часто называют микробным числом, в Методах санитарно-микробиологического анализа питьевой воды (1997 г.) показатель назван ОМЧ – общее микробное число.

Показатель КОЕ не характеризует количество микроорганизмов в исследуемом объекте, так как не растут на МПА и не образуют колонии живые клетки, утратившие способность к размножению; не всегда развиваются бактериальные конгломераты, и одна колония вырастает из нескольких клеток; не вырастают анаэробы, так как культивирование проводят в аэробных условиях; не дадут роста термофилы и психрофилы; не учитываются плесени и актиномицеты, рост которых можно обнаружить на 3-4-е сутки, многие патогенные и другие микроорганизмы, культивируемые на специальных питательных средах; не вырастут также вирусы и риккетсии, не развивающиеся вообще на питательных средах.

Показатель КОЕ обусловлен развитием в основном мезофильных сапрофитных микроорганизмов – гнилостных споровых и неспорообразующих бактерий, бактерий группы кишечных палочек, коковой микрофлоры (стафилококков, микрококков, сарцин), некоторых патогенных бактерий, например сальмонелл и др.

Эти бактерии могут быть отнесены к санитарно-гигиеническим

индикаторам в меньшей степени, чем другие санитарно-показательные микроорганизмы. Продукты, в которых обнаружено большое количество бактерий, даже не патогенных и не изменяющих органолептические показатели, нельзя считать полноценными для здоровья по следующим причинам: значительное количество жизнеспособных клеток в пищевых продуктах свидетельствует о недостаточной эффективности термической обработки сырья, о не вполне тщательной мойке и дезинфекции оборудования, о неудовлетворительных условиях хранения, при которых развиваются определенные группы микроорганизмов.

Высокая бактериальная обсемененность свидетельствует также о возможной порче продуктов. Содержание в пищевых продуктах 10^6 - 10^8 микроорганизмов в 1 г (см^3) является признаком недоброкачественности таких продуктов.

Оценка санитарного качества продуктов по общему количеству бактерий имеет ряд недостатков: проводится учет только аэробных и факультативно-анаэробных мезофильных микроорганизмов и исключаются другие микроорганизмы, осуществляется только количественная оценка микрофлоры без учета её качественного состава; небольшое содержание бактерий в продуктах не гарантирует безопасности, так как незначительная обсемененность продукта патогенными микробами может привести к тяжелым последствиям; в продуктах, подвергнутых термической обработке, при малых значениях КОЕ может находиться накопившийся до пастеризации стафилококковый энтеротоксин, не разрушающийся при таком тепловом воздействии.

К преимуществам учета общей бактериальной обсемененности следует отнести возможность контроля уровня санитарно-гигиенических условий производства и выявления нарушений условий хранения и транспортировки продуктов, приводящих к размножению микроорганизмов.

Определение общей бактериальной обсемененности не имеет значения для продуктов, хранящихся при низких температурах, так как многие мезофильные микроорганизмы погибают во время хранения при температурах от минус 15 до минус 5°C и ниже. Для оценки продуктов, хранящихся в условиях холодильника, более предпочтительным является подсчет психотрофных бактерий после выдержки исследуемых образцов при температуре 0 - 5°C .

Оценка показателя КОЕ в известной степени односторонняя, так как предельно допустимым количеством мезофильных аэробов и факультативно-анаэробных бактерий в пищевых продуктах является 10^4 - 10^5 в 1 г (см^3).

Большое влияние на подсчет общего количества бактерий в молоке и молочных продуктах оказывает питательная среда. Для получения сравнимых микробиологических показателей необходимо пользоваться

единицами питательными средами, состоящими из компонентов стандартного состава.

В молочной промышленности для определения общего количества бактерий используется питательная среда, предписанная ГОСТ 9225-84. Ее состав: гидролизованное молоко — 25 г, агар — 15 г, питьевая вода — до 1 000 см³.

40 г сухой питательной среды помещают в колбу и доливают водой до 1 000 см³. Смесь перемешивают, нагревают до полного растворения агара (при наличии осадка — профильтровывают), устанавливают рН 6,8-7,0. Разливают в пробирки или колбы и стерилизуют при 121 °С в течение 15 мин.

Для определения общего количества бактерий из исследуемой пробы продукта производят посевы в две — три чашки Петри из различных разведений в объеме 1 см³ в одну чашку. Посевы заливают расплавленным и охлажденным до 40-45 °С питательным агаром и после застывания среды культивируют при 30 °С в течение 72 ч. Количество выросших колоний подсчитывают на каждой чашке и определяют среднее общее количество колоний (бактерий) в 1 см³ или 1 г продукта.

МИКРОБИОЛОГИЯ СЫРОГО МОЛОКА

Молоко — это биологическая жидкость, секретируемая молочной железой млекопитающих через 5-7 сут после родов и физиологически предназначенная для питания новорожденных.

Молоко сельскохозяйственных животных является ценным пищевым продуктом. Наибольшее распространение в питании людей получили молоко коровье и продукты его переработки.

По химическому составу молоко животных различно. Состав основных компонентов коровьего молока колеблется в следующих пределах: белок — 2,7-3,7 %, жир — 2,7-6,0, молочный сахар — 4,0-5,6, минеральные вещества — 0,6-0,85 %. Парное молоко содержит все витаминные и микроэлементы, необходимые для нормальной жизнедеятельности организма.

Сыром называют свежеполученное молоко, не подвергавшееся тепловой обработке.

13.1. ИСТОЧНИКИ ОБСЕМЕНЕНИЯ МОЛОКА МИКРООРГАНИЗМАМИ

Содержание микроорганизмов в сыром молоке отражает уровень гигиены получения молока, особенно степень чистоты доильных установок, условия его хранения и транспортирования.

Известны два пути обсеменения молока микроорганизмами: эндогенный и экзогенный. При эндогенном пути молоко обсеменяется микроорганизмами непосредственно в вымени животного. Экзогенное обсеменение происходит из внешних источников: кожи животного, подстилочных материалов, кормов, воздуха, воды, доильной аппаратуры и посуды, рук и одежды работников молочной фермы.

Эндогенное обсеменение. В молоке вымени всегда содержится определенное количество микроорганизмов. В железистой части вымени микроорганизмы могут находиться непосредственно и в единичном количестве клеток. В выводных протоках и молочной цистерне количество бактерий может достигать нескольких десятков или сотен клеток в 1 см³. Это микроорганизмы — комменсалы вымени. К ним относятся энтерококки (*Ent. liquefaciens*), микрококки, иногда масляные стрептококки, коринебактерии и др.

Молоко вымени, получаемое стерильно не через сосковый канал, называют асептическим. Оно содержит незначительное количество микроорганизмов — десятки-сотни клеток в 1 см³.

У старых коров микробов в вымени содержится больше, чем у молодых.

Здоровый сосковый канал защищает вымя от внешней среды

благодаря его анатомическому строению. Кроме того, свободные жирные кислоты, синтезируемые слизистой оболочкой соскового канала, оказывают бактерицидное воздействие. Секрет соскового канала содержит также фосфолипиды, убивающие масляные стрептококки и другие микроорганизмы. При нарушении защитных функций соскового барьера микроорганизмы, постоянно находящиеся в сосковом канале, могут попадать в вымя и там размножаться.

У входа в сосковый канал, в каплях молока, оставшихся от предыдущей дойки постоянно размножаются микроорганизмы, образуя так называемую бактериальную пробку, в которой количество бактерий достигает сотен тысяч клеток в 1 см³ молока. Поэтому перед дойкой первые струйки молока необходимо сдавать в отдельную посуду, т. е. бактериальные пробки не должны попадать в общую массу молока.

Эндогенное обсеменение молока вымени может происходить также при маститах, септических инфекционных болезнях, травмах и воспалительных процессах соскового канала и вымени.

Экзогенное обсеменение. Важнейшим источником бактерий сырого молока является кожа животного, и особенно кожа вымени и сосков, на которые надевают доильные стаканы.

Молочная пленка, образующаяся в процессе доения между кожей сосков и доильными стаканами, наличие на коже грубых и мелких складок, а также относительно высокая температура создают благоприятные условия для развития микрофлоры. Она состоит из микрококков, энтерококков, кишечных палочек и других сапрофитов, а также патогенных и нежелательных для производства молока микроорганизмов.

Следует стремиться к тому, чтобы после обмывания перед доением концентрация микробов на коже вымени была не выше 10³ микробов на 1 см².

Подстилочные материалы из соломы и сена являются существенным источником загрязнения кожного покрова животного, а затем и молока кишечными палочками, маслянокислыми бактериями, энтерококками, гнилостными спорообразующими бактериями, дрожжами, плесенями, молочнокислыми бактериями и др. Нельзя использовать в качестве подстилки торфяную крошку.

В кормах также содержится много разнообразных микроорганизмов. В свежескошенной траве больше молочнокислых бактерий, в грубых кормах - гнилостных спорообразующих аэробных бацилл. В кормах содержатся пропионовокислые, уксуснокислые бактерии, актиномицеты, дрожжи и др.

Кормление коров прокисшим или смешанным с землей кормом, плохим силосом или кислой бардой в сочетании с имеющимися недостатками в гигиене содержания животных ведет к загрязнению

молока маслянокислыми и другими бактериями.

Недоброкачественный корм вызывает у коров понос, а молоко загрязняется бактериями через содержимое кишечника, в 0,1 г которого содержится от 10 тыс. до 100 тыс. бактерий. В содержимом кишечника возможно наличие патогенных и нежелательных для молочного производства микроорганизмов.

Часто выделяющиеся у коров сальмонеллы имеются только в сыром молоке, так как энтеробактерии уничтожаются при пастеризации.

Поскольку молоко в настоящее время получают и хранят преимущественно в замкнутых системах, сырое молоко загрязняется в основном при ручной доении. Однако при смене молокопроводов всегда подсабсывается наружный воздух.

Общее количество микроорганизмов в воздухе составляет 300-1500 клеток в 1 м³.

Содержание микробов в воздухе в течение одного дня сильно меняется. Во время раздачи и приема корма количество микробов воздуха достигает максимальной величины. Качественный состав микрофлоры воздуха представлен чаще микрококками, сарцинами, клетками дрожжей и спорами плесеней.

Вода, отвечающая требованиям ГОСТа на питьевую воду и применяемая для мытья молочной посуды и аппаратуры, содержит незначительное количество микроорганизмов. Вода открытых водоемов или загрязненная вода содержит флюоресцирующие палочки, кокковую микрофлору, кишечные палочки, гнилостные бактерии и др.

Доильные установки и резервуары для хранения молока являются основным источником заражения молока психрофильными бактериями, преимущественно псевдомонадами, которые интенсивно размножаются в молочно-водной среде на плохо вымытых и дезинфицированных установках, находясь в активной фазе размножения. У них отсутствует период адаптации - лагфаза. В плохо вымытой и непросушенной аппаратуре размножаются также молочнокислые бактерии, кишечные палочки, микрококки, гнилостные микроорганизмы и др.

Руки и одежда работников ферм могут стать источником обсеменения молока возбудителями (кишечными палочками, стафилококками, стрептококками и др.) различных болезней. Работники ферм, соприкасающиеся с молоком, обязаны строго выполнять правила личной гигиены, предупреждающие обсеменение молока микроорганизмами.

13.2. ИЗМЕНЕНИЕ МИКРОФЛОРЫ МОЛОКА ПРИ ХРАНЕНИИ

Во время хранения молока изменяется количество содержащихся в нем микроорганизмов, а также соотношение между отдельными группами и видами бактерий. Характер этих изменений зависит от

температуры и продолжительности хранения молока, а также от степени обсеменения и состава микрофлоры. Размножающаяся и накапливающаяся в процессе хранения молока микрофлора называется вторичной. Изменение вторичной микрофлоры происходит по определенным закономерностям, т. е. проходит через определенные естественные фазы развития, изученные С. А. Королевым: бактерицидная фаза, фаза смешанной микрофлоры, фаза молочнокислых бактерий, фаза дрожжей и плесеней.

Бактерицидная фаза. Время, в течение которого микроорганизмы не развиваются в свежесвыдоенном молоке и даже частично отмирают, называют бактерицидной фазой. Бактерицидные свойства молока обусловлены присутствием в нем лизоцимов, нормальных антител, лейкоцитов и др.

Лизоцимы (лактенины) представляют собой вещества белковой природы (ферменты), образующиеся в организме животного и обладающие бактерицидным и бактериостатическим действием по отношению ко многим видам бактерий. Большое количество лизоцимов находится в различных жидкостях организма: слезной жидкости, слюне, спинномозговой жидкости, молоке и особенно в молозиве и околплодной жидкости.

В молоке коров находится четыре группы лизоцимов: лизоцим М (молока), лизоцим В (вымени), лизоцим О (основной), лизоцим Т (термостабильный). Они вырабатываются молочной железой или поступают в молоко из крови. При пастеризации молока лизоцимы (кроме термостабильного) инактивируются.

Наибольшей бактерицидной активностью отличается лизоцим М. Он действует губительно на патогенные стафилококки, маститного стрептококка, сальмонелл, кишечных палочек, возбудителя сибирской язвы и др., особенно грамположительных микроорганизмов. Отсутствие лизоцима М в свежесвыдоенном молоке свидетельствует о заболевании молочной железой; такое молоко является биологически неполноценным, так как в нем беспрепятственно могут размножаться многие виды микроорганизмов.

В молоке, содержащем большое количество микроорганизмов, лизоцимы быстро расходуются и довольно скоро утрачивают свое антибактериальное действие.

Антитела — гамма-глобулины, образующиеся в макроорганизме в ответ на введение в него микроорганизмов, их продуктов обмена или других чужеродных белковых веществ. Антитела являются термолabileными, т. е. они разрушаются при пастеризации молока.

Лейкоциты (фагоциты) — клеточные элементы крови макроорганизма, способные активно поглощать и растворять живые и убитые микроорганизмы. Они всегда содержатся в небольшом

количестве в молоке, выполняя защитную антибактериальную функцию. При воспалении молочной железы количество лейкоцитов в молоке увеличивается в сотни раз, что является диагностическим признаком ранних форм маститов. При тепловой обработке молока лейкоциты уничтожаются.

Таким образом, наличие бактерицидной фазы молока обусловлено присутствием биологических защитных факторов, созданных самой природой.

Продолжительность бактерицидной фазы имеет большое значение в сохранении хорошего качества молока. Она зависит от температуры хранения молока, степени его обсеменения, состава микрофлоры и индивидуальных особенностей дойных животных.

Особенно большое влияние на продолжительность бактерицидной фазы оказывает температура хранения молока. Чем она выше, тем короче бактерицидная фаза:

Температура хранения молока, °С	37	30	25	10	5	0
Продолжительность бактерицидной фазы, ч	2	3	6	24	36	48

Зависимость продолжительности бактерицидной фазы от степени обсеменения молока тоже обратная: чем больше микроорганизмов в молоке, тем менее продолжительна бактерицидная фаза. С увеличением концентрации бактерий в молоке на несколько тысяч клеток при одной и той же температуре хранения продолжительность бактерицидной фазы сокращается в два раза.

Таким образом, существует два пути увеличения продолжительности бактерицидной фазы: получение бактериально чистого молока и его немедленное охлаждение до низких плюсовых температур.

Фаза смешанной микрофлоры. По окончании бактерицидной фазы начинается ничем не задерживаемое размножение всех групп микроорганизмов, находящихся в молоке и способных в нем размножаться при данных условиях. Интенсивность их размножения будет различной. Эта фаза является периодом наиболее быстрого размножения микрофлоры. Она продолжается от 12 ч до 1-2 сут. В течение этого периода микрофлора молока возрастает от немногих тысяч микробов, которые оно имеет к концу бактерицидной фазы, до сотен миллионов. В остальных фазах развития концентрация микробов может увеличиться до 1-3 млрд. Такой быстрый темп размножения объясняется тем, что в молоке в это время еще не накопились продукты жизнедеятельности микроорганизмов, задерживающие их дальнейшее развитие. Лишь к концу фазы продукты обмена в виде органических кислот будут задерживать развитие многих групп микроорганизмов, чем

и определяется граница между фазой смешанной микрофлоры и следующей.

Качественный состав микробов в фазе смешанной микрофлоры определяется составом первичной микрофлоры молока, скоростью размножения различных видов микроорганизмов и температурными условиями хранения молока.

В зависимости от температуры хранения в данной фазе в молоке может развиваться микрофлора трех типов: криофлора (флора низких температур), мезофлора (флора средних температур) и термофлора (флора высоких температур).

К р и о ф л о р а развивается при хранении молока в охлажденном состоянии при температуре от 0 до 10 °С. В этих условиях микроорганизмы размножаются очень медленно. Например, при температуре 4,5 °С накопление биомассы за 24 ч составляет 9 %. Молочнокислые бактерии практически не размножаются. Если молоко хранят и далее при низких температурах, то микрофлора не выходит за пределы фазы смешанной микрофлоры, которая может продолжаться довольно долго, не давая резких видимых изменений молока. Однако количество микрофлоры в молоке неуклонно нарастает, и постепенно накапливаются продукты ее жизнедеятельности. Даже при температуре около 0 °С в течение двух недель количество бактерий в молоке может увеличиваться в десятки тысяч раз и составлять сотни миллионов клеток в 1 см³. При этом характер изменений молока обусловлен развитием сначала микрококков, затем флюоресцирующих палочек, *Vac. megatherium*, *Vac. subtilis* и других гнилостных микроорганизмов, т. е. процессы идут в направлении гнилостного разложения белков и отчасти разложения жира.

М е з о ф л о р а развивается при хранении молока в температурных пределах от 10 до 35 °С, т. е. при хранении молока без охлаждения. При этом характерны быстрое размножение микроорганизмов и неуклонное нарастание количества молочнокислой микрофлоры, которая, в конце концов, получает решительный перевес над остальными микроорганизмами, чем и обусловлен переход к следующей фазе — фазе молочнокислых бактерий. Однако в составе микрофлоры, особенно в начальной стадии фазы смешанной микрофлоры, развиваются бактерии группы кишечных палочек, флюоресцирующие и другие гнилостные бактерии, ухудшающие качество молока. Поэтому надо стремиться к тому, чтобы молоко вообще не находилось в фазе смешанной микрофлоры. В неконтролируемых условиях фаза смешанной микрофлоры продолжается одни сутки, реже - двое.

Т е р м о ф л о р а развивается при температуре 40-45 °С. Такие условия наблюдаются в сырдели при производстве твердых сыров с

высокой температурой второго нагревания.

Во время хранения молока при искусственно созданных высоких температурах (в термостате) развитие микрофлоры идет в сторону обогащения молочнокислыми термофильными палочками и стрептококками.

Фаза молочнокислых бактерий. Эта фаза начинается с момента заметного нарастания кислотности и преобладания молочнокислых бактерий в молоке (кислотность около 60 °Т и свыше 50 % молочнокислых стрептококков от общего количества бактерий). В дальнейшем с накоплением молочной кислоты молочнокислые бактерии замедляют темп своего размножения, а остальные группы микроорганизмов постепенно отмирают.

Наиболее чувствительными к повышению кислотности являются флюоресцирующие бактерии, за ними погибают гнилостные микроорганизмы, далее — микрококки, а также бактерии группы кишечных палочек, дольше всех выдерживающие нарастание кислотности среди немолочнокислых бактерий. Молочная кислота не является губительным фактором для спор дрожжей и плесеней, находящихся в молоке.

Следовательно, в течение молочнокислой фазы происходит как бы самоочищение молока почти от всех групп микроорганизмов, кроме молочнокислых бактерий, количество которых к концу фазы приближается к 100 % всей микрофлоры.

Количество молочнокислых бактерий в первичной микрофлоре оказывает некоторое влияние на скорость вытеснения остальных микроорганизмов, но на конечный результат почти не влияет.

Первоначально в фазе молочнокислых бактерий преобладают молочнокислые стрептококки, максимальное количество которых (до 2 млрд в 1 см³) накапливается через 1—2 сут. При этом предельная кислотность достигает 120°Т и наблюдается массовое отмирание стрептококков. Молочнокислые палочки, как более кислотоустойчивые, продолжают размножаться, и уже на 4-е сутки их количество превышает количество стрептококков, а через 7 сут увеличение достигает почти 100 %. В дальнейшем после возрастания кислотности до 250-300 °Т происходит отмирание и молочнокислых палочек.

Продолжительность молочнокислой фазы очень велика, она может длиться месяцами без каких-либо заметных изменений в микрофлоре, кроме только что рассмотренных. Это объясняется наличием молочной кислоты, которая подавляет развитие микроорганизмов. В этот период времени не могут размножаться и дрожжи с плесенями. Молочнокислую фазу можно назвать также фазой консервирования молока, хотя оно не является абсолютным, так как по истечении некоторого времени возникают новые микробиологические процессы — развиваются дрожжи

и плесени.

Фаза молочнокислых бактерий охватывает то состояние молока, в котором оно перестает быть собственно молоком, а является кисломолочным продуктом. Молоко в начале этой стадии можно иногда использовать в производстве сыра или масла.

Закономерности кисломолочного процесса, обусловленные развитием молочнокислых бактерий, учитывают при производстве кисломолочных продуктов, кислосливочного масла и сыра.

Фаза развития дрожжей и плесеней. Эта фаза является заключительной во всем процессе микробиологических изменений молока. После полного ее завершения органическое вещество молока претерпевает почти полную минерализацию (разложение на неорганические вещества). Начальные стадии фазы могут наблюдаться в масле, сыре, твороге и сметане.

Внешняя картина развития этой фазы выражается в том, что еще во время молочнокислой фазы на поверхности ступка (если он не подвергается перемешиванию) образуются отдельные островки молочной плесени (*Geotrichum lactis*), постепенно смыкающиеся в сплошную белую пушистую пленку. В это же время появляются дрожжи вида *Candida pusiodermata*, участвующие в образовании плески. Позже появляются плесени родов *Penicillium* и *Aspergillus*.

Внешний вид и качество молока в это время изменяются сравнительно слабо. Появляется прогорклый вкус, обусловленный продуктами разложения жира, что особенно бывает заметно в кислых сливках (сметане). Появляются плесневый и дрожжевой привкусы. Через некоторое время под пленкой начинают появляться признаки пептонизации в виде слоя полупрозрачной жидкости светлого-желтого или темно-бурого цвета. Слой быстро увеличивается за счет исчезающего ступка, который в дальнейшем полностью растворяется, превращаясь в буроватую жидкость, закрытую сверху, как пробкой, толстой пленкой плесени. По мере распада белка реакция среды становится щелочной, в результате чего создаются условия для развития гнилостных бактерий.

Плесени, развиваясь во время продолжения молочнокислой фазы, разлагают белки и подщелачивают субстрат, что на время активизирует развитие отмирающих молочнокислых бактерий. Поэтому правильное было бы сказать, что фаза плесеней «налагается» на молочнокислую, а не заменяет ее, как это имеет место между фазой смешанной микрофлоры и фазой молочнокислых бактерий.

13.3. ПОРОКИ СЫРОГО МОЛОКА

Под пороками молока понимают необычные, исключительные отклонения свойств молока от нормы.

Пороки возникают при нарушении санитарно-гигиенических

правил получения, первичной обработки и нарушения режимов хранения молока. Проявление различных пороков обусловлено развитием микроорганизмов, преобладающих в молоке. Условно пороки молока подразделяют на пороки консистенции, вкуса, запаха, цвета и пороки смешанного характера.

Пороки консистенции. Ослизнение и тягучесть молока — один из распространенных пороков консистенции. Различают ослизнение без заметного нарастания кислотности и ослизнение с повышением кислотности, сопровождающее нормальный кисломолочный процесс.

Ослизнение без заметного нарастания кислотности вызывается беспоровой палочкой *Bact. lactis viscosum*, по биологическим свойствам близкой к кишечной палочке *Enterobacter aerogenes*, но не обладающей газообразующей способностью.

Так как кислотность молока не повышается, то оно не свертывается, а приобретает лишь тягучесть, особенно выраженную на поверхности. При дальнейшем развитии наблюдается пептонизация — появляется полупрозрачный отстой буроватой своротки. Молоко приобретает горький вкус, оно свертывается при нагревании.

Возникновению порока способствуют задержка кисломолочного процесса и длительное хранение молока при температуре ниже 10 °С. Ослизнение с повышением кислотности обусловлено развитием слизееобразующих штаммов *Lac. cremoris* и *Lbm. acidophilum*. Порок возникает при хранении молока при температуре выше 10 °С.

Преждевременное свертывание проявляется при нагревании молока, имеющего нормальную или незначительно повышенную кислотность. Возбудителями этого порока в сыром молоке являются микрококки и маммококки (*Ent. liquefaciens*), выделяющие протеолитические ферменты типа сычужного, которые и обуславливают порок. Причиной порока может быть также примесь мазюка в молоке.

Пороки вкуса и запаха. Горький вкус возникает при длительном хранении молока при низких температурах (ниже 10 °С). Причиной порока является пептонизация молока, вызываемая маммококками (*Ent. liquefaciens*) и гнилостными микроорганизмами, разлагающими белки до пептонов, имеющих горький вкус.

Прогорклый вкус связан с изменениями жира. Возбудителями порока являются главным образом флюоресцирующие палочки и другие виды, обладающие липолитической активностью. Порок обусловлен накоплением в молоке продуктов разложения жира — альдегидов, кетонов, масляной кислоты.

Мыльный, щелочной вкус возникает при долговременном хранении охлажденного молока. Причинами порока являются бактериальное разложение белков и мыление жира,

вызываемое гнилостными неспорообразующими палочками *Bact. lactis sarpopacei* и *Bact. sarpolacticum*, оптимальной температурой развития которых является температура 10 °С. По биологическим свойствам первый вид близок к *E. coli*, второй - к *Ps. fluorescens*.

Несвойственные молоку запахи (навозный, травяной, репный, сырный, тухлый и др.) возникают при развитии кишечных и флюоресцирующих палочек, которые разлагают азотистые вещества с образованием летучих продуктов с разнообразными запахами.

Пороки цвета. Синее молоко возникает через 24-72 ч при хранении молока при температуре 20-25 °С или же при длительном хранении молока при температуре ниже 10 °С. Синяя окраска молока наблюдается только на его поверхности. Возбудителем порока является синегнойная палочка *Ps. aeruginosa*.

Красное молоко возникает при развитии в охлажденном молоке чудесной палочки - *Serratia marcescens*, образующей на поверхности молока красные пятна. Порок необходимо отличать от крови, попадающей в молоко при маститах, - кровь оседает на дно сосуда.

Желтое молоко встречается очень редко, при длительном хранении охлажденного молока при температуре ниже 10 °С. Возбудителем порока является грамотрицательная подвижная палочка *Bact. synxathum*.

Порок смешанного характера. Бродящее молоко выражается в усиленном выделении газов, образующих пену под слоем сливок. Он относится к наиболее распространенным порокам. Возбудителями являются три группы микроорганизмов: кишечные палочки, дрожжи и маслянокислые бактерии.

Одновременно с газообразованием возникают и различные запахи: навозный, спиртовой, дрожжевой, масляной кислоты и др.

13.4. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ МОЛОКА И СЛИВОК, ПОСТУПАЮЩИХ НА ЗАВОД

Поступающие на переработку сырые молоко и сливки исследуют по редуктазной пробе. В сыром молоке также определяют наличие ингибирующих веществ, в молоке и сливках, направляемых на стерилизацию, выявляют количество спор мезофильных аэробных бактерий.

Наличие редуктазы устанавливают реакцией с метиленовым голубым или резазурином. Этим методом косвенно определяют общую бактериальную обсемененность в молоке. Он основан на восстановлении указанных красителей окислительно-восстановительными ферментами - анаэробными дегидразами (по прежней классификации - редуктазами), выделяемыми в молоко микроорганизмами. По продолжительности

обесцвечивания красителей определяют ориентировочное количество бактерий в сыром молоке.

Для проведения анализа в пробирки наливают по 1 см³ рабочего раствора красителя и по 20 (10) см³ исследуемого молока, закрывают пробирки резиновыми пробками и перемешивают содержимое. Пробирки помещают в редуктазник или на водяную баню при 37 °С и ведут наблюдение за изменением окраски.

В зависимости от продолжительности обесцвечивания молоко относят к одному из четырех классов, указанных в табл. 23.

Ингибирующие вещества в молоке определяют с индикаторами резазурином или метиленовым голубым с добавлением в исследуемое молоко культуры термофильного стрептококка.

Метод основан на восстановлении красителей при развитии в молоке чувствительных к ингибирующим веществам микроорганизмов вида *Str. thermophilus*.

23. Результаты пробы на редуктазу

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

* Данные приведены в минутах.

При отсутствии в исследуемом молоке ингибирующих веществ происходит размножение термофильного стрептококка и обесцвечивание красителя, поэтому молоко будет иметь белый цвет.

При наличии ингибирующих веществ в молоке термофильный стрептококк не размножается, индикатор не обесцвечивается и молоко остается окрашенным (сине-фиолетовая или голубая окраска).

Редуктазную пробу и определение ингибирующих веществ проводят один раз в декаду. Исследуют молоко каждого поставщика.

Для производства стерилизованного молока должно направляться сырое молоко высшего и I класса. Кроме этого один раз в 10 дней в этом молоке контролируют содержание спор мезофильных аэробных микроорганизмов. Количество спор этих бактерий не должно превышать 100 клеток в 1 см³.

Для установления количества спор мезофильных аэробных микроорганизмов производят посев предварительно прогретого при 90 °С

в течение 10 мин определенного количества молока или сливок в плотную питательную среду. Посевы культивируют при 30°C в течение 3 сут, после чего подсчитывают все видимые колонии, характерные для спорообразующих бактерий.

Пастеризованное молоко, используемое в производстве стерилизованного молока, должно иметь общую бактериальную обсемененность не более 100 тыс. в 1 см³, а количество спор мезофильных аэробных микроорганизмов не должно превышать 100 клеток в 1 см³.

13.5. ТРЕБОВАНИЯ, ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫЕ К МОЛОКУ ПРИ ПРИЕМКЕ

Молоко, поступающее на предприятие для переработки, должно соответствовать ряду требований, что обеспечит получение из него доброкачественных молочных продуктов.

Молоко должно быть получено от здоровых животных из хозяйств, благополучных в ветеринарно-санитарном отношении. От животных, больных зооантропонозными заболеваниями, молоко можно принимать только с разрешения ветеринарно-санитарного надзора. Такое молоко перерабатывают отдельно согласно специальным инструкциям.

Непригодно для переработки молоко, полученное от животных, подвергшихся лечению антибиотиками, молозиво (полученное в первые 7 дней после отела), а также стародойное молоко, полученное в последние 7 дней перед отелом. Не подлежит приемке молоко, содержащее примесь маститного молока.

Согласно ГОСТу молоко, поступающее на предприятие, должно быть цельным, свежим, чистым, без посторонних привкусов и запахов, не замороженным, плотностью не менее 1,027 г/см³. По внешнему виду и консистенции оно должно представлять собой однородную жидкость от белого до слабо-желтого цвета, без осадков и хлопьев.

В соответствии с требованиями ГОСТа молоко, поступающее на переработку, оценивают по результатам пробы на редуктазу, титруемой кислотности и содержанию механических примесей, а также по содержанию соматических клеток в молоке. По происхождению соматические клетки подразделяются на клетки вымени и клетки крови.

Клетки вымени, или эпителиальные клетки, попадают в молоко из молоковыводящих каналов. Они образуются в вымени в ходе постоянного естественного старения и обновления и являются постоянной составной частью молока. Их размер 5-15 мкм. В молоке здоровых коров эпителиальные клетки составляют 60-70 % общего количества соматических клеток.

Остальные клетки являются лейкоцитами, прежде всего нейтрофильными гранулоцитами, которые могут поглощать инородные

тела и продукты распада и выполняют защитную функцию. Лейкоциты фагоцитируют также и микроорганизмы, в том числе и патогенные.

Воспалительные изменения в вымени всегда сопровождаются увеличением количества лейкоцитов. Повышенное содержание соматических клеток, особенно лейкоцитов, в молоке свидетельствует о том, что молоко получено из больного вымени.

В зависимости от полученных показателей молоко подразделяют на высший, первый и второй сорта (табл. 24).

24. Характеристика заготовляемого молока

Показатель	Высший сорт	Первый сорт	Второй сорт
Кислотность, °Т	16-18	16-18	16-20
Степень чистоты по эталону, не ниже группы	I	I	II
Бактериальная обсемененность, тыс/см ³	До 300	300-500	500-4 000
Содержание соматических клеток, тыс/см ³ , не более	500	1 000	1 000

Молоко, не соответствующее требованиям второго сорта, но с кислотностью не выше 21 °Т, степенью чистоты не ниже II группы и бактериальной обсемененностью не более III класса принимают как несортное.

МИКРОБИОЛОГИЯ ПИТЬЕВОГО МОЛОКА И СЛИВОК

Основными технологическими процессами производства питьевого молока и сливок являются нормализация, пастеризация, гомогенизация, стерилизация молока, розлив и хранение его до реализации. Нормализация и гомогенизация могут способствовать вторичному обсеменению молока и сливок, если они проводятся после пастеризации.

14.1. МЕТОДЫ СНИЖЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ОБСЕМЕНЕННОСТИ МОЛОКА

Поступившее на предприятие молоко подвергается различным технологическим приемам, направленным на уменьшение в нем содержания микроорганизмов. Наиболее часто используют очистку молока, охлаждение, тепловую обработку.

Очистка. Для очистки молока от механических примесей применяют фильтрацию и центрифугирование. Лучшие результаты достигаются при очистке молока центрифугированием на сепараторах-молокоочистителях.

Наибольшая степень очистки достигается при бактофугировании, которое осуществляется на специальных сепараторах-бактериоотделителях, так называемых бактофугах, при частоте вращения барабана 14-16 тыс. об/мин. При этом из молока удаляется до 90 % всех микроорганизмов. Споры бацилл и клостридий в процессе бактериоотделения удаляются из молока легче, чем микроорганизмы в вегетативной форме, что объясняется их более высокой плотностью. Однако имеются микроорганизмы, в том числе и патогенные, плотность которых соответствует плотности молока. В этом случае при бактериоотделении удалить их из молока невозможно.

Для более полного удаления микроорганизмов применяют комбинированную обработку молока, сочетая бактофугирование с пастеризацией. При этом из молока удаляют до 99,9 % бактерий. Комбинированный метод очистки используют при выработке питьевого молока, детских смесей, диетических молочных продуктов, сыров, сгущенного стерилизованного и сухого молока.

Охлаждение. До переработки молоко должно храниться в охлажденном состоянии при температуре до 2-4°C. Целью охлаждения молока является создание условий, значительно замедляющих развитие в нем микроорганизмов. При температуре 2-4°C развитие большинства микроорганизмов в молоке приостанавливается, однако могут размножаться психрофильные бактерии рода *Pseudomonas*, особенно флюоресцирующая палочка и некоторые другие. В связи с этим молоко

может храниться при этой температуре без изменения качества не более двух суток.

Тепловая обработка. Целью тепловой обработки является уничтожение патогенных микроорганизмов, а также инактивация ферментов, снижающих стойкость молока и вызывающих в дальнейшем порок молочных продуктов.

В молочной промышленности используют два основных вида тепловой обработки молока нагреванием: пастеризацию и стерилизацию.

Пастеризация — это тепловая обработка молока при температурах ниже температуры его кипения. Она направлена на уничтожение вегетативных форм бактерий. Основой такой обработки послужили исследования Пастера по термическому обезвреживанию возбудителей порчи вина и пива. Поэтому процесс назван по имени ученого.

В зависимости от режимов пастеризация может быть длительной — при температуре 63-65 °C с выдержкой 30 мин, кратковременной — при температуре 72-76 °C с выдержкой 15-20 с и моментальной — при температуре 85 °C без выдержки. Основным критерием надежности режимов пастеризации служит уничтожение возбудителя туберкулеза, являющегося наиболее устойчивым среди патогенных неспорообразующих бактерий.

Установлено, что разрушение фосфатазы молока происходит после отмирания неспорообразующих патогенных бактерий. Например, при температуре 75 °C возбудитель туберкулеза погибает через 10-12 с, а фосфатаза при этой температуре разрушается только через 23 с. В связи с этим считают, что если реакция на фосфатазу отрицательная, то в пастеризованном молоке погибли все неспорообразующие патогенные бактерии.

Фосфатазная проба используется для определения эффективности как высокой, так и низкой пастеризации. Реакция на фосфатазу позволяет определить добавление к пастеризованному молоку сырого в количестве 2 % и выше.

Фосфатаза разрушается полностью при нагревании до 63 °C в течение не менее 30 мин (даже 20-минутное нагревание при 63 °C не разрушает полностью фермент) или при температуре выше 72 °C с выдержкой 20 с; фосфатаза отщепляет фосфор от фенолфталейнфосфата натрия, который прибавляют к молоку в виде бесцветного щелочного раствора. Фенолфталейн, освобожденный от фосфата, в щелочной среде дает розовое окрашивание, что указывает на наличие фермента, а следовательно, и на недостаточную степень пастеризации молока.

Приготовление рабочего раствора фенолфталейнфосфата. В мерную колбу на 100 см³ отмерить 80 см³ 1 н. раствора аммиака, прилить 20 см³ 1 н. раствора хлористого аммония, размешать и растворить в этой

смеси 0,1 г порошкообразного фенолфталеинфосфата натрия. Раствор хранят в склянке темного цвета, закрытой пробкой в прохладном месте.

Техника определения. В пробирку отмерить 2 см³ исследуемого молока и 1 см³ рабочего раствора фенолфталеинфосфата натрия и тщательно перемешать. Пробирку с содержимым поместить на 1 ч на водяную баню при 40-50 °С. Через 10 мин и через 1 час осмотреть пробирки. Если цвет содержимого пробирки не изменится, то молоко пастеризованное. Если содержимое пробирки окрасится от светло- до ярко-розового цвета, то молоко сырое, или недостаточно пастеризованное, или сырое молоко смешано с пастеризованным.

Эффективность пастеризации зависит от температуры, продолжительности воздействия, степени бактериальной обсемененности молока и качественного состава микрофлоры.

Микрофлору, которая остается в молоке после пастеризации, называют остаточной микрофлорой пастеризованного молока. Характер остаточной микрофлоры зависит в первую очередь от режима пастеризации. Так, микрофлора молока, пастеризованного при 85 °С без выдержки, состоит из термоустойчивых молочнокислых палочек и бактериальных спор. При кратковременной и длительной пастеризации в качестве остаточной микрофлоры преобладают термофильные молочнокислые стрептококки и палочки, энтерококки, микрококки, бактериальные споры, бактериофаги.

Количество оставшихся бактерий при высокой эффективности пастеризации составляет 0,01 % исходного содержания бактерий в молоке, при низкой эффективности пастеризации — 1,5-2 %.

Эффективность пастеризации считают удовлетворительной, если количество остаточной микрофлоры составляет не более 0,1 % и отсутствует *E. coli* в 10 см³ пастеризованного молока.

Молоко после пастеризации и охлаждения поступает к различным агрегатам или емкостям, при этом оно может дополнительно обсеменяться бактериями группы кишечных палочек, психротрофными бактериями, мезофильными молочнокислыми стрептококками, термоустойчивыми палочками, иногда могут попадать дрожжи и уксуснокислые бактерии. Эта микрофлора вместе с остаточной микрофлорой молока после пастеризации составляет микрофлору пастеризованного молока.

Тепловая обработка влияет на физико-химический состав молока. Так, в молоке, подвергнутом длительной пастеризации в течение 30 мин при температуре 65 °С, молекулы казеина укрупняются, вследствие чего казеин становится менее доступным для ферментов микроорганизмов. Этим объясняется тот факт, что молочнокислые бактерии хуже всего развиваются в молоке, подвергнутом длительной пастеризации.

Молоко для заквасок пастеризуют при 92-95 °С с выдержкой 20-30

мин. При таком режиме уничтожаются все вегетативные формы и бактериофаги и в молоке остаются только споры бактерий.

В сыроделии режимы пастеризации выбирают с таким расчетом, чтобы уничтожить патогенные и газообразующие бактерии группы кишечных палочек: температура 72-74 °С с выдержкой 15-20 с.

При производстве питьевого молока наиболее распространенным режимом является пастеризация при температуре 76 °С с выдержкой 20 с. Пастеризованное молоко фасуют в стеклянные бутылки, бумажные пакеты с полимерным покрытием, полиэтиленовые пакеты вместимостью 0,25; 0,5 и 1 л. Пастеризованное молоко хранят при температуре 0-8 °С в течение не более 36 ч с момента окончания технологического процесса.

При сильном обсеменении сырого молока (>10⁶ в 1 см³) эффективность пастеризации снижается, поэтому применяют более жесткий режим пастеризации: температура 75-77 °С и выдержка до 35 с.

Для питьевых сливок режим пастеризации установлен 80-87 °С с выдержкой 15-30 с. Это объясняется тем, что жир оказывает защитное действие на микроорганизмы.

Стерилизация — это тепловая обработка молока, проводимая при температуре выше 100 °С. При этом в продукте уничтожаются все микроорганизмы не только в вегетативной, но и в спорной форме.

В процессе стерилизации более существенно изменяются физико-химические свойства молока. Стерилизованное молоко теряет способность свергиваться под действием сычужного фермента, в нем частично разрушаются витамины, может произойти диспергирование молочного жира, молоко приобретает кремовый цвет. Стерилизованное молоко выдерживает длительное хранение в неохлажденных камерах и длительные перевозки на большие расстояния.

В настоящее время стерилизованное молоко получают в основном двумя способами: однократной стерилизацией в потоке и двухступенчатом способом.

Наиболее современным и распространенным способом производства стерилизованного молока является способ однократной стерилизации в потоке с последующим асептическим розливом, при котором молоко после общих предварительных операций подвергают обработке при 140-150 °С в течение 4-8 с. Молоко охлаждают до 20 °С, а затем асептически разливают в пакеты из бумаги или полиэтилена. Бумага должна храниться при строгом санитарном режиме и иметь не более 10 колониеобразующих микроорганизмов на 100 см² площади. Гарантийный срок хранения стерилизованного молока в пакетах при температуре не выше 20 °С составляет 10 сут. Практически продукт не изменяет органолептических и физико-химических свойств в течение 30 сут.

При двухступенчатом способе стерилизации молоко после общих предварительных операций подвергают тепловой обработке при 140 °С в течение 20 с, охлаждают до 35-40 °С, разливают в бутылки, укупоривают и вторично стерилизуют в башенном стерилизаторе при температуре 116-118 °С в течение 12-16 мин.

Производство стерилизованных сливок осуществляется по схеме выработки молока при двухступенчатом режиме стерилизации. Срок хранения стерилизованных сливок до реализации составляет не более 30 дней при температуре не выше 20 °С.

14.2. ПОРОКИ ПИТЬЕВОГО МОЛОКА

В питьевом молоке при нарушении режимов производства и сроков хранения могут появляться различные пороки, обусловленные составом его микрофлоры. Их условно можно разделить на пороки консистенции, вкуса и пороки смешанного характера.

Пороки консистенции. Свертывание молока без повышения кислотности обусловлено развитием спорообразующих мезофильных гнилостных микроорганизмов группы *Bac. subtilis*, а также термофильных бацилл — *Bac. circulans* и *Bac. coagulans*. Порок может возникать также за счет термостойких ферментов психрофильных бактерий, накапливающихся в сыром молоке в процессе длительного хранения при низких температурах.

Кислотное свертывание молока возникает при негерметичном укупоривании, а также при нарушении режимов тепловой обработки молока. Порок обусловлен развитием термоустойчивых и других молочнокислых бактерий при хранении продукта в обычных условиях.

Пороки вкуса. Горький вкус вызывается пептонами, образующимися при развитии протеолитических микроорганизмов. Горький вкус, возникающий с изменением консистенции (свертывание, пептонизация), обусловлен развитием спорообразующих мезофильных гнилостных микроорганизмов, а также термофилами *Bac. circulans* и *Bac. coagulans*.

Горький вкус без изменения консистенции молока вызывают *Bac. stearothermophilus* и другие термофильные бациллы.

Прогорклый вкус появляется в результате развития маслянокислых бацилл, разлагающих жир и белок молока с образованием масляной кислоты, альдегидов и кетонов.

Порок смешанного характера. Порок имеет название «бродащее молоко». Его вызывают газообразующие анаэробные клостридии, особенно *Cl. perfringens*, отличающийся интенсивностью размножения и обильным газообразованием.

14.3. КОНТРОЛЬ ПРОИЗВОДСТВА ПАСТЕРИЗОВАННЫХ МОЛОКА И СЛИВОК

В питьевом молоке и сливках (готовом продукте) выборочно от одной-двух партий не реже одного раза в 5 дней определяют общее количество бактерий (КОЕ) и наличие бактерий группы кишечных палочек (БГКП). По микробиологическим показателям питьевое молоко и сливки пастеризованные должны соответствовать требованиям Санитарных правил и норм (СанПиН 2.3.2 560-96), представленным в табл. 25.

Кроме определения показателя КОЕ и количества БГКП проводится анализ на патогенные микроорганизмы в порядке государственного санитарного надзора санитарно-эпидемиологическими станциями. Патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, не допускаются в 25 см³ пастеризованного молока и в 50 см³ пастеризованного молока, предназначенного для детских учреждений.

Количество золотистого стафилококка нормируется для пастеризованного молока группы В. Он не должен обнаруживаться в объеме 0,1 см³ продукта.

В пастеризованных сливках группы В в потребительской таре общая бактериальная обсемененность не должна превышать 200 тыс. КОЕ в 1 см³, БГКП не допускаются в 0,01 см³, патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, не должны выявляться в 25 см³.

25. Микробиологические нормативы цельномолочной продукции

Продукт	Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, КОЕ в 1 см ³ , не более (тыс)	Количество продукта (г/см ³), в котором не допускаются		
		БГКП*	Патогенные микроорганизмы	
			Staph. aureus	Сальмонеллы
Молоко пастеризованное: группа А	50	1,0	-	25
группа В	100	0,01	0,1	25
во флажках и цистернах	200	0,01	-	25
Сливки из коровьего молока (пастеризованные) (группа В в потребительской таре)	200	0,01	-	25

* Бактерии группы кишечных палочек.

Эффективность пастеризации молока и сливок контролируют вне зависимости от качества готового продукта не реже одного раза в декаду. Для этого 10 см³ молока, отобранного после секции охлаждения, засевают в 50 см³ среды Кесслер. Бактерии группы кишечных палочек 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.

Если посевом устанавливается, что эффективность пастеризации недостаточна (БГКП обнаруживаются в объеме 10 см^3), пастеризационная установка должна быть остановлена и выявлена причина снижения эффективности пастеризации. После пуска пастеризатора вновь необходимо проверить эффективность пастеризации трижды — до получения устойчивых положительных результатов.

При контроле технологического процесса исследуют пробы молока и сливок до пастеризации один раз в месяц, после пастеризации — один раз в декаду, во время розлива, готовую продукцию в экспедиции — не реже одного раза в пять дней. При этом определяют общее количество бактерий и наличие бактерий группы кишечных палочек. Контроль производства сливок осуществляется аналогичным образом.

При получении неудовлетворительных микробиологических показателей готового продукта проводят дополнительный контроль технологического процесса для выяснения причин загрязнения продукта.

Параллельно с этим контролируют санитарно-гигиеническое состояние оборудования. Особое внимание должно быть уделено качеству и регулярности мойки емкостей для хранения молока и разливно-укупорочных автоматов. Смывы с оборудования и трубопроводов отбирают до начала работы.

14.4. КОНТРОЛЬ ПРОИЗВОДСТВА СТЕРИЛИЗОВАННЫХ МОЛОКА И СЛИВОК

Контроль готовой продукции осуществляют не реже 2-3 раз в неделю. Для контроля стерилизованного в потоке молока отбирают для исследования по одному пакету через каждый час работы с каждого фасовочного автомата, а при контроле продуктов, выработанных двухступенчатым способом, пробы отбирают после второй стерилизации через каждый час по два образца в течение смены.

Отобранные образцы должны соответствовать требованиям промышленной стерильности.

При обнаружении в указанном объеме выборки хотя бы одного нестерильного образца каждую партию продукта контролируют ежедневно до тех пор, пока в течение трех последних суток все образцы, отобранные для контроля, не будут стерильными.

Для определения промышленной стерильности отобранные упаковки со стерилизованным молоком выдерживают при температуре 37°C в течение 3 сут, а со сливками — в течение 5 сут. Образцы молока, выработанного двухступенчатым способом, кроме того, выдерживают при температуре 55°C в течение 5 сут (для выявления спор

термофильных аэробных бактерий).

После термостатной выдержки проводят осмотр образцов продукта. При наличии вздутия упаковки или изменения внешнего вида молока в бутылках (наличия ступка, отстоя сыворотки, наличия хлопьев молока и др.) упаковки считают не отвечающими требованиям промышленной стерильности. Упаковки без внешних дефектов вскрывают, стерилизованное молоко или сливки анализируют органолептически. Продукт отвечает требованиям промышленной стерильности, если не установлено изменений консистенции и вкуса.

В арбитражных случаях или для установления причины порчи стерилизованного молока определяют кислотность, микроскопируют препараты и делают посевы из термостатированных образцов для определения общей бактериальной обсемененности. Продукт отвечает требованиям промышленной стерильности, если кислотность молока увеличилась не более чем на 2°T , в микроскопическом препарате отсутствуют клетки бактерий, а общее количество микроорганизмов в 1 см^3 не превышает 10.

Для контроля технологического процесса при однократной стерилизации молока в потоке исследуют стерилизованное молоко, отобранное асептически из промежуточного резервуара в стерильную колбу вместимостью 3-10 дм³. В указанном объеме стерилизованного молока вегетативные клетки и споры должны отсутствовать. Его контролируют одновременно с контролем готовой продукции (тоже 2-3 раза в неделю) путем определения промышленной стерильности. При двухступенчатом способе стерилизации отбирают пробы стерилизованного молока сразу после розлива его в бутылки (три бутылки в течение смены — в начале, в середине, в конце розлива). Определяют общее количество бактерий и количество спор термофильных микроорганизмов. Общее количество бактерий не должно превышать 1000 клеток в 1 см^3 , а количество спор термофильных микроорганизмов — не более 10 в 1 см^3 .

Одновременно с контролем технологического процесса и готовой продукции проводят контроль санитарно-гигиенических условий производства. Для этого ежедневно берут смывы с узлов и деталей разливно-укупорочных автоматов и с упаковочного материала (при однократной стерилизации). При двухступенчатом способе ежедневно отбирают смывы с оборудования на участке линии от предстерилизатора до разливной машины, с бутылок, корковых прокладок. В пехе стерилизованного молока проводят микробиологическое исследование воздуха один раз в 10 дней.

ЗАКВАСКИ

Заквасками называют чистые культуры или смесь культур микроорганизмов, используемых при изготовлении кисломолочных продуктов, кисломолочного масла и сыров.

Чаще в качестве заквасок применяют молочнокислые и пропионовокислые бактерии, иногда плесневые грибы. В состав естественной симбиотической закваски для кефира кроме молочнокислых бактерий входят также дрожжи и уксуснокислые бактерии.

15.1. ИСТОРИЧЕСКИЕ СВЕДЕНИЯ ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ЗАКВАСОК В МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Первоначально в качестве заквасок использовали сквашенное молоко, пахту из-под сливочного масла и кислые сливки. Такие естественные закваски впервые начали применять в маслodelии (1860 г.). Однако при этом не всегда получали масло высокого качества, так как состав микрофлоры был случайным. Первые опыты по использованию чистых культур молочнокислых бактерий были проведены в Дании Шторхом в 1888 г., для которых основополагающими были исследования Пастера (1857), открывшего молочнокислое брожение и его возбудителя.

В России закваски впервые внедрил в маслodelную промышленность С. А. Северин (1898) — директор Московской бактериолого-агрономической станции. Им же были разработаны способы получения сухих заквасок.

Сначала закваска состояла только из одного вида *Lac. lactis*, поэтому она не обеспечивала полноты вкусового букета, которым обладает высокосортовое кисломолочное масло.

После 1919 г. в состав заквасок начали вводить ароматобразующие стрептококки *Leu. dextranicum* и *Leu. cremoris*. В 1935 г. был выделен ароматобразующий молочнокислый стрептококк - *Lac. diacetylactis*, который сообщал закваске выраженный запах. В настоящее время эти микроорганизмы входят в состав заквасок для масла, кисломолочных продуктов и сыров.

15.2. КЛАССИФИКАЦИЯ ЗАКВАСОК

Закваски, выращиваемые в специальных научно-производственных лабораториях, называют маточными или лабораторными. Они являются основой для получения производственных или потребительских заквасок.

Потребительские закваски подразделяют на материнские, или

первичные; промежуточные, или вторичные, и производственные, или третичные.

Материнские закваски получают при посевах маточных заквасок, промежуточные и производственные — соответственно при посевах материнских и промежуточных заквасок.

Различают одноштабмовые закваски, состоящие из одного штамма микроорганизма, многоштабмовые — из нескольких штаммов одного вида и смешанные закваски, в состав которых входят многие штаммы разных видов микробов.

По составу микрофлоры основные закваски, применяемые в молочной промышленности, подразделяют на 3 группы: бактериальные, грибковые и смешанные (табл. 26).

26. Закваски для молочной промышленности

Закваски	Микроорганизмы	Продукт
Бактериальные Мезофильные молочнокислые стрептококки	<i>Lac. lactis</i> , <i>Leu. cremoris</i> , <i>Lac. cremoris</i> , <i>Lac. diacetylactis</i> , <i>Leu. dextranicum</i>	Творог, сметана, простоявшая и другие кисломолочные продукты, кисломолочное масло, сыры
Термофильные молочнокислые бактерии	<i>Str. thermophilus</i> , <i>Lbm. bulgaricum</i> , <i>Lbm. acidophilum</i> , <i>Lbm. helveticum</i> , <i>Lbm. lactis</i>	Менисковая и кожная простоявшая, рожена, йогурт, варени, ацидофилин, крупные твердые сыры
Бактерии, участвующие в созревании сыра	Пропионовокислые бактерии, <i>Lbm. casei subsp. rhamnosus</i> (казеинкультура), <i>Brevibacterium linens</i> (вырабатывает красную сырь)	Сыры с высокой температурой второго нагревания, мягкие сыры
Грибковые Культура рокфора Культура камамбера	<i>Penicillium roqueforti</i> <i>Pen. camamberti</i> , <i>Pen. candidum</i> , <i>Pen. albus</i>	Сыр рокфор Сыр камамбер
Смешанные бактериально-грибковые	<i>Lac. lactis</i> , <i>Lbm. buchneri</i> , <i>Lbm. brevis</i> , <i>Lbm. bulgaricum</i> , <i>Lbm. acidophilum</i> , дрожжи <i>Saccharomyces lactis</i> и рода <i>Torulopsis</i> , уксуснокислые бактерии	Кефир, кумыс

За рубежом закваски, состоящие из мезофильных молочнокислых стрептококков, делят на 5 групп: так называемые нулевые (0), L, D, LD и ароматические закваски.

Нулевые закваски содержат только *Lac. lactis* и *Lac. cremoris* или штаммы одного из этих видов. Селекция штаммов этих заквасок направлена на активное кислотообразование и минимальное газообразование.

Закваски L состоят из нулевых заквасок, а также *Leu. cremoris*. Наряду с молочной кислотой закваска вырабатывает диацетид, ацетонин, летучие кислоты и CO₂.

В заквасках D кроме представителей нулевой закваски содержится *Lac. diacetylactis*. Эти закваски производят диацетил и ацетон в большом количестве, в них более интенсивно образуется CO₂.

Закваски LD состоят из молочнокислых стрептококков, входящих в состав нулевых заквасок, а также *Leu. cremoris* и *Lac. diacetylactis*. В этих заквасках прослеживается тенденция *Lac. diacetylactis* доминировать над другими микроорганизмами.

Так называемые ароматические закваски состоят из штаммов *Leu. dextranicum*, *Leu. cremoris* и *Lac. diacetylactis*, применяемых для стимулирования ароматобразования в определенных продуктах.

15.3. ВЫДЕЛЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ ЦЕННОСТИ

Для поддержания заквасок в наиболее активном состоянии необходимо постоянно производить замену заквасочных штаммов, что связано с изменением биологических свойств заквасочных микроорганизмов при их длительном культивировании и хранении.

Этим обусловлена необходимость выделения чистых культур молочнокислых бактерий с целью получения производственноценных штаммов заквасочных микроорганизмов.

Выделение чистых культур молочнокислых бактерий включает ряд этапов: выбор источников, отбор образцов, посев на жидкую питательную среду для обогащения молочнокислой микрофлорой, посев на плотную среду для выделения чистой культуры, пересев чистой культуры (колоний) в стерильное молоко, исследование биологических свойств выделенных штаммов в целях их идентификации и определения производственной ценности (схема 3).

Источниками выделения мезофильных молочнокислых бактерий являются сырое молоко, оборудование, самоквасные кисломолочные продукты, а также растения, корни растений, иногда почва, расположенная в зоне корневой системы.

Термофильные молочнокислые стрептококки и болгарскую палочку выделяют из самоквасных кисломолочных продуктов южных регионов; ацидофильную палочку — из содержимого кишечника телят и грудных детей. Термофильную палочку *Lbm. helveticum* выделяют из твердых сыров с высокой температурой второго нагревания (типа швейцарского).

Для выделения мезофильных молочнокислых стрептококков 1 г пробы растирают в стерильной ступке и готовят разведение 1 : 10 на физиологическом растворе. Полученную суспензию засевают в стерильное молоко (10 см³ в объеме 0,25-0,5 см³). Если культуру выделяют из кисломолочных продуктов, то одну каплю продукта вносят бактериологической петлей в стерильное молоко. Посевы термостатируют при 25-30°C до свертывания молока.



Схема 3. Выделение штаммов для заквасок

При выделении ароматобразующих мезофильных стрептококков после посева суспензии образцов в обезжиренное стерильное молоко (питательная среда) добавляют цитрат натрия (1 %) или дрожжевой автолизат (2 %) с глюкозой (1 %).

Процесс выделения чистых культур термофильных бактерий аналогичен процессу выделения мезофильных молочнокислых стрептококков. При этом термофильные молочнокислые стрептококки и палочки культивируют при 40-43 °С, за исключением ацидофильной палочки, которую выращивают при 37 °С.

После проверки ступки на типичность органолептических свойств и микрофлоры полученную обогащенную культуру, выращенную на стерильном молоке, **высевают на плотную питательную среду** (агар с гидролизованным молоком). Посевы термостатируют в течение 48 ч.

Колонии просматривают под малым увеличением микроскопа. Типичными колониями для *Lac. lactis* являются поверхностные округлые и глубинные лодочкообразные колонии. *Lac. cremoris* образует округлые темные колонии с выраженной зернистостью, *Lac. diacetylactis* формирует глубинные колонии неправильной формы в виде кусочков ваты, в микроскопических препаратах, приготовленных из таких колоний, клетки имеют палочковидную форму. Термофильные стрептококки образуют правильной округлой формы темные колонии с

четко выраженной зернистостью. Термофильные молочнокислые палочки образуют, как правило, колонии неправильной формы в виде «паучков» или кусочков ваты.

Типичные для каждой группы микроорганизмов колонии переносят в пробирки с молоком. Из одного образца (из одной чашки Петри) выделяют по 5 колоний, посевы термостатируют до образования сгустка но не более 48 ч.

Выделенные штаммы молочнокислых бактерий характеризуют по микроскопической картине, продолжительности (активности) свертывания молока и органолептическим свойствам.

Штаммы, имеющие неравномерные по размеру клетки, инволюционные формы, загрязненные посторонней микрофлорой, отбраковываются. Сгусток молока должен быть ровным, плотным, с чистыми кисло-молочным вкусом и запахом. Кислотность сгустка через 10 ч должна быть 80-85 °Т, через 24 ч — 100-110 °Т (у активных кислотообразователей).

Энергия кислотообразования для *Lac. lactis* должна составлять 4-6 ч, для *Lac. cremoris* — 5-7 ч, *Lac. diacetylactis* должен свертывать молоко через 16-24 ч, а *Lbm. acidophilum* — через 4-5 ч.

Штаммы термофильных стрептококков и болгарской палочки отбирают средней и высокой активности свертывания. Штаммы *Str. thermophilus* высокой активности молоко свертывают через 3,5-4 час, штаммы средней активности образуют сгусток через 5-7 час. Активные штаммы болгарской палочки свертывают молоко через 3-3,5 час, а штаммы средней активности — через 5-7 час. Термофильный стрептококк и болгарская палочка используются в симбиотической закваске для кисло-молочных продуктов «южного» типа.

Активность свертывания и органолептические свойства выделенных штаммов являются наиболее важными и решающими показателями, определяющими пригодность их для использования в производстве. Кроме того, мезофильные молочнокислые стрептококки оценивают по следующим тестам: резистентность к бактериофагу, рост в лактуловом молоке при температуре 45 °С, образование аммиака из аргинина, образование диацетила, ацетона и углекислого газа (для ароматизирующих стрептококков), способность к подавлению термоустойчивой молочнокислой палочки.

Для использования в производстве отбирают штаммы всех видов мезофильных молочнокислых стрептококков, не дающих роста в лактуловом молоке при 45 °С, резистентные к поливалентному бактериофагу и нелизогенные, подавляющие рост и кислотообразующую способность термоустойчивой молочнокислой палочки.

Штаммы, образующие аммиак из аргинина, не продуцирующие диацетила, ацетона и углекислого газа, относят к *Lac. lactis*.

Штаммы, не образующие аммиака из аргинина, не продуцирующие диацетила, ацетона и углекислого газа, относят к *Lac. cremoris*.

Штаммы, образующие диацетил, ацетонин, углекислый газ и аммиак из аргинина, относят к ароматизирующему виду *Lac. diacetylactis*.

Для использования в производстве отбирают штаммы термофильного стрептококка, не развивающиеся в молоке с пенициллином (0,01 МЕ/см³), развивающиеся в гидролизованном молоке в присутствии не более 2 % NaCl и 0,1 % метиленового голубого.

Из термофильных молочнокислых палочек в производстве используют штаммы, дающие рост в молоке при 45 °С и не растущие при температуре 15°С, имеющие предел кислотообразования 200-250 °Т.

Кроме того, штаммы ацидофильной палочки должны быть устойчивыми не менее чем к 0,4 % фенола, 20 % желчи, рН среды 8,3 и обладать выраженной антибиотической активностью по отношению к гнильной микрофлоре, стафилококку, палочке протей и кишечным палочкам. Штаммы болгарской палочки должны образовывать ацетальдегид.

Исследование выделенных штаммов по вышеперечисленным тестам дает возможность идентифицировать их до вида. Более полная идентификация молочнокислых бактерий по биологическим свойствам проводится по показателям, рассмотренным в главе 9.

Из проверенных и отобранных ценных штаммов молочнокислых бактерий **составляют коллекцию**, которую сохраняют путем пересевов штаммов в стерильное молоко не реже одного раза в месяц. При этом штаммы нередко снижают свою биохимическую активность (пассажная спонтанная изменчивость). Поэтому 1-2 раза в год штаммы проверяют по их активности, чистоте, биохимическим и органолептическим свойствам.

Отобранные производственно-ценные штаммы молочнокислых бактерий можно хранить также в замороженном виде при -18 — (-25)°С в течение 4-6 мес или в высушенном состоянии после сублимационной сушки. В последнем случае запаянные ампулы с сухими культурами выдерживают хранение при низкой положительной (3-5°С) или отрицательной (-18 — (-25°С) температуре в течение нескольких лет (до 10 и более).

15.4. ПРИНЦИПЫ ПОДБОРА КУЛЬТУР В СОСТАВ ЗАКВАСОК

Важным показателем качества закваски является ее пригодность для производства заданного продукта, что должно быть проверено исследованиями в производственных условиях.

При составлении заквасок необходимо учитывать специфические свойства вырабатываемого продукта, температурные режимы производства, взаимоотношения между микроорганизмами, возможность развития бактериофага и др.

В зависимости от назначения в состав заквасок *вводят штаммы, обладающие определенными особенностями*. Так, закваски для производства масла должны иметь свойства кислото- и ароматобразования, незначительную протеолитическую активность. Для масла, предназначенного для непосредственного использования, подходят закваски D и LD, поскольку желательно быстрое и сильное ароматобразование. Для масла, предназначенного для длительного хранения, больше подходят закваски L, поскольку в этом случае необходим постоянный мягкий аромат. Для простокваши и сметаны наиболее пригодными считаются закваски D, так как желательно быстрое ароматобразование. В эти закваски подбирают штаммы, образующие при свертывании молока густки вязкой консистенции без отделения сыворотки.

При составлении закваски для творога вводят штаммы, сообщающие продукту хорошие вкус и запах, образующие густки, легко отделяющие сыворотку.

Для получения кисломолочных продуктов с лечебными свойствами в состав закваски вводят *ацидофильные палочки, образующие антибиотические вещества*. В состав заквасок для сыров вводят молочнокислые бактерии, обладающие относительно высокой протеолитической активностью, придающие специфические вкус и аромат продукту.

При составлении заквасок необходимо учитывать также *температурные режимы* производства молочных продуктов. Если процесс осуществляется при 20-30 °С, то в закваску вводят преимущественно мезофильные микроорганизмы, а при 40-45 °С - термофильные.

Важнейшим критерием годности для объединения отдельных штаммов в многоштабные закваски является *совместимость видов* и штаммов. По возможности должны произойти взаимная стимуляция заквасочных микроорганизмов и антагонистическое действие, т. е. подавление развития посторонней нежелательной микрофлоры.

Антагонистическое действие штаммов может иметь несколько причин: образование антибиотиков, продуктов обмена, оказывающих ингибирующее действие; разная скорость адаптации штаммов к конкретной питательной среде; темп размножения (продолжительность генерации) и др.

На основе использования антагонизма были созданы низиновые и антагонистические закваски. Низиновые закваски составляют штаммы *Lac. lactis*, образующие антибиотик низин, который препятствует прорастанию спор маслянокислых бактерий.

В состав антагонистической закваски входят штаммы *Lbm. plantarum*, которые образуют незначительные количества пероксида

водорода, задерживающего развитие маслянокислых бактерий. В закваску для творога вводят штаммы *Lac. cremoris*, образующие антибиотик диплококцин, ингибирующий развитие кишечных палочек.

Чтобы избежать антагонистического воздействия на заквасочные штаммы, проводят предварительный отбор их комбинаций по основным органолептическим параметрам. Как и в случае с отдельными штаммами, комбинации проверяют на пригодность и постоянство признаков.

Для производства отбирают многоштабные закваски, у которых в результате большого количества пассажей установилось равновесие признаков и штаммов.

Штаммы, вводимые в состав заквасок, проверяют на *чувствительность к бактериофагам*. Для проверок используют широко распространенные бактериофаги, известные своей агрессивностью к многочисленным штаммам. В питательную среду (плотную или жидкую), инфицированную бактериофагом, высевает проверяемый штамм бактерий. При этом, если наступает лизис бактерий, на плотной питательной среде появляются зоны просветления, так называемые негативные колонии, в которых нет роста бактерий. В жидких средах чувствительные к бактериофагу штаммы бактерий не развиваются (нет помутнения) или происходит слабый гликолиз (медленное накопление молочной кислоты), или он отсутствует совсем.

В состав заквасок вводят штаммы, которые не лизируются ни одним штаммом или лизируются немногими штаммами бактериофагов. Для предотвращения развития бактериофага применяют многоштабные закваски. При этом, если в закваске появляется фаг, он лизирует один-два штамма, остальные продолжают развиваться, обеспечивая кисломолочный процесс.

15.5. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ЗАКВАСОК В СПЕЦИАЛЬНЫХ ЛАБОРАТОРИЯХ

В специальных научно-производственных лабораториях выделяют штаммы молочнокислых микроорганизмов, изучают их свойства, селекционируют, составляют и получают закваски, которые направляют на предприятия молочной промышленности, где вырабатывают производственные закваски.

В цехах по производству заквасок готовят сухой и жидкий бактериальные концентраты, маточные закваски в виде сухих и жидких заквасок, а также получают натуральные и сухие кефирные грибки (зерна).

Сухой бактериальный концентрат в нашей стране вырабатывают трех видов: мезофильных молочнокислых стрептококков, термофильных молочнокислых стрептококков и ацидофильных молочнокислых палочек. Жидкий бактериальный концентрат готовят из мезофильных

молочнокислых стрептококков.

Процесс приготовления сухого бактериального концентрата включает следующие основные этапы: выращивание заквасочных микроорганизмов, бактофугирование полученной культуры, высушивание суспензии клеток, фасование бакконцентрата.

Средой для выращивания молочнокислых бактерий является молочная сыворотка с добавлением кукурузного экстракта (или аминокислотно-микроэлементно-витаминового комплекса), буферных солей и стимуляторов роста. В качестве буферных солей используют цитрат натрия или ацетат натрия. Стимуляторами роста молочнокислых бактерий являются сульфат марганца, аскорбиновая кислота и др.

Молочнокислые бактерии различают по потребности в стимуляторах роста, в связи с этим предложены различные питательные среды для выращивания мезофильных, термофильных молочнокислых стрептококков и ацидофильных палочек.

В табл. 27 представлены рецептуры питательных сред (на 1000 дм³) для наращивания клеток молочнокислых бактерий различных видов.

При приготовлении среды в сыворотке устанавливают рН 4,5-4,6 (оптимальную для выделения белков), нагревают ее до 95 °С и выдерживают 60 мин для более полного выделения белков. После этого сыворотку осветляют путем сепарирования.

В осветленную сыворотку добавляют компоненты среды согласно рецептуре, устанавливают оптимальную рН, стерилизуют при 0,05 МПа (112 °С) в течение 60 мин и охлаждают до температуры, оптимальной для роста микроорганизмов.

Стерилизация и охлаждение питательной среды, а также наращивание клеток молочнокислых бактерий осуществляются в ферментере, имеющем мешалку, в котором автоматически регулируются температура и рН на заданном уровне.

В подготовленную стерильную среду, охлажденную до оптимальной температуры развития того или иного вида молочнокислых бактерий, подают закваску в количестве 5-8 % (на сывороточной среде) или 3-5 % (на обезжиренном молоке).

Наращивание клеток мезофильных молочнокислых стрептококков ведут в ферментере при температуре 30 °С в течение 10-12 ч, термофильных молочнокислых стрептококков и ацидофильных палочек - при 40 °С на протяжении 8-9 ч при автоматическом поддержании рН. При этом рН культуральной жидкости достигает для стрептококков 6,5-6,8, для ацидофильных палочек 5,7-6,0.

После окончания выращивания культуры охлаждают до 3-8°С и направляют на бактофугирование для получения бактериальной массы.

Отделение клеток от среды осуществляют в конце логарифмической фазы роста, когда в культуральной жидкости (в 1 см³)

содержатся сотни миллионов - единицы миллиардов активных клеток. Бактериальную массу из культуральной жидкости выделяют на бактофуге. Для этой цели можно использовать центрифугу и молокоочиститель.

27. Рецептуры питательных сред для молочнокислых бактерий

Компонент среды	Единица измерения	Количество для:			Характеристика компонента
		мезофильных стрептококков	термофильных стрептококков	ацидофильных палочек	
Сыворотка	дм ³	250	500	170	Осветленная
Кукурузный экстракт *	кг	10	20	10	Разведенный водой в соотношении 1:6 и стерилизованный при 0,1 МПа 20 мин
Аминокислотно-микроэлементно-витаминовый комплекс	дм ³	5	-	-	-
Марганец сернокислый	г	165	165	165	-
Натрий лимоннокислый трехзамещенный	кг	10	25	-	40%-ный водный раствор, стерилизованный при 0,1 МПа 10-12 мин
Уксуснокислый натрий	кг	-	-	15	То же
Обезжиренное молоко	дм ³	10	10	10	Стерилизованное при 0,1 МПа 5-7 мин
Сахароза	кг	-	25	-	20%-ный водный раствор, стерилизованный при 0,05 МПа 15-20 мин
Аскорбиновая кислота	г	-	10	-	1%-ный водный раствор, стерилизованный при 0,05 МПа 2-3 мин
Апидак	г	-	-2	-	Вольный раствор
Пепсин	г	1,5	-	-	Растворенный в 100 см ³ стерильного физиологического раствора
Гидролизат казеина	дм ³	3,0	-	-	Стерилизованный при 0,05 МПа 30-35 мин
Вода	дм ³	650	100	680	Волопроводная

* - Кукурузный экстракт можно заменить аминокислотно-микроэлементно-витаминовым комплексом.

Бактериальная масса после бактофугирования содержит сотни миллиардов клеток в 1 см³; выход биомассы составляет 0,5-0,8 %. Полученную бактериальную массу смешивают с защитной средой в соотношении 1 : 2 - 1 : 4. В состав защитной среды для мезофильных молочнокислых стрептококков входят: обезжиренное молоко с содержанием 16 % сухих веществ, 30 и 70 % водного раствора, содержащего сахарозу (5%), желатозу (5%), цитрата натрия (5%), глутамата натрия (2%). В состав защитной среды для ацидофильной

палочки вместо цитрата натрия вносят 5 % уксуснокислого натрия. Защитная среда для термофильного стрептококка включает 20 % обезжиренного молока и 80 % водного раствора, содержащего по 2,2 % сахарозы, желатозы, лимоннокислого натрия и 1,2 % глутамата натрия.

Желатоза представляет собой желатин после стерилизации под давлением 0,15 МПа в течение 2,5-3,0 ч. После стерилизации желатин теряет способность образовывать гель.

Полученную суспензию клеток молочнокислых бактерий высушивают. Для этого ее разливают на лотки слоем 6-8 мм или фасуют по 2 см³ во флаконы. Суспензию высушивают в установке для сублимационной сушки сначала при низкой отрицательной температуре - 35(-45)°С, досушивание — при положительной температуре (40-45 °С). Продолжительность сушки суспензии на лотках 6-12 ч, во флаконах 24-42 ч. Сухой бактериальный концентрат, высушенный на лотках, размельчают и фасуют во флаконы порциями по 1-1,5 г.

Концентрат содержит от 150 до 300 млрд клеток в 1 г. Массовая доля влаги в нем не должна превышать 3,5 %. Допускается наличие посторонней непатогенной микрофлоры не более 10 клеток в 1 г.

Продолжительность свертывания молока при внесении одной порции концентрата на 1 л молока при оптимальной температуре составляет: у мезофильных стрептококков 4,0-5,5 ч, у термофильных молочнокислых стрептококков 3,0-4,5, а у ацидофильных палочек 2,5-3,5 ч.

Срок хранения концентрата при температуре 3-10 °С 8 мес со дня выработки.

Жидкий бактериальный концентрат мезофильных молочнокислых стрептококков так же как и сухой, применяется при производстве творога и сметаны. Его готовят так же, как и сухой. Приготовление отличается лишь исключением двух операций: замораживания и сушки. Концентрат разливают во флаконы по 5±0,5 см³ (полпорции) и по 10 ± 0,5 см³ (порция), укупуоряют, охлаждают до температуры +8(-5)°С и хранят не более двух месяцев со дня выработки. Жидкий бактериальный концентрат содержит не менее 150 млрд. клеток в 1 см³. Допускается содержание посторонней непатогенной микрофлоры не более 20 клеток в 1 см³.

Сухие закваски готовят на основе бактериальной массы (из бактериального концентрата) или высушиванием комбинаций культур бактерий в защитной среде. Сухие закваски, приготовленные на основе бактериальной массы, по составу микрофлоры идентичны сухому бактериальному концентрату и отличаются от него лишь по количеству клеток молочнокислых бактерий. Они содержат примерно в 100 раз меньше бактериальных клеток, чем бактериальный концентрат, из-за большего разведения бактериальной массы защитной средой.

Для приготовления сухой закваски из комбинации культур в стерильное обезжиренное молоко вносят комбинированную закваску в количестве 0,5-1 % и выдерживают при оптимальной температуре до образования сгустка.

Выращенную комбинацию культур в количестве 30 % вносят в защитную среду - водный раствор, содержащий сахарозу (10 %), трехзамещенный лимоннокислый натрий (5 %), глутамат натрия (2,5 %) и желатозу (5 %). Смесь перемешивают, фасуют во флаконы по 1 см³ (одна порция), замораживают и высушивают при сублимационной сушке. Режим замораживания и сушки заквасок аналогичен режимам получения сухого бактериального концентрата. Сухую закваску можно хранить не более 8 мес при температуре 3-8 °С. Сухая закваска имеет вид порошка или таблеток. Цвет белый или кремовый.

Продолжительность свертывания молока (при внесении одной порции закваски для творога и сметаны на 2-2,5 л, остальных заквасок на 100 см³ молока) составляет для закваски из бактериальной массы 5-9 ч, для закваски из комбинации культур 16-18 ч.

Количество молочнокислых бактерий в 1 г сухой закваски составляет 10⁷⁻¹⁰. Количество посторонних микроорганизмов допускается 1-2 клетки в 1 г, бактерии группы кишечных палочек не должны обнаруживаться в 1 г закваски.

Жидкие закваски готовят на стерильном обезжиренном или цельном молоке. Молоко стерилизуют в течение 10-15 мин при температуре 121°С, охлаждают до (37±1) °С и для проверки на стерильность термостатируют при этой температуре в течение двух суток. Перед заквашиванием молоко контролируют микроскопированием окрашенного препарата. При просмотре не менее чем в 10 полях зрения микроскопа должны отсутствовать вегетативные клетки и споры.

После этого в молоко вносят комбинацию культур и выдерживают его при оптимальной температуре развития до образования сгустка. Закваску фасуют в стеклянные флаконы по 20, 50 и 100 см³, флаконы укупуоряют и маркируют (этикетуют). Жидкие закваски имеют срок годности: 10 сут. при 3-8 °С и 5 сут при комнатной температуре хранения.

Закваска имеет жидкую консистенцию с небольшой крупкой, реже - сметанообразную. Допускается отделение сыворотки. Вкус и запах закваски кисло-молочные, характерные для соответствующего вида, освежающие, без посторонних привкусов и запахов. Цвет белый с кремовым оттенком по всей массе. Допускается буроватый оттенок. Кислотность 80-100 °Т. При микроскопии мазков из закваски должны отсутствовать инволюционные формы и посторонние микроорганизмы.

При производстве закваски и бактериального концентрата бактериальные клетки *могут паразитовать численность в*

периодическом режиме или в условиях непрерывного (проточного) культивирования.

При периодическом выращивании (в изолированной емкости) действующие на микроорганизмы многочисленные факторы меняются по ходу развития культуры. Вначале микроорганизмы размножаются в условиях избытка питательных веществ. Одновременно с этим в среде накапливаются продукты обмена. Они тормозят деятельность ферментов, участвующих в синтезе компонентов клеток. В соответствии с происходящими в среде изменениями культура сама претерпевает ряд закономерных морфо-биохимических изменений. Так, например, клетки, образовавшиеся в начале культивирования, отличаются от клеток, выросших позднее. Это ведет к гетерогенности культуры.

Наращивание клеток в условиях непрерывного культивирования предусматривает постоянный приток питательной среды и одновременное удаление продуктов жизнедеятельности. В результате этого микроорганизмы приобретают способность к продуктивному незатухающему во времени росту, что дает возможность получить закваску и бактериальный концентрат более активные, а также увеличить выход продукции с существующего оборудования.

Кефирные грибки (зерна) представляют естественную симбиотическую закваску для кефира. В них входят молочнокислые стрептококки, палочки, дрожжи и уксуснокислые бактерии (рис. 46).

Процесс получения *натуральных кефирных грибков* включает подготовку молока, культивирование кефирных грибков, отделение, фасование, укупоривание, маркирование и хранение. Для культивирования кефирных грибков используют обезжиренное молоко, пастеризованное при температуре 92-95 °С в течение 20-30 мин, в которое помещают грибки в соотношении 1:20. Выращивание проводят при температуре 18-22 °С. Ежедневно молоко меняют, т. е. грибки заливают свежими порциями питательной среды. Молоко, в котором культивировались кефирные грибки, представляет собой уже культуральную кефирную закваску, содержащую ту же микрофлору, что и кефирный грибок.

По мере роста грибков 1-2 раза в неделю их отделяют от закваски, фасуют порциями в стерильные флаконы, заливают обезжиренным молоком или сывороткой. Срок хранения кефирных грибков составляет 10 дней при температуре 8-10 °С.

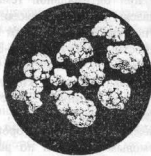
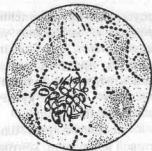


Рис. 46. Кефирные грибки (зерна)

Рис. 47. Микроскопическая картина грибковой кефирной закваски



Сухие кефирные грибки получают из натуральных (живых) кефирных грибков путем высушивания в защитной среде, состоящей из молочной сыворотки с добавлением 0,5 % сахара и 0,01 % аскорбиновой кислоты.

Отделенные от культуральной закваски грибки помещают в защитную среду в соотношении 1:20 и выдерживают в ней 5-6 ч при температуре 20-22 °С для наращивания дрожжей, которые являются наиболее чувствительными к замораживанию и высушиванию. После этого грибки отделяют от защитной среды, укладывают на стерильные лотки слоем 8 мм, закрывают стерильной марлей и помещают в морозильный шкаф при температуре — 20-25 °С на 1,5-2 ч. Грибки сушат в установке сублимационной сушки. Температура в начале сушки 15-20 °С, конечная температура досушивания 30-35 °С. Продолжительность сушки 8-10 ч.

Сухие кефирные грибки фасуют порциями по 10, 20, 50, 100 г в пакеты из полиэтилен-целлофана и запаивают. Срок хранения кефирных грибков 3 мес при температуре не выше 8 °С. Сухие кефирные грибки содержат не более 4,5 % влаги.

Продолжительность сквашивания молока при соотношении грибка и молока 1 : 40 и температуре 18-22 °С для натуральных грибков составляет 16-18 ч, для сухих — 24-28 ч. Кислотность сгустка 90-110 °Т. В микроскопическом препарате наблюдаются диплококки, короткие цепочки, единичные палочки и клетки дрожжей (рис. 47).

15.6. ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ ЗАКВАСОК В ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ

На молокоперерабатывающие предприятия должны поступать высококачественные закваски или их концентраты, проверенные учреждением, которое их разрабатывает и производит. Задача молокоперерабатывающего предприятия состоит в том, чтобы сохранить их полную эффективность.

Производственные закваски на предприятии получают в отделениях чистых культур или в специальном боксе при микробиологической лаборатории предприятия. Приготовление производственной закваски из чистых культур и кефирной закваски (грибковой и производственной) проводят в отдельных изолированных помещениях заквасочного отделения. На небольших предприятиях допускается приготовление заквасок чистых культурах и кефирной в одном помещении. В помещениях необходимо поддерживать чистоту. Не

допускается одновременно проводить посевы по контролю готовой продукции, контролю условий производства и готовить закваски. Термостаты и холодильники, предназначенные для приготовления и хранения производственных заквасок и активизации бактериальных концентратов, не должны использоваться для других целей. Воздух в отделении чистых культур или боксе дезинфицируют с помощью бактерицидных ламп.

Не допускается одновременно проводить посевы по контролю готовой продукции, контролю условий производства и готовить закваски. Термостаты и холодильники, предназначенные для приготовления и хранения производственных заквасок и активизации бактериальных концентратов, не должны использоваться для других целей. Воздух в отделении чистых культур или боксе дезинфицируют с помощью бактерицидных ламп.

Закваски и бактериальные концентраты нужно использовать вскоре после получения из специальных цехов или лабораторий. До употребления их хранят в холодильнике при температуре не выше 8 °С. Нельзя применять закваски и бактериальные концентраты с истекшим сроком хранения. Флаконы с заквасками вскрывают непосредственно перед употреблением и используют все содержимое флакона сразу.

Поступающие на предприятие закваски ослаблены в результате транспортирования и воздействия температуры, поэтому их необходимо восстановить с помощью предварительного культивирования. Критерием оценки восстановления закваски является определение сквашивающей активности. Их выращивают на стерилизованном молоке, допускается использование пастеризованного молока (92-95 °С 20-30 мин).

Эффективная закваска должна проявлять наибольшую активность не позднее чем после второй пересадки. При этом культивирование заквасок необходимо остановить в конце логарифмической фазы, что достигается у большинства заквасок при pH 5,5-5,3 или кислотности 78-80 °Т.

Приготовление производственной закваски из чистых культур на стерильном молоке проводят в молочных бутылках, колбах, в специальных ушатах или бидонах с крышками вместимостью от 3 до 20 л.

Посуду и инвентарь, используемые для приготовления заквасок, моют и дезинфицируют в отдельном помещении заквасочного отделения. Для дезинфекции используют растворы препаратов хлора, содержащие 150-200 мг/л активного хлора. Мелкий инвентарь и посуду стерилизуют в автоклаве или сушильном шкафу.

Режимы приготовления производственных заквасок зависят от вида закваски и конкретных условий производства.

Из жидкой и сухой заквасок или отдельных штаммов на

предприятиях готовят материнскую (первичную) закваску, которую используют для получения вторичной или производственной закваски. Материнскую закваску можно применять также для заквашивания молока или сливок, т.е. в качестве производственной закваски.

Для приготовления материнской закваски используют только стерилизованное молоко, для производственной закваски используют стерилизованное и пастеризованное молоко. Активизацию бактериального концентрата проводят на стерилизованном молоке, допускают использование пастеризованного молока.

Режимы приготовления основных групп заквасок представлены в табл. 28.

Для получения материнской закваски *мезофильных молочнокислых стрептококков* одну порцию сухой закваски вносят в 2 л стерилизованного молока и термостатируют при 26 °С в течение 12-16 ч. Для приготовления вторичной (промежуточной) закваски в стерилизованное молоко вносят 0,5-1 % материнской закваски и культивируют посевы 10-12 ч. Если в закваске преобладает *Lac. cremoris*, то период сквашивания продлевают до 12-14 ч, или увеличивают количество посевного материала до 2-3 %. Производственную закваску мезофильных стрептококков получают посевом в пастеризованное молоко 0,5-1 % или 2-3 % вторичной производственной закваски и выращиванием посевов также в течение 10-12 ч, или 12-14 ч.

Материнскую закваску *термофильного стрептококка* и болгарской палочки получают внесением одной порции сухой закваски в 100 см³ стерилизованного молока. Посевы культивируют при 43 °С в течение 5-7 ч. Для приготовления производственной закваски посевной материал вносят в молоко в количестве 1 % и сквашивают его в течение 3 ч. Таким же образом готовят закваски ацидофильной палочки. Однако культивирование проводят при температуре 38 °С в течение 5-5,5 ч.

Для *повышения лечебных свойств кумыса* из коровьего молока подбирают специальные закваски из дрожжей, сбраживающих лактозу, *Lbm. bulgaricum* (типичной микрофлоры кумыса из кобыльего молока) и штаммов *Lbm. acidophilum*, антибиотически активных против микобактерий туберкулеза и нежелательной кишечной микрофлоры.

Для приготовления материнской кумысной закваски в 300 см³ подготовленного молока вносят по 1 порции сухих заквасок болгарской и ацидофильной палочек и смыв с 2-х пробирок *Sach. Lactis*, выращенных на скошенном агаре Сабуро. Посевы культивируют при 30 °С 7-10 ч. Вторичную закваску готовят внесением в подготовленную молоко 10-20 % маточной закваски. Посевы выращивают также при 30 °С 7-10 ч.

Производственную закваску получают посевом в подготовленное молоко, 20 % (5-7 % для закваски кумыса нежирного) вторичной закваски. Посевы термостатируют при 30°С 4-6 ч, закваску для кумыса

нежирного культивируют 14-15 ч.

28. Режимы приготовления основных групп заквасок

Продукт	Микрофлора закваски	Температура сываивания	Закваски					
			материнская		вторичная		производственная	
			Соотношение количества сухой закваски и молока, порция на 1 л	Продолжительность сквашивания, ч	Количество, %	Продолжительность сквашивания, ч	Количество, %	Продолжительность сквашивания, ч
Творог, сметана, простокваша и др.	Мезофильные стрептококки (преобладает <i>Lac. lactis</i>)	26	1/2	12-16	0,5-1	10-12	0,5-1	10-12
То же	То же (преобладает <i>Lac. streptoc.</i>)	24	1/2	14-18	0,5-1; 2-3	12-14; 10-12	0,5-1; 2-3	12-14; 10-12
Йогурт, простокваша мезофильная, напиток «Южный», «Снежок» и др.	Термофильный стрептококк и болгарская палочка (сибиротическая)	43	10,1	5-7	1	3	1	3
То же, варенец, ряженка	То же (раздельно), термофильный стрептококк (с добавлением или без добавления болгарской палочки)	40	10,1	12-18	0,5-1; 2-3	5-5,5; 3,5-4,5	0,5-1; 2-3	5-5,5; 3,5-4,5
Ацидофильное молоко, ацидофильная паста, напиток «Московский», ацидофильная смесь «Малютка»	Ацидофильная палочка	38	10,1	12-14	0,5-1; 2-3	5-5,5; 4,0-4,5	0,5-1; 2-3	5-5,5; 4,0-4,5
Кумыс жирный, кумыс нежирный	Болгарская и ацидофильная палочки; дрожжи, сбраживающие пастозу	30	2/0,3*	7-10**	10-20	7-10**	20	4-6***
		30	2-х пробирок	7-10**	10-20	7-10**	5-7	14-15

* Дополнительная выдержка при температуре 16-18 °С в течение 3-6 ч, для накопления дрожжей.

** Дополнительная выдержка при температуре 16-18 °С в течение 8-24 ч для накопления дрожжей.

После каждого культивирования производится дополнительная выдержка заквасок при 16-18°C 3-6 ч (при получении производственной закваски 8-24 ч) для накопления дрожжей.

Бактериальный концентрат используют для приготовления производственной закваски или непосредственно продукта после его

активизации или без активизации (культуры прямого заквашивания).

Для активизации сухой бактериальный концентрат (как сухую закваску) растворяют во флаконе, добавляя в него 6-7 см³ стерилизованного молока или физиологического раствора, полученную смесь переносят в подготовленное молоко. Жидкий бактериальный концентрат перед вскрытием флакона выдерживают при комнатной температуре в течение 20-25 мин. Содержимое флакона переносят в подготовленное молоко из расчета одна порция концентрата на 6-8 л молока. Режимы активизации бактериального концентрата и использование его для приготовления продукта представлены в табл. 29.

Бактериальный концентрат мезофильных молочнокислых стрептококков используют для приготовления творога и сметаны. Бакконцентрат термофильных молочнокислых стрептококков предназначен для приготовления варенца, ряженки и других кисломолочных продуктов подобного типа.

Бактериальный концентрат ацидофильных палочек применяют для приготовления ацидофильного молока, пасты, детских кисломолочных продуктов, напитка «Московский».

29. Режимы активизации бактериального концентрата и использование его для приготовления продукта

Продукт	Микрофлора	Вид бактериального концентрата	Температура, °С	Продолжительность термостабилизации, ч	Кислотность, °Т	Соотношение одной порции активированного бактериального концентрата и молока (сливок), порция на 1 л *
Творог, сметана	Мезофильные стрептококки	Сухой жидкий	30 30	4,0-5 4,0-5	43-45 42-48	1/2000 1/3000
Ряженка, варенец	Термофильные стрептококки	Сухой	40	3,5-4	38-42	1/500
Ацидофильное молоко, ацидофильная паста, напиток «Московский», детские молочные продукты	Ацидофильные палочки	Сухой	38	3,5-4	40-45	1/500

* Одну порцию бактериального концентрата вносят в 6-8 л молока; одна порция активированного бактериального концентрата составляет 6-8 л.

Активизированный бактериальный концентрат, используемый в качестве производственной закваски, вносят в пастеризованное молоко в соотношении одна порция концентрата (6-8 л) на 2-3 тыс. л молока (мезофильные стрептококки) или одна порция на 500 л (для термофильных бактерий).

В производстве целесообразно использовать свежеприготовленную закваску, так как она обладает наибольшей активностью. В случае необходимости закваску охлаждают до 3-10°C и направляют на хранение. Продолжительность хранения материнской и производственной закваски на стерилизованном молоке до 72 ч, на пастеризованном - 24 ч.

В процессе приготовления продукта производственную закваску на стерилизованном молоке вносят в молоко или сливки в количестве 1-3 %, а закваску на пастеризованном молоке — 3-5 %.

Для приготовления производственной кефирной закваски восстанавливают сухие кефирные грибки, из которых в дальнейшем готовят грибковую закваску, а из нее получают культуральную производственную кефирную закваску.

Восстановление активности кефирных грибков и их культивирование осуществляют на пастеризованном обезжиренном молоке. Не допускается использование стерилизованного молока, так как при этом нарушается оптимальное соотношение между группами микроорганизмов и возникает пороки.

Для приготовления производственной кефирной закваски используют пастеризованное цельное или обезжиренное молоко. Сухие кефирные грибки помещают в обезжиренное пастеризованное молоко в соотношении 1 : 40 - 1 : 50 и выдерживают при температуре 19-21 °С до образования сгустка в течение 20-24 ч. Молоко пастеризуют при температуре 92-95 °С 20-30 мин.

В процессе сквашивания закваску перемешивают 1-2 раза. После появления сгустка кефирные грибки отделяют, помещают их в свежее пастеризованное и охлажденное молоко из расчета 1 часть кефирных грибков на 30-50 частей молока. Для полного восстановления активности микрофлоры сухих кефирных грибков достаточно 2-3 пересадок, при этом масса грибков увеличивается в 5 раз.

Для получения кефирной закваски восстановленные грибки помещают в пастеризованное и охлажденное до 19 и 21 °С обезжиренное молоко из расчета 1 часть грибков на 30-50 частей молока. Можно использовать любые соотношения в указанных пределах, при этом следует учитывать, что снижение количества грибков способствует увеличению в закваске дрожжей и ароматообразующих бактерий. Через 15-18 ч закваску тщательно перемешивают, спустя 5-7 ч ее снова перемешивают и процеживают через металлическое сито. Грибки, оставшиеся на сите, снова помещают в свежее пастеризованное и

охлажденное молоко, а полученную культуральную закваску применяют для приготовления кефира либо производственной кефирной закваски.

Молоко при культивировании кефирных грибков меняют ежедневно приблизительно в одно и то же время. По мере роста грибки 1-2 раза в неделю отделяют с таким расчетом, чтобы соотношение между количеством грибков и молока оставалось постоянным 1 : 30 - 1 : 50. Промывать грибки водой или молоком не рекомендуется, так как это приводит к вымыванию значительной части полезной микрофлоры грибков.

Для получения производственной кефирной закваски в пастеризованное, охлажденное до 22 °С молоко вносят 1-3 % культуральной закваски и сквашивают его 10-12 ч. Для улучшения вкуса и запаха закваску выдерживают дополнительно в течение 5-6 ч при температуре сквашивания.

Кефирную закваску (производственную или грибковую) используют сразу же после ее приготовления без охлаждения. При необходимости закваску хранят при температуре 3-10 °С не более 24 ч. Для приготовления кефира в молоко вносят 3-5 % производственной кефирной закваски или 1-3 % грибковой закваски.

15.7. ТРЕБОВАНИЯ К МОЛОКУ, ИСПОЛЗУЕМОМУ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ЗАКВАСОК

Условия культивирования микроорганизмов при получении заквасок должны быть по возможности стандартизованы в отношении питательной среды, количества инокулята (0,5-1,5 %), продолжительности (10-18 ч) и температуры выращивания (19-30 °С).

Стандартные условия позволяют остановить размножение заквасочных микроорганизмов в конце логарифмической фазы, что препятствует пережквашиванию и ослаблению активности закваски.

Для приготовления заквасок с этой целью предпочтительнее использовать стерилизованное молоко, полученное из сухого молока, пригодного для закваски и не содержащего ингибиторов.

Закваски готовят также на свежем цельном или обезжиренном молоке, полученном от здоровых коров какой-либо одной молочнотоварной фермы, расположенной недалеко от лаборатории и благополучной по инфекционным болезням.

Для приготовления закваски можно использовать молоко, имеющее чистый вкус, относящееся к 1-й группе по чистоте, к 1-му классу по пробе на редуктазу, кислотностью не выше 16-18 °Т, плотностью не ниже 1,027 г/см³. Качество сырого молока, отбираемого для производства заквасок, контролируют один раз в декаду.

Основными способами тепловой обработки молока для приготовления заквасок являются стерилизация и пастеризация.

Стерилизацию молока проводят при температуре 121°C. Продолжительность выдержки молока при указанной температуре устанавливают в зависимости от емкости, в которой стерилизуют молоко: для бутылок и колб по 0,5-1 л 5-10 мин; для бидонов и ушатов по 3-5 л 10-15 мин; для бидонов по 10 л 15-20 мин; для бидонов и ушатов по 20 л 20-30 мин.

Стерилизацию молока для материнской закваски проводят в автоклавах, которые устанавливают в отдельном помещении. После стерилизации молоко охлаждают до температуры заквашивания и в него сразу же вносят закваску или бактериальный концентрат. Стерилизованное молоко, приготовленное в бутылках и колбах с ватными пробками, допускается хранить при комнатной температуре в течение 3-5 сут. При этом проводят контроль молока на стерильность путем термостатирования при температуре 37 °С в течение 3 сут. Для контроля берут 1-2 бутылки или колбы от каждой партии молока. Отсутствие клеток в микроскопическом препарате, приготовленном из молока после термостатирования, указывает на его стерильность. Стерилизованное молоко в ушатах или бидонах хранить не допускается.

Качество пастеризованного молока проверяют по эффективности пастеризации. Для этого асептически отбирают 10-20 см³ пастеризованного молока и термостатируют при 40-45 °С в течение 24-48 ч, отмечают характер сгустка и просматривают его микроскопический препарат.

15.8. ПЕРСПЕКТИВНЫЕ СПОСОБЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ ЗАКВАСОК

Наиболее перспективной формой заквасок являются концентраты. В принципе все закваски можно производить в виде концентратов, способ получения и применения их сходны между собой. Их используют в производстве сыра, масла, кисломолочных продуктов, исключая приготовление материнских и промежуточных культур, а в некоторых случаях и производственных заквасок.

Использование концентратов имеет следующие преимущества:

- исключение процесса приготовления производственных заквасок, который отличается высокой трудоемкостью и риском потери активности заквасок;
- обеспечение заданного равновесия между штаммами; быстрое изменение комбинаций штаммов с эффективной их сменой для предотвращения потерь от бактериофагов;
- улучшение аромата с помощью концентратов специальных ароматобразующих культур;
- увеличение сроков хранения сырого молока добавлением концентратов закваски для подавления психротрофной

- микрофлоры. Для получения концентратов заквасок пригодны питательные среды на основе обезжиренного молока и молочной сыворотки. Они дешевле по сравнению с полусинтетическими средами и способствуют выработке стабильного равновесия между штаммами.

15.9. НАУЧНАЯ РАЗРАБОТКА ЗАКВАСОК И СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ИХ КАЧЕСТВА

В природных условиях очень редко встречаются штаммы молочнокислых бактерий, обладающие хорошо выраженными производственноценными свойствами (высокой активностью свертывания молока, способностью образовывать диацетил и др.). Интенсифицировать сквашивание молока и улучшить качество молочных продуктов можно при использовании молочнокислых бактерий с повышенной биохимической активностью.

В связи с этим в научно-исследовательских лабораториях биохимически активные штаммы полезных микроорганизмов получают в виде мутантов, т. е. клеток микроорганизмов, приобретающих под действием различных мутагенных факторов измененные свойства, передающиеся по наследству. Производственноценные штаммы молочнокислых бактерий получают также их адаптацией (приспособлением) к определенным условиям.

Популяция культуры состоит из большого количества клеток, различающихся по биохимической активности. Эти особенности микроорганизмов обуславливают их изменчивость и позволяют получить разнокачественные особи с необходимыми свойствами.

Процесс получения производственных мутантов состоит из двух основных этапов: воздействия на клетки микроорганизмов сильнейдействующего мутагенного фактора и последующего отбора высокоактивных вариантов.

В ответ на мутагенное воздействие часть клеток в культуре (популяция) погибает, другие изменяют свои морфологические, культуральные и биохимические свойства, что обусловлено необратимыми изменениями в структуре ДНК клеток.

Различная степень изменчивости микроорганизмов под действием мутагенных факторов ведет к появлению в популяции клеток, различающихся по биохимической активности. Из таких клеток по общепринятой методике выделяют чистые культуры молочнокислых бактерий, изучают биологические свойства и отбирают штаммы, обладающие наиболее выраженными полезными свойствами. В качестве мутагенных факторов применяют физические и химические воздействия.

Из физических факторов наиболее часто используют ультрафиолетовые лучи с длиной волны 2650 нм, которые обладают

хорошим мутагенным действием, так как лучи этой длины избирательно поглощаются молекулами ДНК.

При радиационной селекции используют преимущественно гамма-лучи, а также быстрые нейтроны, дающие лучший мутагенный эффект. Однако их использование ввиду небезопасной работы с ними ограничено.

Химические мутагены дают значительно больше полезных мутаций, чем физические, являясь в то же время менее детальными. В качестве химических мутагенов используют нитрозосоединения, формальдегид, уретан, этиленмин, оксид этилена, диэтилсульфит, диметилсульфит, саркализин и др.

Применяют также сочетание физических и химических факторов. В таких случаях для получения мутантов молочнокислых бактерий чаще используют нитрозосоединения, этиленмин и ультрафиолетовые лучи, гамма-лучи, рентгеновские лучи, быстрые нейтроны.

Метод селекции молочнокислых бактерий воздействием мутагенных факторов является высокоэффективным и доступным для практического использования.

В процессе адаптации микроорганизмов к новым условиям существования они приобретают свойства, не являющиеся наследственно закрепленными. Такие свойства постепенно исчезают, если исчезает фактор, обусловивший их появление. Селекция микроорганизмов адаптации состоит из двух основных этапов: повышения резистентности культуры и отбора улучшенных вариантов.

Путем адаптации можно повысить устойчивость молочнокислых бактерий к антибиотикам, химическим препаратам, поваренной соли и др. Получены культуры молочнокислых бактерий, резистентные к антибиотикам - низину, пенициллину и стрептомицину. Установлена возможность повышения резистентности культур *L. bulgaricum* и *L. acidophilum* к желчи. Доказана приспособляемость молочнокислых бактерий к повышенной или пониженной температуре развития и высушиванию. Улучшенные формы молочнокислых бактерий, полученные путем адаптации, применяют в производстве кисломолочных продуктов и лечебно-профилактических препаратов.

15.10. ПОРОКИ ЗАКВАСОК

В производственных заквасках наиболее часто могут возникать следующие пороки: снижение активности закваски или несквашивание молока, наличие бактерий группы кишечных палочек, излишняя кислотность, вспучивание, осветление, тягучесть и др.

Снижение активности закваски является наиболее распространенным пороком заквасок, выражающимся чаще в несквашивании молока. Причинами возникновения порока являются

наличие антибиотиков и других ингибиторов в молоке, заражение закваски бактериофагом, низкое содержание сухих веществ в молоке, сезонные изменения качества молока (чаще весной), антагонистические взаимоотношения между микроорганизмами заквасок и др.

Антибиотики в молоке чаще попадают после лечения коров, больных маститами. Режимы пастеризации не вызывают полного разрушения этих препаратов в молоке, поэтому даже очень малые количества антибиотиков отрицательно влияют на рост и активность молочнокислых бактерий и других микроорганизмов заквасок. Причиной снижения активности заквасок может быть загрязнение молока моюще-дезинфицирующими веществами и другими ингибиторами.

При сильном снижении активности закваски, не вызываемом ингибиторами или неправильным культивированием, предполагают наличие бактериофагов, которые попадают в закваску из внешней среды или с заквасочными микроорганизмами в виде лизогенной культуры.

Для борьбы с распространением бактериофага рекомендуются частая смена закваски, введение в ее состав фагорезистентных штаммов, их чередование в закваске, проведение дезинфекции помещения и оборудования, а также поддержание асептического режима выращивания заквасок, применение питательных сред, тормозящих деятельность фагов, и др. В качестве фагорезистентной среды для закваски используют молоко, из которого удален кальций. Последние связывают, добавляя в молоко фосфаты. При отсутствии кальция клетки бактерий и частицы фага, имея одноименный отрицательный заряд, взаимно отталкиваются и фаг не может проникнуть внутрь бактериальной клетки.

Несквашивание молока с пониженным содержанием сухих веществ, а также весеннее несквашивание объясняются пониженной пищевой ценностью молока, а также возможным увеличением в весенний период примеси маститного молока.

Снижение активности закваски может обуславливаться развитием некоторых видов молочнокислых стрептококков, образующих антибиотические вещества, задерживающие рост других заквасочных микроорганизмов.

Наличие бактерий группы кишечных палочек является следствием нарушения установленного режима пастеризации молока, несоблюдения общего санитарного состояния оборудования и личной гигиены.

Допустимые количества бактерий группы кишечных палочек представлены в табл. 28

Излишняя кислотность возникает при развитии термоустойчивых молочнокислых палочек, что обусловлено несоблюдением режима пастеризации молока, неудовлетворительной мойкой и дезинфекцией оборудования, несоблюдением температурных и

других технологических режимов.

Вспучивание появляется в основном при развитии спорообразующей микрофлоры, оно обусловлено снижением активности закваски. Для устранения и предупреждения порока необходимо применение активной закваски или смена закваски.

Ослизнение, вязкость появляются при развитии слизеобразующих штаммов сливочных стрептококков или ацидофильных палочек. Для предупреждения порока необходимо сменить закваску.

15.11. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ЗАКВАСОК

Молоко, используемое для приготовления заквасок, должно соответствовать требованиям первого класса по редуктазной пробе, которую производят 2-3 раза в неделю.

Эффективность пастеризации молока для производства заквасок контролируют 1 раз в 10 дней на наличие бактерий группы кишечных палочек. Для этого 10 см³ пастеризованного молока высевают в 40 см³ среды Кесслер и культивируют при 37 °С в течение 24 ч. БГКП не должны выявляться в 10 см³ пастеризованного молока.

Эффективность пастеризации молока проверяют также в том случае, если в стрептококковых заквасках обнаружены палочки.

Для этого асептически отбирают 10 см³ пастеризованного молока и помещают его в стерильную пробирку или колбу. Пробу выдерживают 24-48 ч при 40-45 °С, после чего отмечают характер полученного сгустка и просматривают его микроскопический препарат.

Если пастеризация была проведена при температуре ниже 90 °С, сгусток получается плотным и под микроскопом обнаруживают большое количество стрептококков; при пастеризации 92-95 °С и недостаточной выдержке или без эффективного перемешивания, сгусток в пробирках может быть слабым, микроскопированием выявляют в препаратах зернистые и незернистые палочки.

При правильно проведенной пастеризации (температура 92-95 °С с выдержкой 20-30 мин) в молоке наблюдается пептонизация (отделение сыворотки и наличие зоны просветления в верхнем слое), а при микроскопировании выявляются споровые палочки.

Качество маточной и производственной заквасок на стерилизованном молоке контролируют по активности (предельной кислотности и продолжительности свертывания молока). В случае ее снижения проверяют количество технологической заквасочной микрофлоры и чистоту закваски путем просмотра окрашенного микроскопического препарата не менее чем в 10 полях зрения микроскопа.

Качество производственной закваски на пастеризованном молоке проверяют ежедневно, определяя активность, наличие посторонней

микрофлоры путем просмотра микроскопического препарата, содержания БГКП, органолептические свойства сгустка, наличие ацетона, диацетила, углекислоты и выясняют причины нарушения процесса сквашивания, если таковые имеются.

Контроль кефирных грибковой и культуральной заквасок проводят по кислотности, содержанию БГКП и микроскопическому препарату. При возникновении пороков кефирной закваски проводят дополнительное исследование состава микрофлоры. В кефирных заквасках БГКП должны отсутствовать в 3 см³. Соотношение различных микроорганизмов, входящих в состав кефирных грибковой и культуральной заквасок, примерно одинаковое и составляет в 1 см³: мезофильных молочнокислых стрептококков 10⁸-10⁷; термодульных молочнокислых стрептококков 10⁵-10⁶; ароматобразующих молочнокислых бактерий 10⁷-10⁸; дрожжей 10⁴-10⁵; уксуснокислых бактерий 10³-10⁴.

Активность закваски контролируют по кислотности и продолжительности сквашивания. Производственные закваски для творога, сметаны и обыкновенной простоквашки должны иметь кислотность 80-85 °Т; для масла и сыров с низкой температурой второго нагревания — 90-100 °Т. Кислотность заквасок молочнокислых палочек (сырной, ацидофильной и болгарской) не должна превышать 95-110 °Т, кефирной — 95-100, закваски для кумыса — 130-160 °Т.

Продолжительность сквашивания при внесении материнской закваски молочнокислых стрептококков (1-3 %) составляет 6-8 ч, молочнокислых палочек (0,5-1 %) — 4-6 ч.

Чистоту закваски, а также соотношение между компонентами закваски (например, между молочнокислыми стрептококками и палочками) проверяют ежедневно непосредственным микроскопированием препаратов. Микроскопическая картина заквасок представлена на рис. 48.

Микроскопические препараты заквасок просматривают в 10 полях зрения. При этом в заквасках, состоящих из молочнокислых стрептококков (для сметаны, творога, простоквашки обыкновенной, масла, сыров с низкой температурой второго нагревания), должны обнаруживаться только цепочки кокков и диплококки, равномерно расположенные в поле зрения микроскопа.

В закваске для ряженки, варенца, простокваш мечниковской и южной, йогурта должны присутствовать молочнокислые стрептококки и в меньшем количестве палочки. В закваске для ацидофильной пасты и ацидофильного молока — только палочки.

В кефирной грибковой закваске должны выявляться молочнокислые стрептококки, клетки палочек и дрожжей; в кефирной производственной закваске — молочнокислые стрептококки в

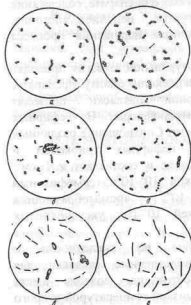


Рис. 48. Микроскопическая картина заквасок: а - закваска для творога; б - кефирная закваска; в - закваска для кумыса; г - закваска для южной и мичиновской простокваши; д - производственная кефирная закваска; е - закваска для ацидофильного молока, детских ацидофильных смесей

преобладающем количестве, единичные палочки и клетки дрожжей.

В случае если возникает сомнение в микроскопической чистоте заквасок, а при микроскопировании окрашенных препаратов посторонней микрофлоры обнаружить не удастся, из заквасок делают посев нулевого и 4-5 разведений в стерильное обезжиренное молоко. Посевы термостатируют в течение 72 ч. Закваску молочнокислых стрептококков проверяют на наличие посторонних термофильных палочек, поэтому посевы культивируют при 42 °С. Закваски молочнокислых палочек контролируют

на присутствие посторонних стрептококков при температуре 30 °С.

Из сгустков готовят микроскопические препараты, просматривают их и определяют наличие или отсутствие посторонних микроорганизмов.

Использование этого метода дает возможность установить наличие в закваске посторонней микрофлоры в количестве менее десятков тысяч в 1 см³, которое нельзя обнаружить методом непосредственного микроскопирования.

Посторонняя микрофлора не должна обнаруживаться при посеве 1 см³ закваски.

Наличие бактерий группы кишечных палочек в закваске определяют посевом ее на среду Кесслер. Закваску предварительно нейтрализуют до pH 7,4-7,6, добавляя к 10 см³ закваски 1 см³ 10%-ного раствора питьевой соды. Посевы термостатируют при 37 °С в течение 24 ч. Результаты оценивают по образованию или отсутствию газа в газвке. БГКП должны отсутствовать при посеве 3 см³ закваски для кефира и 10 см³ закваски для остальных продуктов (табл. 28). Анализ на наличие бактерий группы кишечных палочек производят из каждой емкости закваски ежедневно.

Определение наличия диациетил + ацетона и углекислоты производят в заквасках для масла и сыра.

Содержание диациетил и ацетона определяют по креатиновой пробе. На белую фарфоровую пластинку наносят в равных объемах (по 1 капле) фильтрат закваски, 40%-ный раствор КОН и 0,04%-ный раствор

креатина, тщательно перемешивают.

Отмечают время появления розового окрашивания. Если порозовение произошло менее чем за 7 мин, то закваска считается хорошим продуктомом четырехуглеродных соединений (диациетил + ацетона). Если же появление розового окрашивания отмечается после 7-10 мин, это указывает на слабую ароматобразующую способность микроорганизмов.

Наличие углекислого газа в закваске устанавливают, наливая в пробирку диаметром 15 мм закваску (20 см³), отмечают ее уровень и ставят на водяную баню с холодной водой. Температуру воды доводят до 90 °С и, не вынимая пробирки, отмечают уровень. Если закваска содержит углекислый газ, то сгусток становится губчатым и поднимается над сыороткой от 0,6 до 5 см и более.

Состав микрофлоры кефирной закваски (производственной и грибковой) определяют методом предельных разведений путем посева различных разведений в стерильное обезжиренное молоко и культивирования их в течение 3 сут. После этого микроскопируют препараты, приготовленные из содержимого пробирок со свернувшимся молоком. На основании полученных результатов составляют числовую характеристику и определяют количество лактококков и лактобактерий по методике, описанной при определении молочнокислых бактерий в молоке.

Ароматобразующие молочнокислые стрептококки выявляют на плотной среде с цитратом кальция при посеве различных разведений закваски. Посевы культивируют при 26 °С в течение 3-5 сут. Затем учитывают колонии, образующие зоны просветления в данной среде.

Дрожжи определяют чашечным методом на сусловом агаре при посеве различных разведений закваски и последующем выращивании при 24 °С в течение 3-5 сут.

Уксуснокислые бактерии определяют методом предельных разведений путем посева разведений в стерильное обезжиренное молоко и термостатирования их при 30 °С в течение 3-5 сут. Учет положительных результатов проводят по желтому кольцу, образующемуся на поверхности свернутого молока.

Требования к закваскам, регламентируемые Санитарными правилами и нормами, представлены в табл. 30.

Наличие бактериофага устанавливают посевом закваски в стерильное обезжиренное молоко с добавлением раствора метиленового синего. Если в процессе культивирования после обесцвечивания метиленового синего через 4-5 ч снова наблюдается посинение молока, это указывает на наличие в закваске бактериофага.

30. Микробиологические показатели заквасок

Группы заквасок	Масса закваски (см ³ /г), в которой не допускаются			Примечание
	БГ КП (коп.-формы)	Патогенные, в том числе сальмонеллы	Staph. aureus	
Закваски для кефира (жидкие)	3,0	100,0	10,0	Плесени не более 10 КОЕ/см ³
Закваски для других молочных продуктов, изготавливаемых из чистых культур	10,0	100,0	10,0	Плесени и дрожжи не более 10 КОЕ/см ³
Закваски сухие сублиминационной сушки, бакконцентраты	1,0	10,0	1,0	То же

Установление причин нарушения процесса сквашивания. Основными причинами нарушения процесса сквашивания являются наличие в молоке ингибирующих веществ или бактериофага.

Для выявления причин несквашивания наблюдают за развитием молочнокислых стрептококков в молоке в первые часы после внесения закваски. Если молоко содержит ингибирующие вещества, развитие микроорганизмов закваски не наблюдается с самого момента заквашивания, если же причиной несквашивания является развитие бактериофага, то сначала наблюдается увеличение количества клеток, а через 2-3 ч — их исчезновение в результате лизиса.

МИКРОБИОЛОГИЯ КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Кисломолочные продукты получают сквашиванием молока или сливок чистыми культурами молочнокислых бактерий, иногда с участием дрожжей и уксуснокислых бактерий. В процессе сквашивания протекают сложные микробиологические и физико-химические процессы, в результате которых формируются вкус, запах, консистенция и внешний вид готового продукта.

К кисломолочным продуктам относятся кисломолочные напитки, сметана, творог и творожные изделия. К кисломолочным напиткам относятся различные виды простокваш (обыкновенная, мечниковская, южная ацидофильная, варенец, ряженка, йогурт и др.), кефир (жирный, таллинский нежирный и др.), кумыс (из кобыльего, коровьего молока и др.), ацидофильные напитки (ацидофилин, ацидофильное и ацидофильно-дрожжевое молоко и др.). Производятся кисломолочные напитки с сахаром, фруктово-ягодными сиропами и другими наполнителями.

16.1. ДИЕТИЧЕСКИЕ И ЛЕЧЕБНЫЕ СВОЙСТВА КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

В нашей стране кисломолочные продукты особенно широко стали применять с начала XX в., когда И. И. Мечников впервые изучил значение их в питании человека. Он установил, что молочнокислые бактерии, попадая в кишечник вместе с кисломолочными продуктами, создают кислую среду, препятствующую развитию гнилостных бактерий, которые вызывают распад белков пищи с образованием токсических веществ, отрицательно влияющих на жизнедеятельность макроорганизма. Многие кисломолочные продукты содержат антибиотические вещества, подавляющие развитие кроме нежелательной микрофлоры кишечника также возбудителя туберкулеза, стафилококков и других микроорганизмов. Антибиотические вещества могут образовывать ацидофильная палочка, молочный и сливочный стрептококки, бифидобактерии и др.

Кисломолочные продукты имеют большую ценность с точки зрения физиологии питания. Под действием молочной кислоты казеин молока коагулирует в виде мелких хлопьев и усвояемость кисломолочных продуктов повышается. Так, простокваша в течение 1 ч усваивается организмом человека на 92 %, а цельное молоко — на 32 %.

В таких кисломолочных продуктах, как кефир и простокваша, содержатся жирорастворимые витамины А, D, E, которые накапливаются в результате жизнедеятельности бактерий. Творог и кисломолочные напитки богаты солями фосфора, кальция, магния, участвующими в обмене веществ организма человека. Кумыс, кефир, ацидофильно-

дрожжевое молоко содержит диоксид углерода и молочную кислоту, следы алкоголя, которые оказывают сильное секреторное воздействие на пищеварительные железы, что улучшает процесс пищеварения и усвоения пищи.

Кисломолочные продукты содержат в достаточном количестве незаменимые легкоусвояемые аминокислоты.

В связи с широким применением антибиотиков в медицине повысилась роль продуктов, содержащих acidофильные палочки и бифидобактерии. Их использование дает возможность восстановить нормальную микрофлору кишечника, угнетаемую антибиотиками.

16.2. ИСТОЧНИКИ МИКРОФЛОРЫ КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

В связи с тем что пастеризация молока при производстве кисломолочных продуктов осуществляется при более высоких температурах и длительной выдержке, чем при производстве питьевого молока, в качестве остаточной микрофлоры пастеризованного молока получают преимущественно термостойкие микроорганизмы - спорообразующие бактерии, термофильные молочнокислые палочки, энтерококки, бактериофаги и др. Эта микрофлора поселяется и на технологическом оборудовании.

Основную микрофлору сквашивания вносят с закваской, однако остаточная микрофлора пастеризованного молока также размножается в процессе сквашивания. Часть микрофлоры незаквасочного происхождения активизируется в присутствии микроорганизмов закваски, часть подавляется, а некоторые микроорганизмы, например бактериофаг, подавляют развитие микрофлоры закваски. Интенсивность размножения всей микрофлоры кисломолочных продуктов и конечное ее соотношение зависят во многом от качества молока, температуры и длительности сквашивания (созревания), скорости и конечной температуры охлаждения.

Основные кисломолочные продукты в зависимости от применяемых при их производстве заквасочных микроорганизмов могут быть разделены на пять групп, представленных ниже.

I - продукты, приготовляемые с использованием многокомпонентных заквасок (кефир, кумыс);

II - продукты, приготовляемые с использованием мезофильных молочнокислых стрептококков (творог, сыр домашний, сметана, простокваша обыкновенная);

III - продукты, приготовляемые с использованием термофильных молочнокислых бактерий (йогурт, простокваша мечниковская, южная, ряженка, варенец и др.);

IV - продукты, приготовляемые с использованием мезофильных и

термофильных молочнокислых бактерий (сметана пониженной жирности, творог, напитки пониженной жирности с плодово-ягодными наполнителями);

V - продукты, приготовляемые с использованием acidофильных палочек и бифидобактерий (acidофильное молоко, acidофилин, acidофильно-дрожжевое молоко, acidофильная паста, бифилин, детские acidофильные смеси).

16.3. ПРОДУКТЫ, ПРИГОТОВЛЯЕМЫЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ ЗАКВАСОК

Кефир. Единственный кисломолочный напиток, вырабатываемый на естественной симбиотической закваске - кефирных грибах (зернах), в состав которых входят мезофильные молочнокислые стрептококки, мезофильные молочнокислые и термофильные палочки типа стрепто- и бетабактерий, болгарская палочка, а также дрожжи и уксуснокислые бактерии.

К сырому молоку для производства кефира не предъявляют каких-либо особых требований, так как микрофлора кефирной закваски сравнительно нетребовательна к качеству молока.

Процесс сквашивания и созревания кефира ведут при температуре не выше 25 °С, поэтому остаточная микрофлора пастеризованного молока размножается незначительно. При производстве кефира основным источником обсеменения является кефирная закваска. Молоко обсеменяется также различными микробами, попадающими в него с оборудования.

Хранение и реализацию кефира необходимо осуществлять при температуре 4-8 °С в течение 36 ч с момента изготовления. В среднем весь цикл производства кефира длится около 24 ч.

В формировании качества кефира основную роль играют микроорганизмы, входящие в состав естественной симбиотической закваски, посторонняя микрофлора является возбудителем порчи продукта.

Мезофильные молочнокислые стрептококки (*Lac. lactis*, *Lac. cremoris*) обеспечивают активное кислотообразование и формирование сгустка. Их количество в готовом продукте достигает 10^9 в 1 см^3 .

Ароматобразующие молочнокислые стрептококки в кефирной закваске представлены в основном *Leu. dextranicum*, который развивается медленнее молочного и сливочного стрептококков. Его развитие может стимулироваться при размножении дрожжей. Ароматобразующие молочнокислые стрептококки образуют ароматические вещества и углекислый газ. Их количество в кефире составляет 10^7 - 10^8 в 1 см^3 .

Мезофильные молочнокислые палочки типа стрепто- и бетабактерий составляют в кефире 10^2 - 10^3 в 1 см^3 и не могут существенно

влиять на качество продукта. При контроле кефира их не учитывают.

Количество термофильных молочнокислых палочек в кефире достигает 10^7 - 10^8 1 см³. При повышенных температурах и увеличении продолжительности процесса сквашивания их количество может достигать 10^9 в 1 см³ и приводить к перекисанию продукта.

Дрожжи развиваются значительно медленнее, чем молочнокислые бактерии, поэтому увеличение их количества отмечается во время созревания продукта и составляет 10^6 в 1 см³.

Уксуснокислые бактерии развиваются медленно и содержатся в кефире в количестве 10^2 - 10^3 в 1 см³. Они способствуют формированию сгустка, излишнее развитие ацетобактерий может привести к появлению слизистой и тягучей консистенции продукта.

Бактерии группы кишечных палочек являются посторонними микроорганизмами. В процессе сквашивания и созревания их количество повышается в 10 раз. Затем в результате антагонистического влияния дрожжей и уксуснокислых бактерий оно снижается до исходного уровня. В связи с тем что бактерии группы кишечных палочек вызывают газообразование в молоке при температуре выше 30°C, в возникновении вспучивания кефира они участия не принимают.

Плесневые грибы попадают в кефир с оборудования, из воздуха, иногда из некачественной закваски. При длительном хранении кефира они могут развиваться на его поверхности.

31. Пороки кефира

Порок	Причина	Способ устранения или предупреждения
Наличие бактерий группы кишечных палочек	Обсеменение с оборудования, из закваски	Тщательная мойка и дезинфекция оборудования, кратковременное повышение кислотности закваски
Медленное сквашивание	Ослабление активности вследствие перекисания закваски	Повышение в закваске содержания мезофильных молочнокислых стрептококков
Слишком быстрое сквашивание и перекисание	Интенсивное развитие термофильных молочнокислых палочек	Снижение температуры сквашивания, уменьшение количества закваски до 1-2 %
Образование глазков и сгустка	Излишнее развитие дрожжей или ароматообразующих стрептококков	Снижение температуры сквашивания, уменьшение количества закваски до 1-2 %, использование производственной закваски
Невыраженный вкус	Слабое развитие ароматообразующих стрептококков из-за высокой температуры сквашивания	Снижение температуры сквашивания
Отделение сыворотки (расслоение). Жидкая консистенция	Вспенивание кефира во время розлива	Правильный подбор оборудования, увеличение содержания уксуснокислых бактерий в закваске

Установлено, что микрофлора кефира в различные периоды года остается относительно стабильной. В летнее время несколько повышается количество термофильных молочнокислых палочек, а в весеннее - уменьшается содержание уксуснокислых бактерий и снижается его вязкость. Поэтому в весеннее время рекомендуется повышать температуру культивирования кефирных грибов до 25 °C в целях интенсификации развития уксуснокислых бактерий.

Возможные пороки кефира, их причины и способы устранения или предупреждения приведены в табл. 31.

Кумыс. Это кисломолочный напиток из кобыльего или коровьего молока смешанного (молочнокислого и спиртового) брожения. Кобылье молоко беднее казеином, чем коровье, и, наоборот, богаче альбумином, лактозой, витаминами С, В₁, В₂ и микроэлементами - кобальтом и медью. Оно отличается от коровьего иммунными свойствами в отношении возбудителя туберкулеза.

Для повышения лечебных свойств кумыса из коровьего молока применяют специальные закваски из дрожжей, сбраживающих лактозу, антибиотически активных против микобактерий туберкулеза, штаммов *Lbm. bulgaricum* (типичной микрофлоры кумыса из кобыльего молока) и *Lbm. acidophilum*, антибиотически активных против нежелательной микрофлоры кишечника.

Разработана технология кумыса из специальной молочной смеси, составленной из цельного и обезжиренного молока, подсырной сыворотки с добавлением лактозы и витамина С.

32. Влияние микроорганизмов на качество кумыса

Микроорганизмы	Источник обсеменения	Условия, способствующие размножению	Роль в формировании качества	Возможные пороки
<i>Lbm. acidophilum</i> , <i>Lbm. bulgaricum</i>	Закваска	Повышение температуры (>30°C)	Образование кислоты и антибиотических веществ	Излишняя кислотность
Дрожжи	Закваска	Понижение температуры (<30°C), прекращение сквашивания	Образование CO ₂ , антибиотических веществ, хлопьевидного сгустка, типичного вкуса	Излишнее дрожжевое иску
Бактерии группы кишечных палочек	Оборудование	Повышение температуры сквашивания, замедление сквашивания	Образование газа и неспецифических веществ	Нестандартная по микробиологическим показателям продукция

Особенностью производства кумыса из молочной смеси является внесение большого количества закваски (20 %) в подготовленную

пастеризованную, охлажденную до 32-34 °С смесь, что создает благоприятные условия для развития дрожжей и молочнокислых бактерий. Процесс сквашивания ведут при постоянном перемешивании, что способствует развитию дрожжей.

Микроорганизмы, развивающиеся в продукте в процессе его производства и хранения, влияют на качество кумыса (табл. 32).

16.4. ПРОДУКТЫ, ПРИГОТОВЛЯЕМЫЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕЗОФИЛЬНЫХ МОЛОЧНОКИСЛЫХ СТРЕПТОКОККОВ

Творог. Творог - белковый кисломолочный продукт, получаемый в результате сквашивания молока с последующим удалением сыворотки. Разработано несколько способов производства творога, отличающихся продолжительностью технологических процессов, при которых происходит развитие микроорганизмов.

Основными микроорганизмами, обеспечивающими активное кислотообразование с начала процесса сквашивания, являются мезофильные молочнокислые стрептококки закваски (*Lac. lactis*, *Lac. cremoris*, *Lac. diacetylactis*, *Leu. dextranicum*). Их количество в готовом твороге достигает 10^8 - 10^9 клеток в 1 г. В состав закваски для творога, вырабатываемого ускоренным способом, вводят также термофильный стрептококк.

В твороге могут обнаруживаться дрожжи, попадающие в молоко с поверхности оборудования и с кефирной закваской. Они вызывают вспучивание продукта при длительном его хранении в условиях положительных температур. Количество клеток дрожжей в твороге с дрожжевым привкусом и признаками вспучивания достигает 10^5 - 10^6 в 1 г. Более интенсивное развитие дрожжей наблюдается в сладких творожных изделиях.

Уксуснокислые бактерии могут попадать в молоко с поверхности оборудования, из кефирной закваски или кефира. В процессе производства они могут вызывать тягучесть сгустка, в готовом продукте - появление нечистого вкуса. Пороки возникают при содержании уксуснокислых бактерий свыше 10^7 клеток в 1 г.

Плесневые грибы попадают в творог с поверхности оборудования, из воздуха. Они вызывают плесневение и горький вкус продукта, развиваются на поверхности творога при длительном хранении в условиях низких положительных температур.

Бактериофаг попадает в молоко вместе с лизогенными штаммами закваски, с поверхности оборудования, из воздуха. Его распространению способствуют разбрызгивание сыворотки, нерегулярная мойка оборудования, перемешивание молока и сыворотки. Развиваясь, бактериофаг лизирует клетки заквасочных микроорганизмов, что приводит к замедлению процесса сквашивания и активному

размножению посторонних микроорганизмов, в первую очередь термоустойчивых молочнокислых палочек и бактерий группы кишечных палочек, которые вызывают пороки вкуса.

В первые 6-8 ч сквашивания существенно не увеличивается содержание термоустойчивых молочнокислых палочек и бактерий группы кишечных палочек. Основной путь уменьшения количества этих посторонних микроорганизмов - сокращение длительности сквашивания, отделение сыворотки и быстрое глубокое охлаждение готового продукта.

Пороки творога микробиологического происхождения, причины их возникновения и меры, способствующие их устранению или предупреждению, приведены в табл. 33.

33. Пороки творога

Порок	Причина	Способ устранения или предупреждения
Излишек кислый вкус	Интенсивное развитие термоустойчивых молочнокислых палочек	Использование чистой активной закваски, применение температуры не выше 28 °С, использование методов придельного отделения сыворотки, ведение эффективного охлаждения
Вспучивание	Развитие дрожжей	Исключение возможности попадания кефирной закваски в творожный цех, эффективное охлаждение готового продукта
Ослизнение, тягучесть	Развитие уксуснокислых бактерий	Исключение возможности попадания кефирной закваски в молоко, перерабатываемое на творог
Медленное сквашивание	Развитие бактериофага, наличие ингибирующих веществ, сезонные изменения состава молока	Подбор резистентных заквасок, смена закваски, контроль молока при приеме, подбор заквасок, устойчивых к сезонным изменениям состава молока
Наличие бактерий группы кишечных палочек	Нарушение режимов мойки и дезинфекции оборудования, длительное хранение молока после пастеризации	Повышение качества мойки, использование свежепастеризованного молока

Домашний сыр. Это молочнобелковый продукт, относящийся к мягким кисломолочным несозревающим сырам. Технология домашнего сыра близка к технологии творога. Ее особенности состоят в пониженной температуре пастеризации обезжиренного молока, промывании зерна водой и подогревания до температуры 48-55 °С.

Понижение температуры пастеризации уменьшает ее эффективность, промывание способствует вымыванию поверхностной

микрофлоры и снижению кислотности зерна, во время нагревания количество молочнокислых стрептококков уменьшается.

Эти операции создают благоприятные условия развития посторонней микрофлоры, вносимой с водой (психротрофные бактерии). Поэтому рекомендуется воду для промывания предварительно стерилизовать. Кроме того, к дополнительному обсеменению продукта может привести внесение на последнем этапе производства сливок и поваренной соли.

При производстве домашнего сыра применяемая закваска состоит из штаммов *Lac. lactis*, *Lac. cremoris*, *Lac. diacetylactis*, *Leu. dextranicum*. Первые два вида ведут активный кисломолочный процесс, а два последние обеспечивают аромат готового продукта. Особенно важно, чтобы в состав закваски не входили штаммы, образующие большое количество углекислого газа, так как в противном случае возможно всплывание зерна в процессе производства. В домашнем сыре количество молочнокислых стрептококков меньше, чем в твороге, и составляет 10^7 - 10^8 в 1 г. Это объясняется тем, что во время нагревания зерна количество молочнокислых стрептококков в нем снижается на 90-95 %.

Домашний сыр по сравнению с творогом является более незатраченной по отношению к посторонней микрофлоре, так как имеет пониженную кислотность и меньшее содержание молочнокислых бактерий. Поэтому его можно хранить без изменения органолептических свойств при комнатной температуре в течение 1 сут, при 2-4 °C - 7-10 дней.

Наибольшую роль в порче домашнего сыра при хранении играют психротрофные бактерии, плесневые грибы и дрожжи. Они вызывают протеолиз белка, ослизнение зерна, изменение жира.

Основные пороки домашнего сыра микробиологического происхождения приведены в табл. 34.

34. Пороки домашнего сыра

Порок	Причина	Способ устранения или предупреждения
Излишний кислый вкус, пастообразная консистенция	Развитие термоустойчивых молочнокислых палочек при нагревании	Использование свежепастеризованного молока, тщательная мойка оборудования
Невыраженный вкус	Слабое развитие ароматообразующих бактерий	Внесение закваски (<i>Lac. lactis</i> , <i>Lac. diacetylactis</i>) в зерно
Слизистое зерно	Развитие уксуснокислых бактерий, слизеобразующих молочнокислых стрептококков (<i>Lac. cremoris</i>)	Использование температуры не выше 25 °C, тщательная мойка и дезинфекция оборудования, смена закваски
Желеобразная или слизистая поверхность, гнилостный вкус, разложение жира	Развитие психротрофных бактерий, плесесей	Обеззараживание воды, обеспечение микробиологической чистоты сырья

Термоустойчивые молочнокислые палочки могут способствовать повышению кислотности сыворотки при нагревании зерна и ухудшению ее отделения, в результате чего зерно становится мягким и разваливается. Основная часть бактерий группы кишечных палочек при нагревании зерна погибает, однако они снова могут обсеменять продукт при внесении сливок и соприкосновении с оборудованием.

Бактериофаг тормозит процесс сквашивания и таким образом способствует созданию благоприятных условий для развития посторонней микрофлоры.

Сметана. Продукт получают из нормализованных пастеризованных сливок путем сквашивания их закваской и созревания при низких температурах.

Сливки при производстве сметаны пастеризуют при высоких температурах, поэтому в остаточной микрофлоре преобладают термоустойчивые молочнокислые палочки и споры бактерий.

35. Влияние микроорганизмов на качество сметаны

Микроорганизмы	Источник попадания	Условия, способствующие размножению	Положительная роль в формировании качества	Количество микроорганизмов в 1 г продукта, при котором возникает порок
<i>Lac. lactis</i>	Закваска	Температура 25-30 °C	Активное сквашивание	-
<i>Lac. cremoris</i>	Закваска	Температура 21-25 °C	Сквашивание, формирование консистенции	-
<i>Lac. diacetylactis</i>	Закваска	Температура 25-30 °C	Сквашивание, ароматообразование	-
<i>Str. thermophilus</i>	Закваска	Температура 30 °C	Активное сквашивание	-
Термоустойчивые молочнокислые палочки	Загрязненные закваска, пастеризованные сливки, оборудование	Температура выше 25 °C, длительный процесс сквашивания	-	$2,5 \times 10^6$ - перекисание
Дрожжи	Оборудование, первичная закваска	Длительное хранение	-	10^6 - вспучивание, дрожжевой вкус
Бактерии группы кишечных палочек	Оборудование	Температура выше 25 °C, медленное сквашивание	-	10^7 - 10^8 - нестандартная продукция
Психротрофные бактерии	Оборудование	Пониженная кислотность, хранение при низких температурах	-	10^7 - прогоркание, разложение белка
Плесневые грибы	Оборудование, воздух	Длительное хранение при низких температурах	-	Более 10^6 спор, плесневение, распад белка и жира

В состав заквасок для сметаны вводят *Lac. lactis*, *Lac. cremoris*, *Lac. diacetylactis*, *Leu. cremoris*, *Leu. dextraniticum*.

В целях ускорения кисломолочного процесса и улучшения качества продукта в составе заквасок для сметаны широко используют термофильные стрептококки, уксуснокислые бактерии, ацидофильные палочки.

Основные представители микрофлоры сметаны, их влияние на формирование ее качества и содержание отдельных групп микроорганизмов при возникновении пороков приведены в табл. 35.

Гомоферментативные молочнокислые стрептококки обеспечивают активное сквашивание сливок. В состав закваски подбирают штаммы *Lac. cremoris*, образующие сгустки вязкой консистенции. Гетероферментативные стрептококки обеспечивают ароматобразование в сметане. Общее содержание молочнокислых стрептококков в 1 г сметаны достигает 10^7 .

16.5. ПРОДУКТЫ, ПРИГОТОВЛЯЕМЫЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕРМОФИЛЬНЫХ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

Йогурт и простокваша южная. При производстве этих продуктов для получения более плотной консистенции в молоко повышают содержание сухих веществ длительным выпариванием до уменьшения объема в 2-3 раза или добавлением сухого обезжиренного молока.

Пастеризацию и топление молока при производстве этих продуктов ведут продолжительное время - 3 ч при высоких температурах 92-95 °С, поэтому после пастеризации остаются лишь термоустойчивые палочки и споры бактерий. Значительной роли они не играют, так как процесс сквашивания проходит быстро, а с заквасками молочнокислых бактерий вносят в большем количестве, чем число остаточных термоустойчивых палочек.

Гомогенизированное во время пастеризации молоко охлаждают до температуры 40-45 °С и вносят закваску в количестве 1-5 %. В качестве закваски используют штаммы термофильного стрептококка и болгарской палочки в соотношении 4:1 (для простокваши) и 1:1 (для йогурта). Применяют также симбиотическую закваску этих микроорганизмов.

Заквашенное молоко сквашивают в течение 3-5 ч до кислотности 75-80 °Т, после чего быстро охлаждают до 4-8 °С. При этой температуре продукты хранят до 36 ч.

Основными микроорганизмами, ведущими кисломолочный процесс, являются термофильные стрептококки и болгарская палочка. Стрептококки предпочитают температуру не выше 40°С, болгарская палочка, наоборот, активизирует свое развитие при температурах выше 40 °С и внесении большего количества закваски. Эти особенности учитывают при производстве для того, чтобы регулировать содержание

стрептококков и палочек в заквасках и готовом продукте. Содержание термофильных стрептококков и болгарской палочки в 1 см³ продукта составляет 10^7 - 10^8 клеток. Если количество термофильных стрептококков превышает указанный предел, то может появиться порок - тягучая вязкая консистенция. Болгарская палочка при отсутствии эффективного охлаждения готовой продукции вызывает излишнюю кислотность продукта. Дрожжи могут развиваться при температурах ниже 40 °С или во время длительного хранения при низких температурах. Бактерии группы кишечных палочек не могут интенсивно размножаться из-за короткого срока сквашивания продуктов.

Раженка и варенец. При производстве этих продуктов термическую обработку молока проводят при температурах 92-95 °С в течение 3 ч. В результате топления молоко приобретает бурватый оттенок и вкус топленого молока. Молоко охлаждают до 40-45 °С и вносят закваску термофильного молочнокислого стрептококка в количестве 3-5 %. Иногда добавляют болгарскую палочку в соотношении к стрептококку 1 : 4 - 1 : 5.

Сквашивание молока длится 3-6 ч до кислотности 80-90 °Т. Содержание термофильного стрептококка в 1 см³ продукта составляет 10^7 - 10^8 клеток. Основной процесс сквашивания ведут термофильные молочнокислые стрептококки, вносимые с закваской. В отсутствие болгарской палочки они хуже развиваются, поэтому сквашивание молока может затягиваться до 5-6 ч и более. Это способствует развитию термоустойчивых молочнокислых палочек. Поведение дрожжей и бактерий группы кишечных палочек аналогично поведению этих микроорганизмов при производстве йогурта и простокваши южной.

В результате размножения термоустойчивых молочнокислых палочек возникает порок - излишняя кислотность продукта, если их количество достигает 10^8 в 1 см³.

16.6. ПРОДУКТЫ, ПРИГОТОВЛЯЕМЫЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕЗОФИЛЬНЫХ И ТЕРМОФИЛЬНЫХ МОЛОЧНОКИСЛЫХ СТРЕПТОКОККОВ

К этим продуктам относят любительскую сметану, молочнокислую пасту «Здоровье», творог, вырабатываемый ускоренным методом, а также напитки пониженной жирности с плодово-ягодными наполнителями. Сквашивание молока ведут при температурах 35-38 °С, которые способствуют активному размножению посторонних термоустойчивых молочнокислых палочек. При этом мезофильные ароматобразующие стрептококки размножаются медленно.

Созданы закваски, состоящие из мезофильных и термофильных молочнокислых стрептококков, которые применяют при температурах 23-32°С. При производстве некоторых кисломолочных напитков в состав

заквасок помимо стрептококков вводят уксуснокислые и пропионовокислые бактерии.

Для закваски подбирают специальные штаммы термофильных стрептококков, увеличивающие вязкость получаемых продуктов, что очень важно при производстве продуктов пониженной жирности, особенно сметаны, содержащей менее 20 % жира. Для выработки творога отбирают штаммы термофильных стрептококков, образующих невязкие сгустки.

При создании напитков с плодово-ягодными наполнителями используют закваски, состоящие из мезофильных и термофильных стрептококков, обладающих умеренной кислотообразующей способностью.

Молоко пастеризуют при высоких температурах, поэтому по окончании процесса остаются лишь споры бактерий и термоустойчивые молочнокислые палочки. Споры не развиваются после внесения закваски, а термоустойчивые палочки могут размножаться при повышенных температурах сквашивания или при его затягивании. Закваску вносят в объеме 1-5 % в гомогенизированное пастеризованное и охлажденное до 30-35 °С молоко, содержащее 5 % сахара. Сквашивание проводят в течение 6-7 ч до достижения кислотности 80 °Т.

Во время сквашивания развивается заквасочная и посторонняя микрофлора. После сквашивания сгусток перемешивают, охлаждают до 10-16 °С и вносят в него сахарный сироп, который предварительно проверяют на микробиологическую чистоту, иначе он может послужить источником загрязнения продукта дрожжами и другими нежелательными микроорганизмами. В случае обнаружения загрязнения сироп подвергают термической обработке.

В табл. 36 приведены данные о роли основных представителей микрофлоры продуктов данного типа в формировании их качества и возникновении пороков.

Микроорганизмами, ведущими кисломолочные процессы, являются мезофильные и термофильные стрептококки. Мезофильные стрептококки осуществляют активное течение кисломолочного процесса и участвуют в обеспечении влагоудерживающей способности сгустка. Их количество в 1 см³ продукта достигает 10⁶-10⁸ клеток. Основной функцией термофильных стрептококков является обеспечение необходимой вязкости сгустка, способности его к удерживанию сыворотки и восстановлению структуры после перемешивания. Содержание их в продукте составляет 10⁶-10⁸ клеток в 1 см³.

36. Влияние микроорганизмов на качество напитков пониженной жирности с плодово-ягодными наполнителями

Микроорганизмы	Источник попадания	Условия, способствующие развитию	Роль в формировании качества, вызываемый порок
Lac. lactis	Закваска	Температура ниже 32 °С	Активное свертывание молока, обеспечение влагоудерживающей способности сгустка
Str. thermophilus	Закваска	Температура выше 32 °С	Активное свертывание молока, обеспечение вязкости сгустка, способности его к удерживанию сыворотки и восстановлению структуры после перемешивания
Термофильные молочнокислые палочки	Загрязненное закваска, оборудование, пастеризованное молоко	Длительный процесс сквашивания, медленное охлаждение готового продукта	Излишняя кислотность
Дрожжи	Кефирная закваска, оборудование, сироп (при неадекватной термической обработке)	Хранение при повышенных температурах	Вступивание, дрожжевой вкус
Бактерии группы кишечных палочек	Оборудование	Длительный процесс сквашивания, медленное охлаждение продукта	Нестандартная продукция

16.7. ПРОДУКТЫ, ПРИГОТОВЛЯЕМЫЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АЦИДОФИЛЬНЫХ ПАЛОЧЕК

К этой группе продуктов относят ацидофильное молоко, ацидофильно-дрожжевое молоко, ацидофильную пасту, детские ацидофильные смеси.

Ацидофильное молоко. Продукт готовят, сквашивая пастеризованное молоко чистыми культурами ацидофильных бактерий. Они участвуют в активном сквашивании молока, формировании вкуса, консистенции, лечебных свойств продукта. Их количество в готовом продукте достигает 10⁸-10⁹ клеток в 1 см³. Молоко пастеризуют при 92-95 °С 2-3 мин. Закваску вносят в объеме 1-5 %. Молоко сквашивают при 40 °С до кислотности 70-80 °Т. При медленном охлаждении продукта ацидофильные бактерии могут вызывать излишнюю кислотность, в результате продукт окажется нестандартным по кислотности (выше 120 °Т).

Частыми пороками ацидофильного молока и других ацидофильных продуктов является развитие в процессе сквашивания мезофильных (при температуре ниже 40 °С) и термофильных (при температуре 40-45 °С)

молочнокислых стрептококков, количество которых может достигать 10^6-10^7 клеток в 1 см^3 , а также энтерококков, развивающихся более медленно. Размножение этих микроорганизмов в процессе сквашивания приводит к образованию дряблого густка, нетипичного вкуса и снижению полезных свойств готового продукта.

Несмотря на то что на искусственных питательных средах ацидофильные палочки подавляют развитие бактерий группы кишечных палочек, в условиях производства ацидофильных продуктов они быстро размножаются, иногда их количество достигает 10^6 клеток в 1 см^3 . В этом случае продукция не соответствует стандарту.

Ацидофилин. Его вырабатывают из пастеризованного молока, сквашивая его закваской, состоящей из ацидофильной палочки, мезофильных молочнокислых стрептококков и симбиотической кефирной закваски в равных соотношениях.

Ацидофильно-дрожжевое молоко. В пастеризованное молоко вносят закваску, состоящую из ацидофильных бактерий и дрожжей вида *Sacch. lactis*. Продукт получают при смешанном молочнокислом и спиртовом брожении.

Ацидофильная паста. Из ацидофильного молока с кислотностью 80-90 °Т отпрессовывают часть сыворотки в мешках или отделяют ее на твозерных сепараторах.

Детские ацидофильные смеси. Основные усилия должны быть направлены на получение чистого в микробиологическом отношении продукта со сравнительно невысокой кислотностью: для «Малютки» 50-80 °Т, для «Малыша» 60-80 °Т. С этой целью все компоненты подвергают тепловой обработке: обезжиренное молоко пастеризуют при 90 °Т с выдержкой 2-3 мин (или стерилизуют при 135 °С 5 с), а молочнорастительные сливки - при 90 °С с выдержкой 10 мин. Основные технологические процессы: пастеризацию, охлаждение, заквашивание, сквашивание - рекомендуется проводить в одной емкости.

Обсеменение продукта посторонней микрофлорой возможно при внесении в сквашенную смесь молочнорастительных сливок, если их после тепловой обработки долгое время хранили, охлаждадали смесь в потоке при недостаточно эффективной мойке и дезинфекции охладителя и другого оборудования.

В качестве закваски используют культуру ацидофильной палочки, которую вносят в количестве 1-3 %. Сквашивание проводят при 37-40 °С в течение 3-4 ч до кислотности 40-50 °Т. В процессе охлаждения продукта до 15-20 °С в течение 1-2 ч кислотность повышается до 50-60°Т.

Переисание продукта может происходить на этапах сквашивания и охлаждения в результате развития ацидофильных бактерий. Это бывает в том случае, когда не проводят быстрого охлаждения продукта. Снизить нарастание кислотности можно также уменьшением количества

вносимой закваски и сокращением технологического процесса сквашивания.

16.8. ПРОДУКТЫ С БИФИДОБАКТЕРИЯМИ

Продукты, обогащенные бифидобактериями, характеризуются активными диетическими свойствами, так как содержат ряд биологически активных соединений: свободные аминокислоты, летучие жирные кислоты, ферменты, антибиотические веществ, микро- и макроэлементы.

В настоящее время все бифидосодержащие продукты условно можно разделить на три группы.

В первую входят продукты, в которые вносят жизнеспособные клетки бифидобактерий, выращенные на специальных средах. Размножение этих микроорганизмов в продукте не предусматривается.

Ко второй группе относятся продукты, сквашенные чистыми или смешанными культурами бифидобактерий, активизация роста которых достигается обогащением молока бифидогенными факторами различной природы.

Третья группа бифидосодержащих продуктов включает продукты смешанного брожения, чаще всего сквашенные совместными культурами бифидобактерий и молочнокислых микроорганизмов.

Ассортимент продуктов, содержащих бифидобактерии, достаточно широк. Это кисломолочные напитки («Бифидин», «Бифилакт», йогурт, кефир, простокваша), творог, быстросозревающий сыр, масло, сливочные кремы, национальные продукты, сухие детские молочные продукты и др.

Технологическая схема производства кисломолочного напитка «Бифидин» предусматривает сквашивание обезжиренного молока или пахты чистыми культурами мезофильных молочнокислых стрептококков и бифидобактериями *Bifidobacterium adolescentis* в соотношении 1:4. Напиток предназначен для диетического и лечебного питания всех возрастных групп населения. Для приготовления молочного напитка «Бифилакт» используются штаммы бифидобактерий и *Lbm. plantarum*. Технология предусматривает культивирование бифидобактерий в течение 22 ч в молоке при 37 °С с последующим введением закваски лактобактерий. Совместное культивирование проводят в течение 16 ч. Кислотность «Бифилакта» 80 °Т, общее число жизнеспособных клеток 10^8 в 1 мл. В качестве закваски при производстве «Бифилакта» используют жидкую культуру бифидобактерий, выращенную на печеночной или гидролизатномолочной среде, и культуру *Lbm. plantarum*, выращенную на молочндрожжевой среде. «Бифилакт» обладает высокой биологической ценностью, рекомендуется для детского и лечебного питания.

При производстве творога традиционным способом с использованием закваски, состоящей из мезофильных стрептококков и

бифидобактерий, уменьшается количество стафилококков в готовом продукте и при хранении. Эффект угнетения роста стафилококков обусловлен непосредственным воздействием антибиотических веществ, образуемых бифидобактериями, а также наличием уксусной и молочной кислот, карбоксильных соединений.

Создана технология сыра «Айболит», который относится к группе мягких сыров без созревания и обладает высокой биологической ценностью и выраженным лечебно-профилактическим действием. В составе закваски для сыра используют микроорганизмы естественной микрофлоры кишечника (молочнокислые бактерии и бифидобактерии). Готовый продукт содержит в достаточном большом количестве бифидобактерии (10^8 - 10^9 КОЕ/г).

При внесении закваски бифидобактерий в сливочное масло (до 10^5 - 10^6 клеток в 1 г) качественная оценка масла повышается на 3-4 балла в сравнении с контролем. Присутствие бифидобактерий тормозит окислительные и гидролитические процессы порчи масла и позволяет сохранить его высокое качество. При развитии бифидобактерий снижается окислительно-восстановительный потенциал в масле.

В питании детей первого года жизни, до трех лет и дошкольного возраста значительное место отводится кисло-молочным продуктам, приготовленным путем сквашивания адаптированных молочных смесей специально подобранными штаммами молочнокислых бактерий и бифидобактерий.

Кисло-молочные лечебные продукты, предназначенные для вскармливания детей при острых желудочно-кишечных заболеваниях, дисбактериозах, при нарушении пищеварительных функций у недоношенных детей, а также для кормления здоровых детей, должны отвечать следующим специфическим требованиям: содержать в большом количестве жизнеспособные клетки заквасочных бактерий, иметь умеренную кислотность, высокую усвояемость белка и кальция. В связи с этим при подборе микроорганизмов, входящих в состав закваски, кроме биохимических признаков учитывают их способность приживаться в кишечнике (устойчивость к фенолу, индолу, желчи), антибиотическую активность по отношению к условно-патогенным и патогенным микроорганизмам и др.

Предложен универсальный лечебно-профилактический продукт «Бифилайф», содержащий основные, доминирующие в кишечнике человека виды бифидобактерий — *B. bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. infantis*, которые используются также в качестве производственных штаммов при выпуске детских молочных продуктов.

Перспективным продуктом для детского питания является сухой молочный продукт повышенной биологической ценности «Бифидолакт». Он предназначен для искусственного или смешанного вскармливания

детей первого года жизни. Количество клеток бифидобактерий в 1 г сухого продукта должно быть не менее 10^6 . По бифидогенному действию «Бифидолакт» приближен к материнскому молоку и способствует повышению иммунологической защиты ребенка.

Кисло-молочный продукт «Бифилин» производят на адаптированной молочной основе для диетического питания детей раннего возраста. Он обладает приятным кисло-молочным вкусом и специфическим ароматом летучих кислот, количество живых клеток бифидобактерий в 1 см³ продукта составляет 10^9 , кислотность — 65 °Т.

«Бифилин» готовят, используя специально подобранные штаммы бифидобактерий, способные размножаться в молоке, вырабатывать антибиотические вещества и L (+)-форму молочной кислоты. Продукт обладает высокой терапевтической эффективностью при вскармливании грудных детей с различными желудочно-кишечными заболеваниями, аллергией, а также повышает у них иммунитет к этим заболеваниям.

Для питания и лечения детей первого года жизни предназначен также кисло-молочный продукт, представляющий собой кисло-молочную смесь «Малютка», вырабатываемую из молока и других компонентов, сквашенную закваской на чистых культурах бифидобактерий, обладающих антибиотической активностью. Количество жизнеспособных клеток в готовом продукте должно быть не менее 10^9 .

Кисло-молочные смеси «Малыш» и «Детолакт» содержат ассоциации различных видов и штаммов бифидобактерий и молочнокислых палочек. Продукты отличаются высоким количеством жизнеспособных клеток бифидобактерий и низкой кислотностью.

16.9. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ПРОИЗВОДСТВА КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Задачи микробиологического контроля сводятся к обеспечению надлежащей направленности микробиологических процессов и соблюдению санитарно-гигиенических условий производства.

Исходя из этого, санитарно-микробиологический контроль производства кисло-молочных продуктов заключается в проведении контроля технологического процесса производства и готовой продукции, а также санитарно-гигиенического состояния цеха (оборудования, посуды, воздуха и др.).

Микробиологический контроль технологии производства кисло-молочных продуктов состоит в исследовании пастеризованного молока, предназначенного для заквашивания, закваски, полуфабрикатов и готовой продукции.

Контроль технологического процесса производства кисло-молочных продуктов производится один раз в месяц. Контроль термограмм с пастеризационных установок проводится ежедневно.

При контроле технологии проверяют эффективность пастеризации молока не реже 1 раза в 10 дней. При этом БГКП не должны обнаруживаться в 10 см^3 .

Особое внимание должно быть уделено качеству заквасок. Их исследуют, отбирая пробы из трубы при подаче закваски в ванну, на наличие кишечных палочек. При этом БГКП не должны выявляться в 10 см^3 .

В дальнейшем контроль технологического процесса проводят путем исследования смеси после заквашивания и сквашивания. В последнем случае, пробы отбирают из ванны, резервуара или бутылки при термостатном способе производства. Определяют наличие БГКП, которые не должны обнаруживаться в 1 см^3 .

Контроль технологического процесса производства творога и сметаны производится не реже двух раз в месяц. На наличие БГКП контролируют пастеризованное молоко из ванны до заквашивания, молоко после заквашивания, стукот и творог. Закваску контролируют ежедневно.

В случаях появления в готовом продукте порока «излишняя кислотность» пастеризованное молоко из ванны и закваску проверяют на наличие термоустойчивых палочек. При появлении в продукции порока («вспучивание») готовый продукт проверяется на наличие дрожжей (по микроскопическому препарату).

Для выработки кефира необходимо, чтобы в заквашенном молоке БГКП отсутствовали в $0,3 \text{ см}^3$. Во время розлива отбирают одновременно пробы из ванн (танков) с заквашенным молоком и бутылки с конвейера различных автоматов и проверяют их на наличие БГКП.

Готовую продукцию контролируют, как правило, на наличие бактерий группы кишечных палочек, золотистого стафилококка, иногда выявляют плесени и дрожжи, а при необходимости - и по микроскопическому препарату не реже одного раза в 5 дней. При эпидемических показаниях выявляют патогенные микроорганизмы, в том числе и сальмонеллы как основные возбудители пищевых отравлений. Пробы отбирают из продукта после разливочно-укупорочного автомата или из бутылки и хладостата.

Микробиологические показатели различных кисломолочных продуктов представлены в табл. 37.

Бактерии группы кишечных палочек не допускаются в простоквашах в 1 см^3 . В твороге, сыре домашнем и других творожных изделиях, вырабатываемых без термической обработки, а также в сметане всех видов БГКП не должны обнаруживаться в $0,001 \text{ г}$ (1 см^3).

Творожные изделия и сметана, вырабатываемые с термообработкой, а также кисломолочные напитки, напитки из

сыротоки, десерты сливочные не должны содержать БГКП в массе меньше $0,01 \text{ г}$ (1 см^3).

37. Микробиологические показатели кисломолочных продуктов

Вид продукта	Масса продукта (г, см ³), в которой не допускаются		Примечания
	БГКП (колиформы)	Патогенные в т.ч. сальмонеллы	
Творог, сыр домашний и др. творожные изделия, вырабатываемые без термообработки	0,001	25	0,1
Творожные изделия, вырабатываемые с термообработкой	0,01	25	0,1
Десерты сливочные	0,01	25	1,0
Простокваша (обыкновенная, мечниковская, кожная, ацидофильная, ряженка, варенец, йогурт и др.)	1,0	25	1,0
Другие кисломолочные напитки (кефир, кумыс, ацидофильные и др.)	0,01	25	1,0
Кефир жирный «Бифидок»	0,01	25	1,0
Напитки из сыротоки	0,01	25	
Сметана всех видов	0,001	25	1,0
Сметана с термической обработкой	0,01	25	1,0
Сметана «Истринская»	0,01	25	1,0
			Бифидобактерий меньше 10^6 в 1 см^3
			Дрожжи, плесени - КОЕ более 50 (см ³)

Золотистые стафилококки не должны содержаться в 1 см^3 сметаны, различных простоквашах (обычной, мечниковской, южной, ацидофильной, ряженке, варенец, йогурте и др.), а также в других кисломолочных напитках.

В творожных изделиях золотистые стафилококки не допускаются в $0,1 \text{ г}$ продукта.

В сметане «Истринская» нормируется также количество плесеней и дрожжей, КОЕ которых не должно превышать 50 в 1 г продукта.

Патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, в кисломолочных продуктах не допускаются в 25 г .

При контроле кисломолочных продуктов методом микроскопирования просматривают окрашенные препараты под микроскопом для характеристики микрофлоры этих продуктов. Ориентировочный состав микроорганизмов исследуемых продуктов представлен в табл. 38.

При ухудшении микробиологических показателей готового продукта проводят дополнительный контроль технологических

процессов этих продуктов для установления причин, влияющих на качество готовой продукции.

38. Микрофлора кисломолочных продуктов

Наименование продуктов	Состав микрофлоры
Творог*, творожные изделия, сметана, домашний сыр, простокваша обыкновенная; напитки: «Русский», «Славянский», «Новинка», «Любительский», «Юбилейный»	Молочнокислые стрептококки
Ацидофильное молоко, ацидофильная паста, напиток «Московский»	Молочнокислые палочки
Ацидофильно-дрожжевое молоко, ацидофильно-дрожжевой напиток, кумыс, напиток «Прохлада».	Молочнокислые палочки, дрожжи
Простокваша мечниковская, южная, слоеная, йогурт, ряженка, варенец; напитки: «Южный», «Снежок», «Росенский», «Коломенский»; пахта «Идеал», пахта диетическая, сметана ацидофильная	Молочнокислые стрептококки и палочки
Ацидофилин	Молочнокислые стрептококки и палочки, единичные дрожжи
Напиток «Вита»	Молочнокислые палочки, бифидобактерии, допускается наличие молочнокислых стрептококков
Кефир, напиток «Здоровье»	Молочнокислые стрептококки и палочки, единичные дрожжи
Напитки: «Углицкий», «Бифидин»	Молочнокислые стрептококки и бифидобактерии
Кисломолочный продукт «Тонус»	Пропионовые бактерии и молочнокислые стрептококки

* В микроскопическом препарате творога допускаются единичные клетки дрожжей и палочек.

Одновременно с отбором проб для контроля технологического процесса берут пробы для контроля санитарно-гигиенического состояния цеха (эффективность мойки оборудования, посуды, чистота воздуха, чистота рук и одежды рабочих и др.) и наличия на оборудовании термоустойчивых молочнокислых палочек и дрожжей (в случае появления в продукции пороков – излишняя кислотность и всучивание).

Проверяется каждая партия плодово-ягодных наполнителей (табл. 39).

39. Микробиологические показатели плодово-ягодных наполнителей

Группа продуктов	КМАФАнМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г, см ³), в которой не допускаются		Примечание
		Б КП (колиформы)	Патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы	
Плоды и ягоды, протертые с сахаром и другие плодово-ягодные концентраты с сахаром – нестерилизованные, в различной таре	5x10 ⁴	1,0	25	Дрожжи, КОЕ/г, не более – 50 Плесени, КОЕ/г, не более – 50
Плоды и ягоды, обработанные с применением консервантов и (или) подвергнутые различным способам теплостойкого воздействия	Должны удовлетворять требованиям промышленной стерильности.			

К кисломолочным продуктам детского питания предъявляются более высокие микробиологические требования, чем к продуктам массового потребления, соответственно и к пищевому сырью и компонентам, используемым для их изготовления.

В жидких кисломолочных продуктах детского питания общее количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов не нормируется. Колиформные бактерии для большинства продуктов не допускаются в 3 см³. В заквасках не должны выявляться в 10 см³, а в кефирной закваске должны отсутствовать в 3 см³.

Коагулазоположительные стафилококки (*Staph. aureus*) не допускаются, как правило, в продукте в 10 см³, а в закваске – в 1 см³. Патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, не должны обнаруживаться в 50 см³ продукта и в 100 см³ закваски.

В некоторых детских продуктах нормируется количество бифидобактерий, ацидофильных палочек, плесневых грибов, дрожжей, *Vac. cereus*, *E. coli* и др.

МИКРОБИОЛОГИЯ МАСЛА

Масло животное в зависимости от массовой доли молочного жира и других потребительских показателей подразделяют на сливочное масло и топленое масло, соответственно состоящие преимущественно или исключительно из жировой фазы молока.

Сливочное масло представляет собой высокоэнергетический пищевой продукт, обладающий специфическими, свойственными ему вкусом, запахом, цветом, консистенцией и хорошей усвояемостью. Оно представляет собой концентрат молочного жира, массовая доля которого в масле различных видов колеблется от 50 до 85 %. Кроме жира в масле частично переходят все составные части молока - белки, молочный сахар, витамины и др.

По пищевой ценности сливочное масло уступает сырам и другим молочным продуктам вследствие меньшей сбалансированности основных пищевых веществ: белков, жиров и углеводов. Оно содержит сравнительно мало биологически важных полиненасыщенных жирных кислот: линолевой, линоленовой и арахионовой.

Вместе с тем сливочное масло содержит важные для человеческого организма фосфолипиды (лецитин и др.), жирорастворимые (A, D, E) и водорастворимые витамины (B₁, B₂, C, β-каротин), а также минеральные вещества.

В качестве сырья для производства сливочного масла используют сливки. Это гетерогенная система, состоящая из тех же компонентов, что и молоко, но с другим соотношением между жировой фазой и плазмой. Вследствие этого вязкость, дисперсность жировой фазы, кислотность и другие свойства существенно различаются. Массовая доля жира в используемых сливках составляет от 32 до 55 %.

Топленое масло – пищевой продукт, получаемый вытапливанием жировой фазы из жирсодержащих молочных продуктов, в том числе сливочного масла. Оно состоит из молочного жира (98-99 %), имеет специфические, характерные для него вкус и запах, зернистую консистенцию и приятный темно-желтый цвет. Часто выработка топленого масла существует как производство, обеспечивающее утилизацию жирсодержащего сырья, непригодного для непосредственной реализации, – подсырного масла, сборного и нестандартного сливочного, зачисток масла и др.

17.1. УСЛОВИЯ РАЗВИТИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ В МАСЛЕ

Масло вырабатывают методами непрерывного или периодического сбивания и преобразования высокожирных сливок.

Наряду с традиционными видами масла, такими, как масло сливочное несоленое и соленое, промышленностью широко выпускают новые, с повышенным содержанием белка и пониженной энергетической ценностью, а также с различными наполнителями.

Масло сливочное несоленое вырабатывают сладкосливочное и кислосливочное с содержанием 82,5 % жира и 16 % влаги. Оно имеет чистые вкус и запах. Консистенция его однородная, мажущаяся, цвет от белого до желтоватого.

Масло сливочное соленое вырабатывают сладкосливочное и кислосливочное с содержанием 81,5 % жира, 16 % влаги, 1,5 % соли.

Сладкосливочное масло вырабатывают из свежих (слабких) пастеризованных сливок без добавления заквасок молочнокислых бактерий.

Отличительными операциями в технологии кислосливочного масла являются приготовление бактериальной закваски и сквашивание сливок с применением чистых культур молочнокислых бактерий. Даже в случае использования сливок пониженного качества применение лактобактерий позволяет вырабатывать масло высокого качества, а в сочетании с поваренной солью способствует лучшей сохранности масла.

Молочный жир для микроорганизмов, не обладающих липолитической активностью, не является питательной средой, потому что они не способны его разлагать и усваивать. Лишь флюоресцирующие бактерии, плесени, микрококки и некоторые другие микробы, обладающие липолитическими свойствами, способны усваивать жир после его гидролиза на глицерин и жирные кислоты. Остальные микроорганизмы проявляют свою жизнедеятельность в плазме масла, которая представляет собой водный раствор белков, молочного сахара, молочной кислоты (в кислосливочном масле), солей и других питательных веществ.

Плазма составляет небольшую часть масла (около 15 %) и распределена в нем в виде капель микроскопической величины (от 1 до 10 мкм). Таких капель в 1 г масла содержится несколько миллиардов. Известно, что чем больше мелких разобитных капель, т. е. чем лучше вработана влага в масло, тем медленнее развиваются микроорганизмы и тем выше стойкость масла.

В каплях плазмы размером менее 10 мкм бактерии не размножаются. Задержка развития бактерий в мелких каплях плазмы обусловлена тем, что вода в них в большей степени связана с веществами оболочек жировых шариков и не может быть использована микроорганизмами. Поэтому особенно неблагоприятной средой для развития микроорганизмов являются чистый молочный жир и топленое масло.

В результате промывки масла уменьшается концентрация питательных веществ в плазме, что способствует снижению интенсивности размножения микроорганизмов.

В целом же в производстве масла микроорганизмы играют второстепенную роль. Сладкосливочное масло получают без участия микроорганизмов, и развитие любых микробов в нем приводит к появлению пороков и ухудшению качества. В кисломолочном масле помимо молочнокислых бактерий могут развиваться и посторонние микроорганизмы, вызывающие появление порчи продукта. Топленое масло является неблагоприятной средой для развития микробов.

17.2. ИСТОЧНИКИ МИКРОФЛОРЫ МАСЛА

Микроорганизмы могут попадать в масло вместе со сливками, с поверхности оборудования и аппаратуры, из воды, соли, воздуха, упаковочного материала, вкусовых наполнителей, а для кисломолочного масла основным источником микрофлоры является закваска.

Сливки - наиболее обильный источник различной микрофлоры. Они могут содержать микрококки, кишечные палочки, молочнокислые, протеолитические, психротрофные бактерии. Количество микробов может колебаться от нескольких тысяч до десятков миллионов в 1 см^3 и зависит от санитарных условий получения молока, сливок и их выдержки при положительной температуре. В сливках, выдержанных при 10°C в течение 2 сут, количество бактерий увеличивается в 100 раз и достигает 10^8 клеток в 1 см^3 .

В сливках после пастеризации преобладают спорообразующие гнилостные и маслянокислые бактерии.

Оборудование и аппаратура при неудовлетворительной мойке и дезинфекции могут быть источником повторного обсеменения пастеризованных сливок бактериями, дрожжами и плесенями. Количество микрофлоры зависит от санитарных условий на предприятии.

Од а, используемая для промывки масла, может содержать бактерии группы кишечных палочек, флюоресцирующие и гнилостные бактерии, которые при попадании в масло снижают его качество при хранении. В соответствии с ГОСТом в 1 см^3 воды допускается не более 100 КОЕ бактерий, коли-титр не менее 300. Липолитические и протеолитические бактерий должно быть не более 5 клеток в 1 см^3 . Воду, не отвечающую этим требованиям, пастеризуют или хлорируют.

С о л ь, хорошо очищенная, содержит в 1 г единицы или десятки клеток бактерий, чаще микрококков и спорных палочек. В соли низкого качества имеется большое количество бактерий, меньше дрожжей и плесеней. В 1 г соли должно содержаться не более 100 клеток микроорганизмов. Для уничтожения микробов соль прокаливают при

температуре $150-180^\circ \text{C}$ в течение 1 ч, а для уничтожения плесеней растворяют в кипящей воде.

В о з д у х производственных помещений может служить источником обсеменения масла микрококками, флюоресцирующими, спорообразующими и бесспорными гнилостными бактериями, дрожжами и плесенями. Наиболее нежелательна обсемененность воздуха плесенями, обладающими липолитической активностью.

У п а к о в о ч н ы й м а т е р и а л (пергамент, кашированная фольга и др.) может быть источником обсеменения поверхности масла плесенями, дрожжами и бактериями. В соответствии с инструкциями по микробиологическому контролю на 100 см^2 поверхности пергамента не должно быть кишечных палочек и более 5 колоний плесеней. На поверхности фольги спор плесеней должно быть в два раза меньше, чем на пергаменте.

В к у с о в ы е н а п о л н и т е л и (кофе, какао, сахар) и белковые добавки (сухая или сгущенная пахта, сухое обезжиренное молоко), используемые в маслodelии, содержат микрофлору в разных количествах. Наиболее часто выявляют молочнокислые, протеолитические бактерии, дрожжи, бактерии группы кишечных палочек.

З а к в а с к а является источником молочнокислых стрептококков. В 1 см^3 заквашенных и созревших сливок при производстве кисломолочного масла содержатся сотни миллионов клеток этих микроорганизмов.

17.3. БАКТЕРИАЛЬНАЯ ЗАКВАСКА ДЛЯ КИСЛОМОЛОЧНОГО МАСЛА И БИОЛОГИЧЕСКОЕ СКВАШИВАНИЕ СЛИВОК

Молочнокислые бактерии закваски сбраживают молочный сахар и лимонную кислоту с образованием молочной кислоты, диацетила, летучих жирных кислот и эфиров, которые обеспечивают выраженный кисломолочный вкус и приятный запах кисломолочного масла и создают в нем неблагоприятные условия для развития посторонней микрофлоры.

Закваска включает кислотообразующие молочнокислые стрептококки *Lac. lactis*, *Lac. cremoris*, а также ароматобразующий *Lac. diacetylactis* с хорошей способностью к образованию молочной кислоты и диацетила.

Молочнокислые стрептококки закваски должны обеспечить хорошие вкус и запах, плотный молочный густок, должны иметь хорошую сочетаемость между собой и устойчивость к смеси различных фагов молочнокислых стрептококков.

Производственную закваску на предприятии готовят из сухой или жидкой закваски в основном трехпересадочным способом, а также из

сухого бактериального концентрата беспересадочным или ускоренным способом.

Молоко для закваски стерилизуют при температуре 121 °С в течение 15 мин или пастеризуют при температуре 95 °С в течение 1 ч. Для приготовления вторичной и производственной заквасок, а также для активизации сухого бактериального концентрата при выработке закваски ускоренным способом молоко пастеризуют при температуре 95 °С 30-45 мин. Молоко после пастеризации нельзя переливать в другую посуду во избежание повторного его обсеменения микроорганизмами.

Заквашивание и сквашивание молока проводят по специальным режимам, приведенным в табл. 40.

40. Режимы приготовления заквасок

Закваска	Способ приготовления закваски	Получаемая закваска	Температура сквашивания, °С	Количество вносимой закваски (концентрация)	Сквашивание (выдержка)	
					Температура, °С	Продолжительность, ч
Сухая	Трехпересадочный	Материнская	30	1 г сухой закваски на 2 л молока	28-30	14-20
		Вторичная (промежуточная)	28-30	5 % материнской закваски	28-30	6-8
		Производственная (третья)	28-30	5 % вторичной закваски	28-30	6-8
Жидкая	Трехпересадочный	Материнская	26	2 % жидкой молочной (лабораторной) закваски	25	14-20
		Вторичная (промежуточная)	24	1 % материнской закваски	24	14-18
		Производственная (третья)	23	1 % вторичной закваски	23	14-18
Сухой бактериальный концентрат	Беспересадочный	Производственная	25-26	1 г сухого концентрата на 100 л молока	25-26	18-19
		Ускоренный	30	1 г концентрата на 1 л молока	30	2-3
		Производственная	25-26	1-2 % активизированного концентрата	25-26	18-19

Для накопления аромата первичную закваску после сквашивания выдерживают при температуре 16 °С в течение 2-4 ч. Качество закваски (материнской и производственной) контролируют по активности сквашивания, микроскопическому препарату (бактериальная чистота), наличию кишечных палочек, ароматобразующих бактерий (по образованию диоксида углерода, диацетила и ацетона), а также органолептическим свойствам (вкусу, запаху).

Кислотность заквасок должна быть в пределах 90-105 Т, в микроскопическом препарате - только клетки молочнокислых стрептококков, расположенных в виде диплококков и цепочек разной длины. Бактерии группы кишечных палочек должны отсутствовать в 10 см³ закваски и активизированного концентрата.

Для биологического сквашивания сливок производственную закваску вносят в охлажденные пастеризованные сливки в объеме 2-5 % и оставляют при температуре 16-20 °С на 4-6 ч.

Затем сливки охлаждают до 4-7 °С и выдерживают 5-7 ч. Общая продолжительность подготовки сливок к сбиванию составляет 15-17 ч. Такой режим целесообразен при переработке сливок с повышенной исходной бактериальной обсемененностью, так как он ускоряет развитие молочнокислых бактерий, подавляющих постороннюю микрофлору.

В промышленности распространен метод сквашивания сливок при средних температурах (14-17°С). Количество вносимой при этом бактериальной закваски составляет 5-7 %, продолжительность сквашивания - 12-16 ч. Метод обеспечивает повышенную по сравнению с температурой 16-20 °С степень отвердения жира и получение масла с хорошим вкусом, запахом и консистенцией.

Биологическое сквашивание сливок при пониженной температуре (10-12 °С) чрезмерно увеличивает выдержку и требует значительных количеств закваски (10 % и более).

Используется и так называемое краткое сквашивание сливок. При нем закваску вносят в сливки после физического созревания в таком количестве, чтобы сразу достигнуть требуемой кислотности.

Основным показателем биологического созревания сливок, характеризующим степень их сквашивания независимо от применяемого метода подготовки, является кислотность плазмы.

Оптимальной для получения кисломолочного масла с выраженным типичным вкусом и ароматом является кислотность плазмы 55-65 Т. В случае выработки кисломолочного масла для длительного хранения кислотность плазмы сквашенных сливок не должна превышать 50 Т. При производстве соленого кисломолочного масла кислотность плазмы сливок не должна превышать 40 Т.

Традиционная технология приготовления кисломолочного масла из биологически сквашенных сливок требует дополнительных трудовых

затрат. Кроме того, с пахтой и промывной водой (при промывке масляного зерна) теряется до 90-95 % вкусовых и ароматических веществ сливок. В связи с этим предложен метод выработки кисломолочного масла из несквашенных сливок путем внесения молочнокислой закваски в пласта в процессе его механической обработки.

Этот метод улучшает аромат и повышает длительность хранения масла, поскольку активные расы молочнокислых бактерий, распределяясь в крупных каплях плазмы масла, развиваются в первые дни хранения и подавляют развитие посторонней микрофлоры. В результате обогащения пласты закваской масло приобретает выраженные кисломолочные вкусы и запахи.

17.4. ФОРМИРОВАНИЕ ЗАПАХА МАСЛА

Кисломолочное масло отличается специфическими вкусом и запахом, обусловленными наличием молочной кислоты, диацетила, летучих кислот, эфиров и спиртов, образующихся в результате жизнедеятельности молочнокислых микроорганизмов, вносимых с закваской.

Обогащение кисломолочного масла ароматическими веществами может достигнуто различными способами.

Наиболее простой и доступный - биологический способ. Ароматические вещества образуются в результате жизнедеятельности молочнокислых ароматобразующих микроорганизмов *Lac. diacetylactis* и др., вводимых в состав бактериальной закваски.

Химический способ заключается в применении ряда химических препаратов (молочной кислоты, диацетила и др.), вводимых в сливки или масло в процессе обработки.

Для получения более ароматной закваски рекомендуют вносить в молоко лимонную кислоту и ее соли. Содержание лимонной кислоты в молоке составляет в среднем 0,18 %. Особенно необходимо вносить цитраты в зимний период, когда их содержание в молоке резко понижено. Из лимонной кислоты молочнокислые бактерии вырабатывают ароматическое вещество - диацетил.

Аэрация (перемешивание) закваски также способствует увеличению содержания диацетила в 2-3 раза, что объясняется усилением окислительных процессов, понижением окислительно-восстановительного потенциала, в результате чего ускоряется переход молочной кислоты в пировиноградную и образование диацетила. В связи с этим количество ароматических веществ зависит от степени сквашивания сливок. Чем выше кислотность, тем больше накапливается ароматических веществ (до определенного предела кислотности). Оптимальные условия накопления диацетила в закваске: рН 4,4-4,5, титруемая кислотность 80 °Т, температура сквашивания 25 °С.

Для получения на поточных линиях кисломолочного масла с выраженным запахом рекомендуют использовать комбинированные закваски молочнокислых стрептококков с молочнокислыми палочками *Lbm. helveticum*.

При сбивании сливок одна часть диацетила переходит в пахту, а другая концентрируется в плазме масла. Поэтому при промывании масла водой количество диацетила в нем уменьшается. В 100 г кисломолочного масла с ярко выраженным запахом содержится 0,1-0,5 см³ диацетила, 18-30 мг летучих кислот (муравьиной, уксусной, пропионовой, масляной), до 10 мг этилового спирта. При хранении масла наблюдается разрушение диацетила, которое более интенсивно проходит при высоких температурах. В связи с этим масло необходимо хранить при низкой температуре.

Разработаны специальные ароматизаторы масла. Так, ароматизацию кисломолочного масла предложено осуществлять добавкой ароматических и вкусовых веществ состоящей из специфического ароматизатора, 40 % пищевой молочной кислоты, уксуса пищевой спиртового 9 %-ного.

Для ароматизации сладкомолочного масла используют специальную бактериальную ароматическую закваску. Масло при этом имеет вкус сладкомолочного, а запах - присущий кисломолочному.

Промышленного распространения технология ароматизированного масла не получила.

17.5. СОСТАВ МИКРОФЛОРЫ И ЕГО ИЗМЕНЕНИЕ В ПРОЦЕССЕ ХРАНЕНИЯ МАСЛА

Объем первичной микрофлоры масла зависит от санитарно-гигиенических условий его производства и качества сливок, а также от способа выработки масла.

В масле, вырабатываемом из высокожирных сливок на поточных линиях и методом сбивания в маслоизготовителях непрерывного действия, содержится минимальное количество микроорганизмов. Значительно больше микробов находится в масле, вырабатываемом методом сбивания в маслоизготовителях периодического действия.

Микрофлора сладкомолочного масла состоит из остаточной микрофлоры сливок после пастеризации и микроорганизмов, попадающих в масло в процессе выработки. При этом микрофлора представлена молочнокислыми, спорообразующими протеолитическими бактериями, дрожжами, плесеньями, психротрофными бактериями, особенно из рода *Pseudomonas* и БГКП.

Общее количество микроорганизмов может колебаться в свежем масле от нескольких тысяч до 1 млн клеток в 1 г.

Микрофлора кисломолочного масла состоит в основном из заквасочных молочнокислых бактерий. В масле с длительным сквашиванием сливок содержание молочнокислых бактерий больше, чем при использовании сливок краткого сквашивания.

Скорость изменения микрофлоры в масле зависит от вида масла, содержания в нем плазмы и ее дисперсности в монолите, температуры хранения и т. п.

При хранении сладкосливочного масла в условиях высокой температуры (15 °С) возрастает в основном содержание молочнокислых бактерий, максимальное количество которых достигается через 5 дней и составляет десятки миллионов клеток в 1 г, после чего наблюдается их уменьшение.

При хранении масла при низких положительных температурах (5 °С) увеличение количества микроорганизмов в масле происходит в основном за счет протеолитических спорообразующих и бесспорных бактерий, микрококков, дрожжей и плесеней.

В сладкосливочном масле, охлажденном после выработки до отрицательной температуры, количество микробов при хранении не повышается, тогда как в масле той же выработки, но охлажденном после трех дней хранения при 6-8 °С, количество микробов повышается в несколько сотен раз по сравнению с первоначальным.

При температуре ниже минус 11 °С микробиологические процессы в масле прекращаются. Поэтому сладкосливочное масло после выработки направляют в холодильник на хранение при температуре от -15 до -18 °С.

В кисломолочном масле независимо от метода производства и температуры хранения происходит отмирание молочнокислых бактерий. При температуре хранения 15 °С микрофлора отмирает значительно быстрее, чем при более низких температурах. В кисломолочном масле, хранившемся при температуре 0-5 °С, количество молочнокислых бактерий через 3 мес хранения снижается на 60 %, а через 5 мес составляет 7 % количества в свежем масле. При этом ароматообразующие стрептококки отмирают несколько быстрее, чем *Lac. lactis* и *Lac. cremoris*. Количество дрожжей через 1 мес. хранения масла при 0-5 °С несколько увеличивается, а в последующий период постепенно снижается. Количество бактерий группы кишечных палочек через 3 мес сохраняется примерно на уровне свежего масла, а через 5 мес их практически не обнаруживают в 1 г масла.

При хранении кисломолочного масла при температуре от -12 до -15 °С через 6-9 мес отмирает 95-99 % молочнокислой микрофлоры. Уменьшается также содержание бактерий группы кишечных палочек, протеолитических бактерий, дрожжей, плесеней.

После двухлетнего хранения при отрицательных температурах в масле обоих видов общее количество микроорганизмов, количество

дрожжей и плесени практически равно нулю.

17.6. ПОРОКИ МАСЛА

Под пороками масла понимают отклонение его органолептических показателей от предусмотренных стандартом. Пороки могут быть обнаружены и в свежеработанном масле, и в масле, находящемся на хранении.

Пороки масла, обусловленные развитием микроорганизмов, чаще возникают во время его хранения. При этом микробиологическая порча масла происходит в основном вследствие порчи плазмы, являющейся хорошей средой для развития микрофлоры. К порокам микробиологического происхождения относят кислый, сырный, дрожжевой вкус, нечистые вкус и запах, прогорклый, горький вкус, плесневение и поверхностное окисление масла (штафф).

К и с л ы й вкус (для сладкосливочного масла) появляется при использовании сырья повышенной кислотности и хранения масла при температуре выше 10 °С, что обуславливает развитие молочнокислых бактерий. Для сладкосливочного масла излишне кислый вкус отмечается при кислотности плазмы выше 23 °Т, для кисломолочного масла - выше 55 °Т.

Нечистые (затхлые, гниlostные) вкус и запах чаще встречаются в сладкосливочном масле. Причиной является развитие в масле посторонних протеолитических микроорганизмов, которые расщепляют белки плазмы до аминокислот с отделением от них углекислого газа и образованием аминов, сернистого водорода и других промежуточных продуктов. При глубоком распаде белков плазмы ощущаются сырный и гниlostный привкусы. Начальной стадии изменения белков плазмы соответствует нечистый вкус.

Развитию пороков способствуют длительное хранение сливок на заводе до начала их переработки, недостаточно высокая температура пастеризации, плохое диспергирование влаги в масле, низкий санитарно-гигиенический уровень производства.

С ы р н ы й вкус вызывается протеолитическими бактериями и плесенями при разложении белка и жира. Он наблюдается только в старом масле. Степень выраженности сырного привкуса зависит от количества Н-валерьяновой кислоты и других летучих кислот с низкой молекулярной массой. Сырный привкус развивается во время хранения масла при положительных температурах.

Д р о ж ж е в о й вкус образуется в результате сбраживания лактозы дрожжами родов *Torula*, *Saccharomyces* и др., а также при разложении аминокислот с образованием спиртов. Характерен для кисломолочного несоленого масла.

Прогорклый вкус возникает при гидролизе молочного жира липазой флюоресцирующих бактерий, плесеней и дрожжей. Порок чаще встречается в несоленом масле. Процесс разложения жира протекает в две стадии. Вначале идет гидролиз жира с образованием масляной, капроновой и каприловой кислот, которые придают маслу прогорклый вкус и повышают кислотность масла. Затем происходит окисление жирных кислот с образованием кетокислот, кетонов, альдегидов, эфиров и других веществ, усиливающих выраженность порока.

Для предупреждения порока необходимо не допускать попадания в сливки и масло посторонней микрофлоры; контролировать температуру пастеризации сливок, которая должна быть не ниже 85 °С; хлорировать воду, используемую для промывки масла, оборудования и инвентаря; быстро охлаждать масло до минусовой температуры.

Горький вкус обусловлен разложением белков плазмы до пептонов при развитии протейных бактерий и особенно флюоресцирующих палочек, обладающих протейными и липолитическими свойствами. Причиной данного порока могут быть также некоторые виды дрожжей и плесеней. При более глубоком разложении белков появляются сырный и гнилостный привкусы. Горький вкус появляется при хранении масла в холодильниках при низких положительных температурах.

Для предупреждения порока необходимо проводить тепловую обработку сливок при температуре не ниже 85-90 °С и строго соблюдать санитарно-гигиенические режимы производства.

Плесневение масла обусловлено развитием кистевидной, молочной, гроздевидной и других плесеней на поверхности масла и воздушных прослоек. Порок наблюдается при выработке масла из непастеризованных сливок, при неудовлетворительном распределении плазмы в монолите и плохой набивке масла. При развитии плесеней в масле возникают также пороки вкуса и запаха. Рост плесеней в масле значительно замедляется при 0 °С, а при температуре -11 °С их развитие прекращается. При концентрации соли в масле 1,5-2 % рост плесени замедляется, а при концентрации 4 % прекращается полностью.

Для предупреждения плесневения масла необходимо предупреждать обсеменение сырья и продукта плесенью, соблюдать санитарно-гигиенические и технологические условия производства и хранения масла. Необходимо строго соблюдать режим тепловой обработки сливок, правильно обрабатывать масло, плотно набивать монолит, быстро и глубоко охлаждать его, хранить продукт при низких температурах и относительно низкой влажности воздуха.

Штафф (поверхностное окисление масла) проявляется образованием на монолите полупрозрачного слоя, имеющего специфический запах и неприятный горьковатый, а иногда приторно-

едкий вкус, который расценивают как гнилостный или затхлый. Окраска масла в слое штаффа значительно темнее остальной массы продукта.

Штафф вызывается полимеризацией глицеридов и окислением молочного жира при развитии психротрофных липолитических (флюоресцирующих палочек и других бактерий рода *Pseudomonas*), протейных бактерий и плесеней. При этом катализаторами являются солнечный свет, высокая жир-, влаго- и воздухопроницаемость упаковочных материалов.

Появление порока можно предупредить улучшением распределения влаги в монолите масла, уменьшением количества воздуха в масле, снижением проницаемости используемых упаковочных материалов, герметизацией упаковки, хранением масла при отрицательных температурах. Так, при использовании алюминиевой фольги, кашированного пергамента, а также полимерных материалов штафф не образуется.

17.7. ПОВЫШЕНИЕ СТОЙКОСТИ МАСЛА

Под стойкостью подразумевают свойство масла длительное время сохранять вкусовые качества с минимальными изменениями. Повышение стойкости масла достигается соблюдением технологических режимов производства, а также введением биологически активных веществ и антиокислителей.

Мероприятия, повышающие качество и стойкость масла, должны быть направлены в первую очередь на ограничение попадания в масло посторонней микрофлоры и подавление микробиологических процессов в нем. Для этого необходимо обеспечить хорошие санитарно-гигиенические условия производства, строгое соблюдение технологии, применение активной закваски молочнокислых бактерий и культур дрожжей, содержание хлорида натрия, охлаждение масла до отрицательной температуры и др.

Условия, неблагоприятные для развития микроорганизмов в масле, создаются также промывкой масляного зерна. Во время промывки с поверхности питательного зерна удаляется пахта и тем самым уменьшается содержание питательных веществ, что способствует повышению стойкости масла при хранении.

К биологическим способам повышения стойкости масла относятся использование заквасочных молочнокислых бактерий и применение видов дрожжей, обладающих ингибирующим действием против плесеней.

При выработке кисломолочного масла молочнокислые бактерии задерживают развитие посторонней микрофлоры, что положительно сказывается при хранении в условиях положительной температуры. Встречаются отдельные штаммы молочнокислых стрептококков и

палочек, которые наряду с образованием молочной кислоты подавляют кишечные палочки и гнилостные бактерии, угнетают развитие других микроорганизмов в результате продуцирования антибиотиков.

Молочная кислота, накапливаясь в плазме сливок, влияет не только на содержание ароматических веществ в масле, но и на его стойкость при хранении. Поэтому, чтобы выработать масло с характерным для него вкусом, а также стойкое при хранении (при положительных температурах), сливки следует сквашивать до высокой кислотности (60 °Т).

Однако молочная кислота не задерживает развитие плесеней, для подавления которых в маслоделии используют дрожжи родов *Torulopsis*, *Candida*. Выделяющийся при развитии дрожжей углекислый газ ингибирует размножение плесеней. Применяемые дрожжи не сбраживают молочный сахар, не разлагают в заметной степени белки и жир, являются антагонистами не только в отношении к плесеням, но и к протеолитическим бактериям и не снижают вкусовых качеств масла. Дрожжами обогащают соленое и несоленое кисломолочное масло из расчета 100-150 тыс. клеток на 1 г масла. Минимальное количество дрожжей в 1 г масла должно быть не менее 50 тыс. Контроль масла на содержание дрожжей (наличие и равномерность распределения) проводят не позднее чем через 10 дней после выработки, не реже 1 раза в месяц.

Действие природных и синтетических антиокислителей состоит в том, что они, взаимодействуя со свободными радикалами в цепи окисления, разрывают цепь реакции и на некоторый период задерживают процесс самоокисления жира. При этом сам антиокислитель окисляется до неактивных соединений.

Природными (естественными) антиокислителями являются сульфидрильные соединения белков молока, токоферол (витамины Е), аскорбиновая кислота, фосфолипиды, некоторые аминокислоты (цистин, триптофан, лейцин, лизин) и др. Наиболее активным из них является токоферол.

Для предупреждения плесневения масла в качестве консерванта используют сорбиновую кислоту в количестве 0,01 %, подавляющую развитие плесеней и дрожжей.

Содержание поваренной соли повышает стойкость масла. Растворяясь в плазме масла, соль повышает осмотическое давление, вследствие чего прекращается развитие микрофлоры (микробная клетка подвергается плазмолизу). При хранении масла в условиях положительных температур наиболее стойким будет кисломолочное, а также сладкомолочное соленое масло (содержание соли не более 1,5 %).

Длительному сохранению качества масла способствуют минимальное содержание микроорганизмов и низкая (отрицательная) температура хранения. Если масло выработано из сливок низкого

качества со значительной бактериальной обсемененностью, то уже в свежем состоянии оно может иметь пороки вкуса, которые усиливаются в процессе хранения. Для сохранения качества масла проводят быстрое и глубокое охлаждение до -18(-20)°С. Охлаждение масла уже после накопления в нем микрофлоры не обеспечивает сохранения его качества, поскольку попадание в продукт ферменты микроорганизмов обуславливают образование пороков.

На качество масла и его стойкость большое влияние оказывают количество и характер распределения воды в масле. Последний зависит от обработки масла, так как только масло с тонкодиспергированной влагой, малодоступной для микроорганизмов, обладает большой стойкостью против плесневения и другой порчи.

17.8. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ПРОИЗВОДСТВА МАСЛА

На маслозаводах проводят микробиологический контроль поступающих молока, сливок, сливок в процессе производства масла, закваски, вспомогательных материалов и готовой продукции, а также контроль санитарно-гигиенических условий производства в цехах, складах, маслохранилищах, заквасочной.

Поступающее сырье (молоко, сливки) контролируют на общую бактериальную обсемененность по редуктатной пробе.

В сливках после пастеризации определяют общую бактериальную обсемененность и БГКП не реже одного раза в месяц.

Общее количество бактерий *после пастеризатора*: в 1 см³ сливок хорошего качества допускается до 1 000, а сливок удовлетворительного качества до 5 000 колониеобразующих единиц. Бактерии группы кишечных палочек должны отсутствовать в 10 см³.

В сливках *после охладителя* (метод сбивания), *в сливках из-под сепаратора* (метод преобразования высокожирных сливок) определяют общее количество бактерий и БГКП не реже одного раза в месяц. Общее количество бактерий в 1 см³ пастеризованных сливок хорошего качества может достигать до 5 тыс., удовлетворительного качества – до 75 тыс., БГКП должны отсутствовать в 1 см³.

В пастеризованных сливках хорошего качества *перед сбиванием и высокожирных сливок после нормализации* БГКП не должны обнаруживаться в 1 см³; сливки с показателем отсутствия БГКП в 0,1 см³ считаются удовлетворительного качества, а с показателем отсутствия БГКП в 0,01 см³ и ниже - неудовлетворительного.

По результатам микробиологического контроля по ходу технологического процесса производства масла выявляют места с высокой степенью обсеменения технически вредной микрофлорой и принимают меры к ее ограничению.

В кисломолочном масле (в готовой продукции) 2 раза в месяц определяют наличие кишечных палочек, патогенных бактерий, а в сладкомолочном, кроме того, общее количество микроорганизмов и по возможности количество протеолитических бактерий, дрожжей и плесени.

Качество масла оценивают согласно показателям, приведенным в табл. 41. При проведении контроля санитарно-гигиенического состояния производства масла определяют микробиологическую чистоту оборудования, трубопроводов, инвентаря, фляг, ушатов, деревянной тары, рук работников, воздуха, воды, пергаментной, кашированной фольги, клепки, соли.

41. Микробиологические показатели оценки сливочного масла

Масло	Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, КОЕ в 1 г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются		Примечание
		БКП	патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы	
Масло вологодское	1×10^4	0,1	25	
Масло сладкомолочное и солёное любительское и крестьянское	1×10^5	0,01	25	
Масло кисломолочное любительское и крестьянское		0,01	25	
Масло шоколадное	1×10^5	0,01	25	
Масло сливочное бутербродное	5×10^5	0,001	25	
Масло коровье топленое	1×10^5	1,0	25	Плесени 200 КОЕ/г, не более

МИКРОБИОЛОГИЯ СЫРА

Сыр получают из молока путем ферментативного свертывания белков, выделения сырной массы с последующей обработкой и созреванием.

Пищевая ценность сыра обусловлена высоким содержанием белка и жира, наличием незаменимых аминокислот, витаминов, солей кальция и фосфора, необходимых для нормального развития человека. Значительная часть белка в сыре находится в растворимой форме, поэтому он хорошо усваивается организмом. Энергетическая ценность сыра составляет от 10 до 18 кДж.

Ассортимент сыров в нашей стране насчитывает более 150 наименований. Вырабатывают сыры твердые, мягкие, кисломолочные рассольные и плавленые.

Твердые, или прессованные, сыры (швейцарский, советский, российский, голландский и др.) содержат в сухом веществе от 20 до 50 % жира, от 42 до 55 % влаги, от 1 до 3,5 % соли. Сырное тесто формируется и прессуется для удаления сыворотки. Созревают сыры от 1 до 6 мес.

Мягкие, или непрессованные сыры (рокфор, пятигорский, останкинский, русский камамбер, адыгейский, любительский и др.) вырабатывают с содержанием в сухом веществе от 40 до 50 % жира, от 46 до 80 % влаги, от 1 до 5 % соли. Сырное тесто не прессуется, влага уходит из него естественным путем. Сыры не бывают больших размеров, иначе сырное тесто слишком спрессуется под давлением собственной тяжести. Часто сыры производят с добавлением особых видов плесени, которые придают этим сырам пряный, аминный запах и образуют естественную съедобную корочку. Иногда их готовят с применением овечьего или козьего молока. Продолжительность созревания от 7 до 60 сут или без созревания.

Кисломолочные, или свежие, сыры (сливочный, чайный, геленджикский). После заквашивания и введения кисломолочных бактерий сырное тесто не подвергают никакой дополнительной обработке, но иногда смешивают с пряностями, травами или измельченными орехами. Эти сыры имеют пастообразную консистенцию. Часто готовят их из овечьего или козьего молока.

Рассольные сыры (грузинский, осетинский, чанах, брынза, сулугуни и др.) производят с содержанием в сухом веществе от 40 до 45% жира, от 35 до 53 % влаги, от 1 до 7 % соли. Отжимают и прессуют, некоторые раскатывают и прессуют слоями. Затем выдерживают в рассоле, после чего можно подсушивать или коптить. Как правило,

готовят их из овечьего молока. Сулугуни в процессе приготовления подогревают и он становится волокнистым. Продолжительность созревания от 1 до 60 сут.

Плавленые сыры (советский, голландский, российский, «Янтарь», «Дружба», «Волна» и др.) вырабатывают с содержанием в сухом веществе от 20 до 55 % жира, от 40 до 52 % влаги, от 2 до 3 % соли. Сладкие плавленые сыры содержат до 16 % сахара.

Для производства плавленых сыров используют сычужные сыры, творог, сливочное масло, различные наполнители и специи.

18.1. ЗНАЧЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В СЫРОДЕЛИИ

Формирование каждого вида сыра обуславливается качественным и количественным составом микрофлоры.

В формировании твердых сыров принимают участие ферменты молочнокислых стрептококков и палочек, а также пропионовых кислот бактерий. Эти микроорганизмы обладают протеолитическими и липолитическими свойствами.

Молочнокислые бактерии благодаря образованию молочной кислоты, медленному и ограниченному расщеплению белка, а также минимальному расщеплению жира значительно влияют на консистенцию, вкус и запах сыра. Последние обусловлены наличием свободных жирных кислот, молочной кислоты, диацетила, метилкетонов, альдегидов, аммиака и др.

Пропионовые кислоты образуют витамин В₁₂, пропионовую кислоту, пропионат кальция и пролин, что способствует улучшению вкуса сыра.

На поверхности некоторых мягких сыров с желто-коричневой, слизью обнаруживают большие скопления микроорганизмов. Наряду с дрожжами в слизи находятся пигментобразующие бактерии, важнейшими представителями которых является *Brevibacterium linens*. Кроме того, при выработке этих сыров используют плесени рода *Penicillium* как на корке, так и внутри сыра.

За рубежом в качестве заквасочных микроорганизмов применяют некоторые штаммы энтерококков, которые расщепляют белок, освобождая определенные аминокислоты и влияя таким образом на качественный состав свободных аминокислот в сыре. Однако имеются данные о том, что энтерококки могут вызывать пищевые токсикоинфекции. Они являются также возбудителями некоторых пороков сыра. В связи с этим заквасочные штаммы следует проверять на токсинообразование.

Технически вредными микроорганизмами в сыроделии являются маслянокислые бактерии, кишечные и флюоресцирующие палочки, плесени и гнилостные микроорганизмы.

18.2. ИСТОЧНИКИ ПЕРВИЧНОЙ МИКРОФЛОРЫ СЫРА

Микрофлора сыра складывается из микрофлоры молока, сычужного порошка и закваски, приготовленной из чистых культур микроорганизмов.

Качество сыра определяется микробиологическим составом молока. На образование вкуса влияет не только микрофлора закваски, но и посторонние микроорганизмы. Ферменты этих бактерий часто выдерживают режимы пастеризации и влияют в дальнейшем на созревание сыра. В связи с этим нельзя получить сыр высокого качества, если в исходном молоке количество бактерий превышает 10^6-10^7 в 1 см³.

Сычужный порошок содержит преимущественно споры гнилостных бактерий. Общая микробная обсемененность его не превышает 100 тыс. клеток в 1 г, что в расчете на 1 см³ заквашенного молока составляет не более 2-3 клеток, поэтому на микрофлору сыра эти микроорганизмы действия не оказывают.

Бактериальная закваска при производстве сыров является главным источником микрофлоры сыра, так как количество заквасочных микроорганизмов, вносимых с закваской, достигает десятков миллионов клеток в 1 см³ молока.

При использовании пастеризованного молока практически единственным источником микрофлоры, участвующей в созревании сыра, является закваска. Роль других источников попадания микроорганизмов в сыр - воздуха, посуды и инструментов - незначительна.

18.3. СЫРОПРИГОДНОСТЬ МОЛОКА

Факторы, определяющие сыропригодность. Под сыропригодностью понимают способность молока к свертыванию под действием сычужного фермента, обработке сырной массы и поддержанию жизнедеятельности микроорганизмов, необходимых для производства и созревания сыра.

Пригодность молока для производства сыра определяют по органолептическим, физико-химическим показателям, а также по составу микрофлоры. Молоко признается сыропригодным, если имеет хорошие вкус, запах, цвет и консистенцию, нормальные содержание и свойства составных частей, в частности белка, жира, солей, полезную для выработки сыра микрофлору. Органолептические свойства молока очень важны для сыроделия, так как пороки его вкуса, цвета и запаха вызывают соответствующие пороки и сыра.

Биологическую ценность молока обуславливают, с одной стороны, вещества, стимулирующие развитие молочнокислых бактерий, - витамины, азотистые вещества, продукты автолиза бактерий, с другой -

вещества, задерживающие развитие микроорганизмов в молоке, - ингибиторы. Сыропригодное молоко не должно содержать патогенных микробов, бактерий группы кишечных палочек и маслянокислых бактерий. Его получают от здоровых коров, находящихся на нормированном кормлении.

Одним из главных методов определения сыропригодности молока является проба на скорость свертывания его сычужным ферментом (сычужная проба). К 10 см³ молока добавляют 2 см³ 0,03%-ного раствора сычужного фермента и выдерживают при 35 °С. Молоко первого типа свертывается в период до 10 мин, второго - через 10-15 мин, третьего - свыше 15 мин. Молоко третьего типа наименее пригодно для производства сыра.

Продолжительность свертывания молока зависит от многих факторов: температуры, лактационного периода, корма и режима кормления, породы коров, времени года и т. д. Молоко, которое плохо свертывается под действием сычужного фермента, называют сычужноявным. Из такого молока образуется непрочный сгусток, сырная масса обезживается медленно, процесс выработки сыра удлинится, микрофлора развивается плохо и сыр получается низкого качества.

Одним из наиболее важных условий, определяющих сыропригодность молока, является наличие в нем ингибиторов. Наряду с собственно молочными ингибиторами (факторами бактерицидности молока) в молоке могут присутствовать различные антибиотики и другие лекарственные препараты, применяемые для лечения животных, остатки моющих и дезинфицирующих средств, консервирующие средства и бактериофаги. Ингибиторы могут содержаться в кормовых травах (в виде пестицидов и остаточных количеств удобрений) или появляться в результате обмена веществ микроорганизмов.

При использовании молока, содержащего ингибиторы, применяемая закваска развивается неудовлетворительно, кислотообразование и образование ароматических веществ тормозится или полностью прекращается. При этом продолжается развитие грамотрицательной микрофлоры молока, которая становится доминирующей, сыр получается с ранним вспучиванием, трещинами, образованием пористого теста с гнилым привкусом. Так, при содержании в молоке пеницилина больше 0,018 МЕ/см³ происходит развитие более устойчивых к антибиотикам бактерий группы кишечных палочек, что приводит к вспучиванию выработанного сыра через 36-48 ч.

Присутствие моющих средств в молоке в концентрации от 0,025 до 0,6 г/дм³ приводит к невозможности его использования для производства сыра и кисломолочных продуктов.

Молозиво также оказывает ингибирующее воздействие, и тормозит размножение молочнокислых бактерий. В связи с этим оно не должно

содержаться в сборном молоке. Молоко разрешается использовать через 6 дней после отела.

Сыры, приготовленные из молока, содержащего более 5-6 % примеси аномального молока, имеют пороки вкуса и запаха (горечь, прогорклость), консистенции (мажущаяся, крошливая), цвета (неравномерный), рисунка (рваный, щелевидный), в связи с чем такое молоко считают непригодным для сыроделия.

Микробиологический контроль сыропригодности молока представлен в разделе 18.10. «Микробиологический контроль производства сыра».

Исправление несиропригодного молока. Эффективными методами улучшения сыропригодности молока и качества сыров являются созревание молока и пастеризация. Внося в пастеризованное молоко молочнокислые бактерии, соли кальция, можно довести его зрелость до степени, необходимой для каждого вида сыра.

В сыроделии применяют кратковременную пастеризацию молока при температуре 71-72 °С с выдержкой 20-25 с. При высокой бактериальной обсемененности молоко пастеризуют при 74-76 °С с выдержкой 20-25 с. После пастеризации молоко охлаждают до температуры созревания.

В результате пастеризации ускоряется процесс созревания и увеличивается выход сыра вследствие лучшего использования жира и большего удержания влаги сырной массой.

Некоторым недостатком пастеризации является ухудшение свертываемости молока, но это компенсируется внесением соответствующего количества солей кальция и чистых культур молочнокислых бактерий.

Для улучшения сыропригодности молока эффективным методом является его бактофугование.

18.4. РАЗВИТИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ВЫРАБОТКЕ СЫРА

Технология сыров включает следующие основные операции: созревание и пастеризацию молока, подготовку к свертыванию и свертывание молока, обработку и второе нагревание сгустка, формирование, прессование, посолку и созревание сыра.

Все технологические приемы, применяемые при производстве сыров (разные степень зрелости молока, температуры свертывания и второго нагревания, размеры сырного зерна, степень обезживания сырной массы и т. п.), предназначены для создания оптимальных условий развития определенных групп микроорганизмов.

Созревание молока. Свежесвыдоенное молоко (парное и охлажденное) нельзя перерабатывать в сыр, так как оно плохо

свертывается под действием ферментов и, находясь в бактерицидной фазе, представляет собой неблагоприятную среду для развития молочнокислых бактерий. В связи с этим при выработке сыров молоко подвергают предварительному созреванию, т. е. выдержке с использованием закваски и без нее.

Оптимальным режимом созревания молока является выдержка его при температуре $(10 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение (12 ± 2) ч. На созревание может быть направлено молоко в сыром виде или после пастеризации. В сыром виде молоко высшего сорта созревает без добавления или с добавлением бактериальной закваски в количестве 0,005-0,01 %. Молоко с повышенной бактериальной обсемененностью (второго класса по редуцтанной пробе) направляют на созревание после пастеризации с добавлением бактериальной закваски в количестве от 0,05 до 0,3 %.

Во время созревания молока заканчивается бактерицидная фаза и начинают развитие молочнокислые бактерии, сопровождающееся ферментацией лактозы с образованием молочной кислоты, которая выступает во взаимодействие с фосфорно- и лимоннокислыми солями кальция. При этом фосфаты и цитраты преобразуются в лактаты, которые в отличие от первых хорошо растворяются в воде и обогащают молоко растворимыми солями кальция. Кислотность молока за период созревания увеличивается не более чем на 1-2 °Т.

Все эти изменения способствуют улучшению сыропригодности молока.

При выработке сыра используют не только молоко, которое подвергали созреванию, но и смесь незрелого и зрелого молока. Зрелое молоко обычно добавляют к свежему в количестве от 15 до 40 %. Если зрелое молоко не используют немедленно, то его охлаждают и хранят при температуре 8°C .

Для выработки различных сыров требуется молоко одинаковой степени зрелости, которую определяют по титруемой кислотности. Кислотность молока перед свертыванием для твердых сыров с низкой температурой второго нагревания должна быть 18-20 °Т, для сыров с высокой температурой второго нагревания — 17-19, для рассольных сыров — 20-21, для брынзы — 22-23 °Т. В зрелом молоке, подготовленном для производства сыра, должно содержаться от 3 до 15 млн клеток в 1 см^3 молочнокислых бактерий.

Подготовка молока к свертыванию. При подготовке молока к свертыванию в него вносят бактериальную закваску. Закваски, используемые в виде бактериальных концентратов вносят, как правило, в молоко в дозе 0,5-1,5 % массы молока.

В отличие от заквасок для кисломолочных продуктов и масла все штаммы закваски для сыров должны обладать протеолитической активностью, т. е. способностью разлагать белок. Кроме того, при

составлении заквасок необходимо принимать во внимание не только принадлежность молочнокислых бактерий к тому или иному виду, но и свойства отдельных штаммов. Например, для сыров с высокой температурой второго нагревания у штаммов, вводимых в состав закваски, необходимо определять термоустойчивость, предельное кислотообразование, прочность и вязкость образовавшегося сгустка, способность к синерезису (выделению сыворотки) и накоплению ароматических веществ. Для получения одинаковых по качеству сыров необходимо учитывать также способность штамма накапливать свободные аминокислоты, характерные для данного вида сыра.

В сыроделии используют многостаммовые закваски для двух групп сыров: мелких и крупных. Однако практика сыроделия показала, что применение для всех мелких сыров одних и тех же заквасок часто приводит к получению одинаковых по органолептическим свойствам сыров. В связи с этим желательно для каждого вида сыра иметь свою отдельную закваску.

Для мелких сыров с низкой температурой второго нагревания в закваску вводят в качестве основного бактериального фона несколько штаммов *Lac. lactis*, *Lac. cremoris*, а в качестве обязательных компонентов - ароматобразующие бактерии *Lac. diacetylactis*, *Leu. dextranicum*. Для крупных сыров с высокой температурой второго нагревания (швейцарского и советского) применяют обычно две закваски: первую составляют так же, как и для мелких сыров, а вторую - из термофильных молочнокислых палочек (*Lbm. helveticum*, *Lbm. lactis*) и термофильных стрептококков. Помимо этого приготавливают культуры пропионовокислых бактерий - *Propionibacterium shermanii*.

При производстве мягких плесневых сыров помимо молочнокислых мезофильных стрептококков используют плесень *Penicillium album* и *Penicillium candidum* (для закусочного, смоленского, камамбера). При этом кондиции плесени наносят на поверхность сыра путем ее орошения. Для сыров типа рокфора вносят микроаэрофильную плесень *Penicillium roqueforti*. В целях создания условий для развития плесени внутри сыра головки прокалывают специальными иглами, делая 30-60 сквозных проколов.

Закваска для сыров со слизиевой поверхностью (дорогобужский, латвийский, пикантный) состоит из мезофильных молочнокислых стрептококков. Однако в созревании данных сыров важную роль играет микрофлора слизи поверхности сыра, которую составляют *Brevibacterium linens*, плесени, спорообразующие молочные дрожжи и дрожжи вида *Candida mycoderma*. Эти микроорганизмы в виде заквасок в сырную массу не вносят, они попадают на поверхность из внешней среды.

Свертывание молока. Сыры, приготовляемые свертыванием молока сычужным ферментом, называют сычужными в отличие от

кисломолочных, при выработке которых сгусток образуется под влиянием молочной кислоты, выделяемой при молочнокислом брожении. Применяют главным образом сычужное свертывание молока. Продолжительность свертывания при выработке всех сычужных сыров составляет от 20 до 60 мин, а для большинства видов — от 30 до 40 мин. Расход сычужного фермента составляет 2, 5 г на 100 кг смеси молока. Фермент вносят в виде 1 или 2,5%-ных растворов.

Для ускорения свертывания молока его нагревают до 32-35 °С, а пастеризованное молоко охлаждают до этой температуры. При этом быстро размножаются мезофильные молочнокислые бактерии, увеличивается кислотность молока и ускоряется его свертывание, так как оптимальным значением рН для действия сычужного фермента является 5,9-6,0.

Обработка сгустка и второе нагревание. Сгусток обрабатывают в целях частичного удаления сыворотки (влаг) и создания оптимальных условий для развития микробиологических и биохимических процессов в сгустке, зерне и сыре в первый период его созревания. Процесс выделения сыворотки (влаг) сгустком называют *синерезисом*.

Для ускорения и более полного выделения сыворотки сгусток разрезают, вымешивают полученное сырное зерно и вторично нагревают.

Особенно сильно развивается молочнокислое брожение в зерне сыра и гораздо слабее - в сыворотке. Зерно обогащается микробами, которые захватываются белком при свертывании молока. При этом концентрация молочнокислых бактерий в сгустке в 4-8 раз больше, чем в сыворотке. В дальнейшем разница между концентрациями увеличивается, так как в сырных зернах они размножаются гораздо быстрее, чем в сыворотке. Это объясняется буферными свойствами белка, который защищает бактерии от вредного воздействия накопившейся молочной кислоты.

Для более полного удаления сыворотки проводят второе нагревание сырной массы при низкой температуре (40-43 °С) (для мелких твердых сыров типа голландского) или при высокой температуре 56-60 °С (для крупных сыров типа швейцарского и советского). Продолжительность второго нагревания при выработке крупных твердых сыров составляет 25-40 мин, мелких - 10-20 мин.

Во время второго нагревания усиливается выделение сыворотки из зерна. При низкой температуре количество мезофильных молочнокислых стрептококков практически не изменяется, и при последующих технологических операциях они продолжают быстро размножаться. При нагревании сырного зерна до 56-60 °С развитие мезофильных молочнокислых стрептококков подавляется, часть их отмирает, при дальнейшей выработке сыра активизируется развитие термофильных молочнокислых палочек и стрептококков.

Формование и прессование сыра. Формование сырной массы проводят для придания сыру формы, соответствующей тому или иному виду.

Прессованием удаляют остатки сыворотки и добиваются определенной плотности сыра. Продолжительность прессования 2-3 ч.

Во время формования и прессования в сырной массе продолжают процессы брожения молочного сахара с постепенным нарастанием кислотности и дальнейшего обезвоживания сырной массы с одновременным ее уплотнением.

Очень важным фактором, влияющим на качество сыра в период формования и прессования, является температура сырной массы. Выбор температуры помещения зависит от качества исходного молока и вида вырабатываемого сыра. Ее поддерживают на уровне 18-20 °С при формовании и 16-20 °С при прессовании сыра.

Мягкие и самопрессующиеся сыры прессуют при высокой температуре (20 °С). Твердые сыры можно прессовать при более умеренной температуре (15-16 °С). Однако, если качество молока хорошее, рекомендуется прессовать сыры при высокой температуре, чтобы усилить микробиологические процессы. При низкой температуре прессуют сыры, изготовляемые из незрелого, а также менее доброкачественного молока, когда возможно вспучивание сырной массы.

В процессе прессования под действием сычужного фермента и бактериальных экзопротеаз происходит частичный протеолиз казеина, что приводит к увеличению количества растворимых азотистых соединений, являющихся источником азотного питания молочнокислых бактерий и стимулирующих их размножение.

Посолка сыра. Поваренная соль влияет на формирование вкуса, запаха и консистенции. Содержание поваренной соли в различных зрелых сырах колеблется от 1,2 до 7 %.

При посолке сыра в рассоле происходит удаление молочного сахара из сыра, сначала с его поверхностного слоя, а затем из более глубоких слоев, а в сырную массу поступает соль. В результате этого бактериологические процессы замедляются, что имеет важное значение для борьбы с ранним вспучиванием сыра, вызываемым бактериями группы кишечных палочек.

При частичной посолке в зерне и досаливании в рассоле наблюдается задержка роста микроорганизмов уже в первые 2 ч после внесения соли.

В случае высокой концентрации соли (выше 3,7 %) может полностью подавляться развитие молочнокислых бактерий и снижаться кислотность сыра, т. е. повышается величина рН. В такой среде могут развиваться опасные для человека токсигенные стафилококки. Поэтому для предотвращения их развития рекомендуют использовать в составе

заквасок солеустойчивые штаммы молочнокислых бактерий, которые могут развиваться при концентрации соли до 6%. После равномерного распределения соли в сырной массе бактериологические процессы вновь восстанавливаются.

Мягкие сыры солят в рассолах меньшей концентрации (18-20%) и менее продолжительное время - от 40-50 мин до 12 ч, твердые сыры солят в рассоле с большей концентрацией (20-22%) в течение нескольких суток.

Созревание сыра. Сыр после прессования и посолки представляет собой резиновую массу без вкуса и выраженного рисунка. Свойственные данному сыру химический состав и органолептические показатели он приобретает только в результате глубоких биохимических и физических изменений его компонентов в процессе созревания.

Принято считать, что созревание сыров начинается с момента посолки. Изменения, начавшиеся в молоке, продолжают во время свертывания и обработки сырной массы в ванне вплоть до формирования и прессования.

Микрофлора большинства видов свежих сыров почти полностью состоит из молочнокислых бактерий. При этом в первой стадии созревания преобладают молочнокислые стрептококки, а во второй - палочки.

18.5. ОСОБЕННОСТИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ПРИ СОЗРЕВАНИИ РАЗЛИЧНЫХ СЫРОВ

Твердые сыры с низкой температурой второго нагревания. К этой группе относят жирные сыры: голландский, костромской, пошехонский, степной, буковинский, эстонский, ярославский и др., а также сыры, с пониженной жирностью: литовский, прибалтийский и др.

В составе микрофлоры этих сыров преобладают мезофильные молочнокислые стрептококки, развитию которых способствуют высокая влажность сырной массы и относительно низкая температура созревания (12-15 °C). При такой температуре не могут развиваться термофильные бактерии. Продолжительность созревания сыров данной группы составляет 2-3 мес.

При выработке твердых сыров с низкой температурой второго нагревания (мелких сыров) количество молочнокислых стрептококков уже в первые 5-10 дней созревания достигает максимального значения - 2,5-3,5 млрд клеток и более в 1 г. После этого в связи с полным сбраживанием лактозы и ее отсутствием в сырной массе происходит постепенное отмирание молочнокислых стрептококков.

В течение 1-2 мес основная масса стрептококков погибает, одновременно происходит увеличение количества мезофильных молочнокислых стрептобактерий *Lbm. plantarum* и *Lbm. casei* subsp.

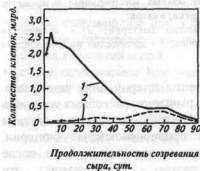


Рис. 49. Изменение объема микрофлоры в процессе созревания голландского сыра:

1 — общее количество молочнокислых бактерий;
2 — количество молочнокислых палочек

ghamnosus, которое достигает максимума через 1,5-2 мес. При дальнейшем созревании сыра постепенно отмирают и молочнокислые палочки.

Развивающиеся стрептобактерии не являются заквасочными микроорганизмами. Они попадают в сыр с молоком. Их размножение на второй стадии созревания сыра обусловлено способностью усваивать в качестве источника углерода соли молочной кислоты (лактат кальция и др.).

Такая закономерность динамики микрофлоры характерна при созревании всех сыров данного типа (рис. 49).

Твердые сыры с высокой температурой второго нагревания. По составу микрофлоры они существенно отличаются от сыров с низкой температурой второго нагревания. Типичной для данной группы твердых крупных сыров является динамика развития молочнокислых бактерий в швейцарском сыре. Созревают они при температуре 22-25 °C.

В сырном зерне перед вторым нагреванием преобладают молочнокислые стрептококки. Под действием высокой температуры второго нагревания (56-60 °C) уменьшается объем микрофлоры в сырной массе за счет частичной гибели мезофильных молочнокислых стрептококков, в то время как термофильные молочнокислые палочки остаются жизнеспособными. В связи с этим уже в односуточном сыре количество палочек составляет 50-80%. Через 2-5 сут созревания отмечается максимальное накопление молочнокислых бактерий, которое составляет около 1 млрд. клеток в 1 г сыра.

В дальнейшем происходит уменьшение в сыре общего объема микрофлоры и количества молочнокислых палочек, что объясняется полным сбраживанием лактозы и отмиранием клеток *Lbm. helveticum*, как наиболее чувствительных к отсутствию углеводов. В это же время отмечается относительное увеличение количества молочнокислых стрептококков. Такое преобладание молочнокислых стрептококков можно объяснить их большей устойчивостью к недостатку лактозы, а также воздействию поваренной соли.

К 30-му дню количество молочнокислых палочек снова увеличивается при продолжающемся уменьшении количества стрептококков (рис. 50). Это происходит за счет размножения

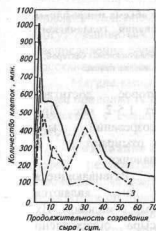


Рис. 50. Изменение объема микрофлоры в процессе созревания швейцарского сыра:

1 — общее количество бактерий; 2 — количество молочнокислых палочек; 3 — количество молочнокислых стрептококков

мезофильных стрептобактерий *Lbm. casei* subsp. *glanmosus* и *Lbm. plantarum*, способных усваивать лактаты. Способностью усваивать лактаты обладают также пропионовокислые бактерии, которые начинают развиваться в сыре после сбраживания лактозы. Размножаясь, эти микроорганизмы выделяют углекислый газ, в результате чего через 2-3 недели в сыре появляется рисунок, т. е. немногочисленные глазки диаметром 1-1,5 см.

Сыры типа швейцарского созревают относительно медленно (до 6 мес.) вследствие небольшого объема микрофлоры, который уменьшается под действием высокой температуры второго нагревания.

Твердые сыры, созревающие при участии микрофлоры сырной слизи. К этой группе относятся жирные сыры (латвийский, пикантный, новоукраинский и др.), а также сыры с пониженной жирностью (каунасский, клайпедский, наурис и др.).

При созревании сыров отмечается бурное развитие молочнокислых стрептококков, количество которых в латвийском сыре в первые дни достигает 8-9 млрд клеток в 1 г. Такое интенсивное размножение молочнокислых бактерий обусловлено слабым обезвоживанием (температура второго нагревания 36-38 °C) и содержанием большого количества лактозы, а также развитием микрофлоры сырной слизи на поверхности сыра, под действием которой образуются продукты щелочного характера, нейтрализующие поверхностные слои сырной массы. Благодаря такому большому объему микрофлоры созревание латвийского сыра завершается к 2 мес.

Микроорганизмы располагаются на корке сыра в виде тонкого слоя слизи желто-коричневого цвета и сообщает сыру острый, слегка аммиачный запах.

Мягкие сыры. В зависимости от применяемых микроорганизмов, участвующих в созревании, мягкие сыры подразделяют на следующие группы:

- сыры, созревающие при участии молочнокислых бактерий и поверхностной микрофлоры сырной слизи (дорогобужский, калининский, пятигорский);
- сыры, созревающие при участии молочнокислых бактерий, белой плесени и микрофлоры сырной слизи, развивающийся на поверхности

сыра (смоленский, любительский зрелый, невшатель и др.);

- сыры, созревающие при участии молочнокислых бактерий и белой плесени, развивающихся на поверхности сыра (русский камамбер, белый десертный и др.);
- сыры, созревающие при участии молочнокислых бактерий и голубой плесени, развивающейся в тесте сыра (рокфор, армянский рокфор и др.);
- сыры свежие, созревающие при участии молочнокислых бактерий (любительский свежий, нарочь, геленджикский, сливочный, домашний, адыгейский и др.).

Мягкие сыры содержат большое количество сыворотки и лактозы, поскольку при их выработке не проводят второго нагревания и прессования. Это способствует быстрому развитию молочнокислых стрептококков, максимальное количество (5,0-6,0 млрд в 1 г) которых накапливается уже в первые дни созревания.

Затем они отмирают, и через 5-10 дней количество молочнокислых стрептококков уменьшается в несколько десятков раз. Отмирание стрептококков обусловлено недостатком лактозы, а также интенсивным накоплением молочной кислоты, особенно в первые дни созревания сыра.

В дальнейшем уменьшается кислотность сырной массы за счет щелочных продуктов, образующихся при распаде белковых веществ под действием протеаз, выделяемых плесеньями, находящимися внутри сыра, а также микрофлоры слизи на корке. Это создает благоприятные условия для развития молочнокислых бактерий.

Развитие молочнокислых стрептобактерий в этих сырах происходит значительно раньше, чем в других сырах, что обусловлено быстрым расходом лактозы, и через 10 дней их содержание уже превышает количество молочнокислых стрептококков, а через 15 дней достигает максимума - нескольких миллиардов в 1 г.

Рассольные сыры. Созревание и хранение сыров этой группы осуществляются в рассоле, концентрация соли в сыре достигает 8 %.

Интенсивное развитие микробиологических процессов в рассольных сырах происходит во время выработки, сампрессования и в первые дни созревания. Так, наибольшее содержание микроорганизмов 5 млрд/г в сырных чанах наблюдается на 4-е сутки. При этом на долю стрептококков приходится 99 %. Затем под действием соли общее количество молочнокислых бактерий снижается, при этом в течение 12 дней на долю стрептококков приходится 99 %.

Через 40-50 сут количество молочнокислых стрептобактерий достигает 50 %, после чего отмечается дальнейшее относительное увеличение содержания молочнокислых палочек. При этом снижается общее количество молочнокислых бактерий, которое составляет около 100 млн/г, т. е. уменьшается в 50 раз.

Плавленные сыры. В состав микрофлоры сыров входят микроорганизмы, выдерживающие температурный режим плавления (75-80 °С 15-20 мин или 90-95 °С 10-12 мин): термофильные молочнокислые палочки, стрептококки, энтерококки, маслянокислые бактерии и другие спорообразующие микроорганизмы. Количество микроорганизмов составляет сотни и тысячи клеток в 1 г.

В связи с тем, что в плавящихся сырах нет лактозы, в них могут развиваться только микроорганизмы, способные усваивать лактаты. Этим свойством обладают маслянокислые бактерии, вызывающие порок - позднее вспучивание сыра. Поэтому плавящиеся сыры необходимо хранить при температуре не выше 8 °С.

18.6. СУЩНОСТЬ БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ПРИ СОЗРЕВАНИИ СЫРОВ

Биохимические превращения веществ сырной массы происходят под воздействием экзо- и эндоферментов различных групп микроорганизмов и в меньшей мере - ферментов сычужного порошка и перерабатываемого молока.

В процессе созревания наиболее глубоким изменениям подвергаются молочный сахар, белки и жиры, менее значительным - минеральные вещества и витамины.

Изменение молочного сахара. Во всех группах сыров молочный сахар полностью сбраживается в течение первых двух недель. Лактоза подвергается брожению под действием ферментов молочнокислых бактерий, в результате которого образуется молочная кислота. Последняя поддерживает реакцию среды на определенном уровне, что препятствует развитию гнилостных и других нежелательных микроорганизмов.

При брожении лактозы ароматообразующими молочнокислыми стрептококками продуцируются уксусная кислота, этиловый спирт, диацетил, которые обогащают вкус сыра, и углекислый газ, обуславливающий образование рисунка мелких твердых сыров.

Скорость образования и количество молочной кислоты зависят в основном от дозы, состава и активности бактериальной закваски, температуры второго нагревания, содержания влаги и соли.

Выход молочной кислоты при производстве твердых сыров составляет около 65-70 % общего количества сброженного молочного сахара. Такое уменьшение свидетельствует о том, что молочная кислота в процессе созревания сыра подвергается дальнейшим химическим превращениям, в результате которых образуются лактаты и другие вещества.

В крупных твердых сырах некоторое количество лактатов сбраживается пропионовокислыми бактериями с образованием пропионовой и уксусной кислот, а также углекислого газа.

Интенсивность накопления молочной кислоты влияет на pH сыра, от которого, в свою очередь, зависит скорость созревания, вкус, структура, консистенция, т. е. качество готового сыра. Помимо молочной кислоты в сыре изменяется и лимонная кислота, которая переходит из молока. При сбраживании лимонной кислоты образуются главным образом ароматические вещества - диацетил, ацетон и др.

Изменение белков. В созревании сыров самая большая роль принадлежит белкам, главным образом казеину. Изменение казеина начинается с момента действия на него сычужного фермента, который переводит казеин в параказин. В дальнейшем параказин изменяется уже в формованном сыре под влиянием молочной кислоты, сычужного фермента, поваренной соли и в самой большой степени - под влиянием ферментов, вырабатываемых микроорганизмами.

Молочнокислые бактерии выделяют протеолитические ферменты двух типов: экзо- и эндопротеазы. Большей протеолитической активностью обладают экзоферменты, которые бактерии выделяют в прижизненный период. Эндоферменты содержатся в клетках молочнокислых бактерий и освобождаются после их отмирания и автолиза.

Параказин при созревании сыра начинает распадаться на более простые соединения, содержащие азот. Вначале появляются альбумозы и пептоны, которые распадаются затем до более простых соединений - пептидов, аминокислот и вплоть до аммиака.

Под действием сычужного фермента распад белков идет до пептонов, причем с образованием молочной кислоты и понижением pH до 4,9 усиливается пептонизирующее действие этого фермента.

Эффективность совместного действия сычужного и бактериальных ферментов значительно превышает эффективность действия каждого фермента в отдельности.

В начальный период созревания в сырах в результате образования пептонов появляется горечь, которая к концу созревания исчезает, поскольку пептоны превращаются в пептиды и аминокислоты. Если горечь не исчезает до конца созревания сыра, это служит показателем того, что процесс распада белков задерживается на стадии пептонов (при низкой температуре созревания).

В крупных твердых сырах сычужный фермент инактивируется при температуре второго нагревания, поэтому протеолиз во время созревания обусловлен ферментами молочнокислых бактерий.

Активность протеолитических ферментов у молочнокислых палочек выше, чем у стрептококков. Этим объясняется тот факт, что в твердых сырах с высокой температурой второго нагревания, созревающих при участии термофильных молочнокислых палочек (*Lbm. helveticum*, *Lbm. lactis*), происходит более глубокий распад белков

с образованием свободных аминокислот. Их количество в 2-3 раза больше, чем пептидов.

В связи с тем что общее количество микрофлоры в этих сырах незначительно, ферментативные процессы протекают медленнее, сыры созревают дольше (4-6 мес).

В твердых сырах с низкой температурой второго нагревания распад белков под действием малоактивных протеолитических ферментов мезофильных молочнокислых стрептококков происходит неглубоко. Количество пептидов почти соответствует количеству свободных аминокислот, а содержание последних у них ниже по сравнению с твердыми сырами с высокой температурой второго нагревания.

В мелких твердых сырах сычужный фермент не разрушен и также влияет на созревание, процессы распада белка протекают быстрее, сыры становятся зрелыми уже в двухмесячном возрасте.

Из группы мягких сыров надо выделить в особую подгруппу сыры типа латвийского, созревающие при участии микрофлоры сырной слизи. Температура второго нагревания при выработке сыров этой подгруппы ниже (36-38 °С), содержание влаги, молочного сахара и молочной кислоты больше, чем в голландском сыре. Кроме того, сыры этой подгруппы обсеменяются с поверхности слизееобразующими бактериями.

В этих сырах наблюдаются более активный распад белков. Содержание растворимых азотистых веществ в них больше, чем в твердых сырах с низкой и высокой температурами второго нагревания, хотя белки распадаются в основном до пептидов. Этот факт объясняется тем, что основную роль в созревании латвийского сыра играют молочнокислые бактерии. Поверхностная микрофлора (слизееобразующие бактерии) играет второстепенную роль, влияя в основном на наружные слои сыра. Однако она все же придает своеобразные специфические вкус и запах сыру. Характерной особенностью мягких сыров является малое накопление свободных аминокислот в зрелом сыре.

Несмотря на то что в производстве этой группы сыров принимают участие плесени и образующие слизь бактерии, значительная роль в созревании сыров принадлежит молочнокислым стрептококкам и палочкам. Таким образом, в мягких сырах глубокий протеолиз обеспечивают сычужный фермент, протеазы молочнокислых стрептококков, плесени и микрофлора сырной слизи. В результате их совместного действия белки сырной массы расщепляются с образованием особенно большого количества растворимых азотистых веществ при малом накоплении аминокислот.

В группе рассольных сыров второе нагревание в большинстве случаев не применяют. В сырах содержится большое количество влаги - 49-52 %, поэтому в свежем сыре условия для развития микробиологических процессов очень благоприятны. Однако эти

процессы вскоре замедляются из-за консервирующего действия соли; в результате в зрелом сыре накапливается меньше продуктов гидролиза белков - пептонов и свободных аминокислот. Помимо этого при длительном хранении сыров в рассоле часть растворимых продуктов распада белков переходит из сыра в рассол, тем самым ухудшается их качество. Рассольные сыры созревают примерно за 2-3 мес. Таким образом, при распаде белков во всех группах созревающих сыров накапливаются пептиды и аминокислоты, оказывающие значительное влияние на вкус готового продукта. Накопление отдельных аминокислот различно - по мере созревания сыра концентрация одних аминокислот возрастает, а других уменьшается. Поэтому каждый вид сыра имеет свой характер накопления и присущий ему набор свободных аминокислот.

Освободившиеся в процессе созревания аминокислоты под действием ферментов микрофлоры подвергаются различным изменениям. Они могут дезаминироваться, декарбоксилироваться, вступать в реакции с кетокислотами, переходить в другие аминокислоты и т. д. При этом образуются различные соединения: кето- и оксикислоты, амины, альдегиды, кетоны и др. Многие из них играют существенную роль при формировании вкуса и запаха сыров.

Изменение молочного жира. Жир в процессе созревания почти всех сыров подвергается гидролизу под действием липолитических ферментов (липаз). Они поступают в сыр с перерабатываемым молоком, сычужным порошком и продуцируются молочнокислыми, пропионовокислыми бактериями, бактериями сырной слизи и особенно плесенями. В результате гидролиза жира высвобождаются жирные кислоты, в том числе летучие (уксусная, масляная, пропионовая и др.), которые участвуют в образовании характерного вкуса и запаха.

Интенсивность распада жира и накопления летучих жирных кислот в сырах различна - в твердых она ниже, чем в мягких.

В мелких твердых сырах жир расщепляется незначительно. В крупных твердых сырах (швейцарском и советском) гидролиз жира осуществляется активнее под действием липолитических ферментов, выделяемых молочнокислыми палочками и пропионовокислыми бактериями.

На вкус и запах этих сыров особенно сильно влияет пропионовокислое брожение, в результате которого образуются пропионовая и уксусная кислоты. Последние вместе с другими жирными кислотами, выделяющимися при частичном разложении жира и образовании молочного сахара, придают сырам специфический, немного пряный, ореховый привкус.

Гидролиз жира в мягких сырах (преимущественно в корке) проходит под действием активных липаз поверхностной микрофлоры сырной слизи. В сыре рокфор, созреваемом при участии плесени,

развивающейся внутри сыра, гидролиз жира происходит с одинаковой интенсивностью как на поверхности, так и внутри головки.

Мягкие сыры содержат продукты дальнейшего окисления жирных кислот - метилкетоны, которые обладают острым вкусом и могут влиять на органолептические показатели сыров.

Наряду с жирными кислотами в сырах образуется глицерин, однако, он не обнаруживается, так как потребляется микроорганизмами.

Изменение минеральных веществ и витаминов. Молочная кислота, взаимодействуя с минеральными солями и параказеином кальция, образует лактат кальция и монокальциевую соль параказеина, которая легко набухает, что способствует формированию эластичной консистенции сыра. Молочная кислота переводит в водорастворимое состояние минеральные соли сыра и фосфор неорганических солей. Так, если в сыре образуется не менее 1 % молочной кислоты, то она, вступая в соединение с параказеином, образует растворимый лактат параказеина.

В процессе созревания сыров накапливаются другие растворимые продукты, которые связывают значительное количество влаги, вследствие чего в оставшейся свободной воде повышается концентрация соли. В результате увеличения концентрации растворимых веществ в сыре повышается осмотическое давление и создаются неблагоприятные условия для развития микроорганизмов, что влечет за собой отмирание бактерий всех групп (кроме фагофилов и осмотолерантных) и повышает стойкость сыра при хранении.

Вследствие развития микрофлоры сыра изменяется содержание некоторых водорастворимых витаминов. Так, в крупных сырах пропионовокислые бактерии синтезируют витамин В₁₂.

18.7. ОБРАЗОВАНИЕ РИСУНКА СЫРОВ

Созревание сыра сопровождается образованием газов (СО₂, N₂, Н₂, О₂), среди них на долю углекислого газа приходится 90 %. Появление газов связано с развитием гетероферментативных молочнокислых и пропионовокислых бактерий, а также с декарбоксилированием аминокислот. Наибольшее количество газа обнаруживается в период максимального развития бактерий в сыре.

Сначала газы легко растворяются в сыворотке сыра, а при получении перенасыщенных растворов начинают скапливаться в промежутках между сырными зёрнами. Они раздвигают сырную массу, в результате образуются полости - глазки, происходит уплотнение белковой массы и выделение влаги, которая скапливается в глазках, образуя «слезу». Количество и характер глазков формируют рисунок сыра. При быстром образовании газа глазки будут мелкими - диаметром 0,3-0,5 см (мелкие твердые сыры), а при медленном - крупными - диаметром 1-2 см (крупные твердые сыры).

В крупных сырах (типа швейцарского) глазки образуются через 20-25 дней после изготовления, а иногда и позже. Они имеют правильную круглую форму, заполняются в основном углекислым газом и незначительным количеством азота и кислорода. Углекислый газ образуется главным образом под влиянием пропионовокислого брожения.

В мелких сырах глазки мелкие, частые, круглой формы.

Если процесс брожения проходит нормально, рисунок имеет глазки округлой формы, равномерно расположенные. При нарушении нормального процесса брожения формируется рисунок, нехарактерный для того или иного вида сыра. Загрязнение молока и сыра бактериями группы кишечных палочек приводит к обильному газообразованию в первые дни созревания. Рисунок образуется сетчатый, рваный, а иногда при быстром развитии этих бактерий наблюдается вспучивание сыра.

Маслянокислые бактерии, попавшие в молоко и сыр, развиваются позднее, создавая свой рисунок, который накладывается на рисунок, образованный ранее, т. е. при маслянокислом брожении наблюдается вспучивание сыра на более поздней стадии его созревания.

18.8. СПОСОБЫ УСКОРЕНИЯ ПРОЦЕССОВ СОЗРЕВАНИЯ СЫРОВ

Созревание сыров представляет собой очень длительный процесс, и уменьшить продолжительность созревания можно различными методами: увеличением дозы закваски; активизацией бактериальной закваски; подбором более активных штаммов молочнокислых бактерий; применением ферментных препаратов; применением микроорганизмов-симбионтов; использованием микроэлементов, ускоряющих созревание сыров.

Увеличение дозы закваски, вносимой в молоко, может ускорить созревание сыров. Однако применение больших доз закваски может привести к резкому повышению кислотности молока и появлению пороков сыра.

Увеличение дозы закваски молочнокислых бактерий применяют при производстве быстросозревающих сыров, которые в дальнейшем подлежат плавлению. В этом случае помимо закваски в молоко необходимо вносить диатрийфосфат, который нейтрализует избыточное количество образовавшейся молочной кислоты в сырной массе, способствуя дальнейшему развитию молочнокислых микробов.

Активизация бактериальной закваски состоит в том, что до внесения в молоко, предназначенное для выработки сыра, бактериальную закваску смешивают с двойным количеством молока и выдерживают в течение 1 ч при температуре 24-26°C. Молочнокислые бактерии в закваске находятся в присутствии молочной кислоты. В связи с этим при разбавлении закваски молоком ее кислотность понижается и

бактерии начинают вновь интенсивно размножаться.

Подбор более активных штаммов молочнокислых бактерий заключается в том, что в состав заквасок отбирают штаммы, обладающие гидролитической активностью. Они наиболее интенсивно гидролизуют белки сыра, что положительно влияет на развитие других заквасочных микроорганизмов, более быстрое накопление биомассы и бактериальных ферментов.

Применение ферментных препаратов в стимулирует биохимическую активность молочнокислых бактерий закваски, особенно ароматобразующих стрептококков. Предложен биологический препарат, названный гидролизатом. Для получения его в молоко вносят бактериальную закваску, состоящую из молочнокислых палочек (*Lbm. helveticum*), термofilных молочнокислых стрептококков, смеси разных штаммов мезофильных стрептококков с уксуснокислыми и пропионовокислыми бактериями. Смесь гидролизуют при помощи пепсина в течение 3-3,5 сут.

Применение микроорганизмов-симбионтов является одним из возможных путей ускорения созревания сыра и повышения его качества. С этой целью можно использовать некоторые виды дрожжей, неспособных к спиртовому брожению. Дрожжи при совместном развитии с молочнокислыми бактериями снабжают их азотистым питанием и витаминами. Они потребляют молочную кислоту, снижая тем самым угнетающее действие последней на молочнокислые бактерии.

Можно использовать и другие ассоциации микроорганизмов, стимулирующих молочнокислый процесс.

Использование микроэлементов существенно ускоряет процесс созревания сыра, протекающий под влиянием ферментов, активность которых часто зависит от присутствия в них атома металла. Основными каталитическими элементами являются медь, марганец, кобальт, магний, никель, йод, молибден. Для развития микроорганизмов и стимулирования их действия используют не отдельные микроэлементы, а их смеси.

18.9. ПОРОКИ СЫРОВ

Пороки - это отклонения от стандартных показателей, возникающие в сырах при переработке недоброкачественного сырья, в результате нарушения технологии производства и правил хранения продукта.

Условно различают пороки: консистенции, рисунка, вкуса и запаха, цвета и внешнего вида.

Пороки консистенции. Крошливая консистенция возникает при переработке молока повышенной кислотности и

вследствие чрезмерно активного размножения молочнокислых бактерий и молочнокислого брожения. Из-за избытка молочной кислоты параказеин плохо набухает, сырное тесто имеет недостаточную связность, легко ломается и крошится. При газообразовании тесто раскалывается, в сыре возникают трещины (колющаяся консистенция, или самокол). В случае пересушки сырного зерна появляются внутренние и наружные разрывы сырной массы - свищи.

Резинистая консистенция появляется при недостаточном развитии молочнокислых бактерий, недостатке молочной кислоты в сырной массе. Порок обусловлен излишней обсушкой сырного зерна и низким содержанием влаги в сыре после прессования.

Мерами предупреждения пороков консистенции являются следующие: выработка сыра из зрелого молока определенной кислотности, использование доброкачественных бактериальных заквасок, внесение больших доз бактериальной закваски, обеспечение оптимальных режимов технологии.

Пороки рисунка. Слепой сыр характеризуется отсутствием рисунка, что является показателем слабого развития ароматобразующих молочнокислых стрептококков в мелких сырах и пропионовокислых бактерий в швейцарском и советском сырах.

Причинами порока являются переработка незрелого молока, внесение малой дозы бактериальной закваски, низкая температура посола и созревания сыров.

Редкий и мелкий рисунок наблюдается при переработке молока повышенной кислотности при низкой температуре созревания сыра, а в крупных сырах - при подавлении развития пропионовокислых бактерий вследствие пересола сыра.

Вспучивание сыров происходит в результате выделения газов (CO_2 и H_2) в избыточном количестве. Возбудителями раннего вспучивания являются бактерии группы кишечных палочек. Порок возникает в первые дни созревания, а иногда в процессе прессования сыра. Появлению порока способствуют вяло протекающий кислomолочный процесс, высокое значение pH, низкая концентрация соли в сыре и высокая температура в посолочном отделении. Для предупреждения раннего вспучивания необходимо использовать бактериально чистое молоко, активную закваску, создавать оптимальные условия для развития молочнокислых бактерий.

Возбудителями позднего вспучивания сыров являются маслянокислые бактерии *Cl. thuyobutyricum*, которые развиваются в созревающем сыре после прекращения молочнокислого процесса и повышения pH сыра вследствие накопления продуктов белкового распада при созревании сыра. Маслянокислые бактерии в сыр попадают с молоком при кормлении коров некачественным силосом. Для позднего

вспучивания характерны неправильный шелевидный рисунок сыра, размягченная, губчатая консистенция, резкий запах масляной кислоты, неприятный сладковатый и даже салитый вкус.

В крупных сырах маслянокислое брожение часто приводит к образованию крупных, неправильной формы глазков и шелевидных пустот, а также к появлению чрезмерно больших глазков, так называемого бычьего глаза.

Для борьбы с поздним вспучиванием применяют штаммы *Lac. lactis*, вырабатывающие низин. При этом в состав закваски вводят также низиностойчивые штаммы *Lac. lactis*, *Lac. cremoris* и ароматобразующих стрептококков. В качестве антагонистов маслянокислых бактерий и кишечных палочек используют биологически активные штаммы *Lbm. plantarum*.

Пороки вкуса и запаха. Горький вкус связан с накоплением в сыре пептонов и горьких пептидов вследствие развития маммококков и микрококков, обсеменяющих молоко в антисанитарных условиях его получения и при низкой температуре созревания сыра.

Прогорклый вкус обусловлен низкомолекулярными жирными кислотами (главным образом масляной кислотой), которые образуются при расщеплении жира липазами флюоресцирующих, маслянокислых бактерий и плесеней.

Салистые вкус и запах появляются в сырах при развитии маслянокислых бактерий, окисляющих жир с образованием оксикислот и альдегидов, имеющих салитые вкус и запах.

Аммиачные вкус и запах возникают в сырах, созревающих при излишнем развитии микрофлоры сырной слизи.

Кислый вкус - его причинами могут быть использование молока повышенной кислотности, интенсивное размножение молочнокислых бактерий и излишне высокий уровень активной кислотности сыра после прессования.

Слабовыраженный вкус - причиной порока является применение малоактивных бактериальных заквасок микроорганизмов, обладающих низкой способностью к кислотообразованию, расщеплению лактозы и протеинов. В крупных сырах также вызывается слабым развитием пропионовокислых бактерий при нарушении технологических режимов.

Запах сероводорода - возбудителем порока являются энтерококки - *Ent. faecalis*, которые разлагают серосодержащие аминокислоты с образованием сероводорода, что резко ухудшает качество сыра. Возникновению порока способствуют низкая кислотность и слабый посол сыра. Для предупреждения порока необходимо интенсифицировать молочнокислый процесс - применять активную закваску, повышать температуру созревания сыра.

Пороки цвета и внешнего вида. Коричневые пятна возникают на корке сыра при разложении аминокислоты тирозина. Порок вызывают микрококки и *Proteus vulgaris*. Микрококки, разлагая белок до пептонов, подщелачивают субстрат и создают благоприятные условия для развития гнилостных бактерий *Pt. vulgaris*, которые вызывают более глубокий распад белковых веществ. Микрококки и гнилостные бактерии усиливают развитие друг друга.

С в и щ характеризуется образованием внутри сыра пустот, а затем наружных отверстий, через которые проникают воздух и микроорганизмы. Вначале размножаются плесени и дрожжи, которые расщепляют белки, это создает благоприятные условия для развития гнилостных бактерий, усиливающих разложение белков. Появляются плесневые и гнилостные запахи и вкус.

Причинами порока являются пересушка, плохая связность сырного зерна и обсеменение сыра микрофлорой. Для предупреждения порока необходимо соблюдение технологии сыра и санитарных правил.

И з ы з в л е н и е к о р к и вызывается осповидной плесенью рода *Oospora* и проявляется в виде сухих язвочек диаметром 1-8 мм и крупных мокрых язв, проникающих в подкорковый слой. В результате образования щелочных продуктов белкового распада создаются условия для развития гнилостных бактерий.

Для предупреждения изъязвления корки применяют покрытия с антисептическими веществами (сорбиновая кислота и др.).

П о д к о р к о в а я п л е с е н ь - возбудителями являются *Penicillium glaucum* и другие плесени, которые развиваются в подкорковом слое сыра при нарушении целостности корки. Для предупреждения порока проводят дезинфекцию помещения, применяют покрытия с антисептиками.

18.10. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ПРОИЗВОДСТВА СЫРОВ

На сыродельных заводах проводят два вида микробиологического контроля: контроль технологических процессов и готовой продукции и санитарно-гигиенический контроль условий производства.

При контроле технологических процессов производства сыра и готовой продукции исследуют сырое молоко, предназначенное для выработки сыра, проводят контроль пастеризованного молока, сыра, исследуют также закваску.

В сыром молоке, поступающем на сыродельные заводы, кроме редуктанта пробы и определения наличия ингибирующих веществ один раз в 10 дней, а в случае необходимости и чаще проводят контроль сыропригодности молока, при этом определяют общее количество спор мезофильных анаэробных лактатсбраживающих бактерий, ставят пробу

на брожение и сычужно-бродильную пробу.

Количество спор мезофильных анаэробных лактатсбраживающих (маслянокислых) бактерий определяют методом предельных разведений.

Разведения (0, I, II) исследуемые проб прогревают при 75 °С 30 мин и засевают в лактано-ацетатную селективную среду. Каждое разведение засевают в две пробирки. После застывания питательной среды ее поверхность заливают слоем водного агара высотой 15-20 мм. Посевы термостатируют при 37 °С в течение 3 сут.

Рост мезофильных лактатсбраживающих анаэробных бактерий в посевах определяют по образованию разрывов столбика агара и изменению цвета среды с красного до соломенно-желтого. Образование в среде желтых пятен или точек также указывает на наличие лактатсбраживающих анаэробных бактерий. Вероятное число спор этих микробов рассчитывают при помощи табл. 42. Предварительно составляют числовую характеристику, т. е. записывают количество пробирок по каждому разведению, где выявлены споры маслянокислых бактерий. Например, числовую характеристику «210» получают в том случае, если в посевах нулевого разведения (объем 1 см³) маслянокислые бактерии выявлены в двух пробирках (записывается цифра «2»). Вторая цифра числовой характеристики отображает наличие маслянокислых бактерий в посевах первого разведения (объем 0,1 см³). В нашем примере маслянокислые бактерии обнаружены в одной пробирке. Третья цифра «0» обозначает, что в посевах второго разведения (объем 0,01 см³) маслянокислые бактерии не установлены.

Вариант числовой характеристики находят в табл. 40 и определяют количество спор маслянокислых бактерий. В нашем примере - 6 спор в 1 см³ молока.

Числовые характеристики 002, 012, 021, 022, 102, 112, 122, 202 не могут быть использованы для расчета, так как в 95 % случаев они вызваны несовершенной техникой приготовления разведений или присутствием антибактериальных веществ. В данных случаях исследование молока следует повторить.

Маслянокислые бактерии должны отсутствовать в 1 см³ пастеризованного молока.

Приготовление лактано-ацетатной питательной среды. К 1 дм³ питьевой воды добавляют 50 г сухой среды (Ласса-Углич). Смесь перемешивают, нагревают до полного растворения агара и кипятят 3-5 мин, не допуская пригорания. Полученную среду в горячем состоянии фильтруют через ватно-марлевый фильтр и устанавливают рН 5,7; разливают в пробирки по 15 см³, закрывают ватными пробками и стерилизуют при температуре 121 °С в течение 15 мин. Готовая среда должна иметь интенсивно-

розовый или красный цвет.

42. Определение количества спор методом предельных разведений

1 см ³	Количество пробирок с положительными результатами при посевах		Наиболее вероятное число спор в 1 см ³	Количество пробирок с положительными результатами при посевах			Наиболее вероятное число спор в 1 см ³
	0,1 см ³	0,01 см ³		1 см ³	0,1 см ³	0,01 см ³	
0	0	0	0,0	1	1	2	-
0	0	1	0,5	1	2	0	2,0
0	0	2	-	1	2	1	3,0
0	1	0	0,5	1	2	2	-
0	1	1	0,9	2	0	0	2,5
0	1	2	-	2	0	1	5,0
0	2	0	0,9	2	0	2	-
0	2	1	-	2	1	0	6,0
0	2	2	-	2	1	1	13,0
1	0	0	0,6	2	1	2	20,0
1	0	1	1,2	2	2	0	25,0
1	0	2	-	2	2	1	70,0
1	1	0	1,3	2	2	2	110,0
1	1	1	2,0	2			и более

Допускается приготовление лактано-ацетатной среды из отдельных ингредиентов. Для этого к 900 см³ мясо-пептонного бульона добавляют 5 г молочнокислого кальция, 5 г уксуснокислого натрия, 0,8 г солянокислого цистина, 40 см³ дрожжевого автолизата и 20 г агара. Смесь нагревают до температуры 95 °С, выдерживают при постоянном помешивании до расплавления агара и добавляют по 10 см³ 0,01%-ных водных (на дистиллированной воде) свежеприготовленных растворов треххлористого железа и тетраборного натрия, 10 см³ 1%-ного раствора углекислого натрия и 1 см³ 0,4%-ного водного раствора индикатора нейтрального красного. С помощью 20%-ного водного раствора молочной кислоты устанавливают рН 5,7. Приготовленную среду разливают в пробирки и стерилизуют при температуре 115 °С в течение 20 мин.

При приготовлении питательной среды допускается вместо мясо-пептонного бульона использование основы, состоящей из гидролизата казеина и пептона. Для ее приготовления 10 г пептона добавляют к 1 дм³ гидролизата казеина, устанавливают рН 5,7, нагревают до кипения, фильтруют через бумажный фильтр, разливают в чистые колбы. Стерилизуют при 121 °С в течение 20 мин.

Проба на брожение основана на способности некоторых микроорганизмов, присутствующих в молоке, свертывать его. В зависимости от времени свертывания и характера образовавшегося сгустка оценивают состав микрофлоры молока и пригодность его для производства сыра.

В чисто вымытые широкие пробирки, хорошо просушенные и

ополоснутые два-три раза тем же молоком, из которого отбирают пробу, наливают около 20 см³ молока. Пробирки закрывают ватными пробками и ставят в термостат при температуре 38°C на 24 ч. Через 12 ч производят первичный осмотр проб.

Если молоко не свернулось или лишь начинает свертываться, оно считается сыропригодным, если свернулось и стусток испученный - недоброкачественным.

Вторично пробы просматривают спустя еще 12 ч, и на основании этого просмотра относят молоко к одному из четырех классов, указанных в табл. 43.

43. Учет результатов пробы на брожение

Класс	Оценка качества молока	Характеристика стустка
I	Хорошее	Начало свертывания без выделения сыворотки и пузырьков газа; незначительные полоски на стустке
II	Удовлетворительное	Стусток с полосками и пустотами, заполненный сывороткой; стусток стягивается со слабым выделением сыворотки; структура стустка мелкозернистая
III	Плохое	Стусток с обильным выделением зеленоватой или беловатой сыворотки; стусток крупнозернистый; наблюдают пузырьки газа в стустке или сливочном слое
IV	Очень плохое	Стусток разорван и пронизан пузырьками газа; испучен, как губка

Непригодно для выработки сыра молоко третьего и четвертого классов.

Сычужно-бродильная проба основана на способности некоторых микроорганизмов и сычужного фермента свертывать молоко. По характеру образовавшегося стустка оценивают качество молока на его пригодность для производства сыра, и отчасти - качество будущего продукта.

В чисто вымытые широкие пробирки, хорошо просушенные и ополоснутые два-три раза тем же молоком, из которого отбирают пробу, наливают около 30 см³ молока, затем вносят 1 см³ раствора сычужного фермента, хорошо перемешивают и ставят на 12 ч на водяную баню или термостат при 38 °С, после чего вынимают из бани и осматривают. Молоко относят к одному из трех классов, указанных в табл. 44.

Для исследования можно брать молоко из ванны сразу же после внесения сычужного фермента.

Контроль качества закваски осуществляют ежедневно по органолептическим показателям, активности закваски, отсутствию загрязнения посторонней микрофлорой, наличию ароматобразующих бактерий (для мелких сыров).

Для установления причин снижения активности закваски используют следующий метод. Берут три колбы. В первую наливают молоко, пригодность которого для приготовления заквасок гарантирована

или проверена заранее, в две другие - сборное молоко из сырной ванны.

44. Учет результатов сычужно-бродильной пробы

Класс	Оценка качества молока	Характеристика стустка
I	Хорошее	Стусток с гладкой поверхностью, упругий на ощупь, без глазков на продольном разрезе, плавает в прозрачной сыворотке, которая не тянется и негорькая на вкус
II	Удовлетворительное	Стусток мягкий на ощупь, с единичными глазками (1-10), разорван, но не испучен
III	Плохое	Стусток с многочисленными глазками, губчатый, мягкий на ощупь, испучен, всплыла верху или вместо стустка образуется хлопьевидная масса

В каждую колбу со 150 см³ молока наливают 5 % рабочего раствора метиленового голубого, приготовленного так же, как при пробе на редукацию; молоко пастеризуют при 76-80 °С в течение 10 мин. После этого молоко охлаждают до 30 °С, вносят в него 5 % материнской закваски и колбы встряхивают. Первая колба является контролем; во вторую добавляют 1 % прокипяченной в течение 3-5 мин производственной закваски; в третью колбу - 1 % производственной некипяченной закваски.

Колбы ставят в термостат при 30 °С. За посевами наблюдают через 4,5; 7,5 ч. Если в первой и второй колбах метиленовый голубой обесцвечивается за 1,5-2 ч и через 6-7 ч образуется стусток, а в третьей колбе окраска исчезла через 1,5-2 ч и через 7-7,5 ч вновь появилась, то производственная закваска заражена фагом.

Для подтверждения достоверности обнаружения бактериофага в закваске рекомендуется также вести контроль за ходом кислотомолочного процесса по понижению величины рН молока, которую определяют через 6, 9, 16 и 24 ч культивирования.

Снижение скорости нарастания кислотности во второй и третьей колбах по сравнению с контролем говорит о низком качестве сборного молока как среды для развития молочнокислых бактерий. Если же кислотность молока в первой и второй колбах нарастает одинаково, а в третьей - более медленно, то это означает загрязнение производственной закваски фагом. Если наблюдается медленное нарастание кислотности и запаздывание образования стустка во всех колбах, то это приводит к низкой активности закваски, что, по всей вероятности, связано с нарушением правил ее приготовления.

В смеси молока из ванны или сыроизготовителя определяют общее число спор мезофильных анаэробных лактатсбраживающих бактерий и бактериальной группы кишечных палочек не реже одного раза в 10 дней.

Споры мезофильных анаэробных лактатсбраживающих бактерий и БГКП не должны обнаруживаться в 0,1 см³.

Сыр после прессования контролируют на наличие бактерий группы кишечных палочек один раз в 10 дней.

Сыр в конце созревания исследуют каждую партию на выявление бактерий группы кишечных палочек, а при вспучивании определяют общее количество спор мезофильных анаэробных лактатсбраживающих бактерий.

В сырах после прессования БГКП должны отсутствовать в 0,00001 г, а в сыре в конце созревания кишечные палочки не должны выявляться в 0,001 г.

Готовый продукт (сыры) контролируют каждую партию, а плавленые сыры - не реже одного раза в месяц. Микробиологические показатели для санитарной оценки сыров представлены в табл. 45.

Контроль производства сычужных сыров с низкой температурой второго нагревания производят по количеству бактерий группы кишечных палочек с использованием агара желчного фиолетово-красного.

45. Микробиологические показатели сыров

Вид продукта	КМАФАНМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г), в которой не допускаются		Примечание
		БГКП	патогенные микроорганизмы, в т.ч. сальмонеллы	
Сыры сычужные твердые и мягкие	-	0,001	25	Staph. aureus не более 1 000 КОЕ/г
Сыр российский	-	0,001	25	Staph. aureus не более 500 КОЕ/г
Сыры плавленые без наполнителей	5x10 ³	0,1	25	Плесени не более 50 КОЕ/г, дрожжи не более 50 КОЕ/г

Перед выполнением анализа среду расплавляют на водяной бане (или пользуются свежеприготовленной средой), охлаждают до 50 °С и разливают в стерильные чашки Петри примерно по 10-12 см³. Чашки оставляют полуоткрытыми на 1 ч для подсушивания среды. Потом закрывают, маркируют и используют для исследования.

Разведения исследуемого пастеризованного молока или сыра готовят в соответствии с табл. 46.

Каждое из выбранных разведений засевают по 0,1 см³ поверхностным способом. Посевы термостатируют при температуре 37 °С 16-24 ч; но не более 24 ч. Подсчитывают розовато-фиолетовые колонии диаметром более 0,5 мм с более светлым по сравнению с центром ареолом.

Для определения количества бактерий группы кишечных палочек в 1 г или 1 см³ исследуемой пробы число колоний, выросших на каждой чашке, умножают на 10 и на степень соответствующего разведения.

46. Разведения исследуемых проб при посеве на желчный фиолетово-красный агар

Объект исследования	Метод посева	
	поверхностный	глубинный
	Засаеваемые разведения	
Молоко после пастеризации из ванны или сыроизготовителя (смесь молока)	0	I
Сыр после прессования	III	IV
Сыр зрелый (или в конце созревания)	II	III

Посев на агар желчный фиолетово-красный можно также проводить глубинным способом. Каждое разведение засевают по 1 см³ в отдельную чашку Петри и заливают расплавленным и охлажденным до 45 °С агаром желчным фиолетово-красным.

После застывания агара чашки Петри ставят в термостат при температуре 37 °С на 16-24 ч.

Число колоний, выросших на каждой чашке пересчитывают на 1 г или 1 см³ продукта с учетом разведения.

Результаты контроля производства сычужных сыров с низкой температурой второго нагревания оценивают согласно табл. 47.

47. Показатели санитарной оценки сыров с низкой температурой второго нагревания по количеству БГКП (на агаре желчном фиолетово-красном)

Объект исследования	Количество БГКП в 1 см ³ или 1 г		
	Оценка результатов		
	отлично	хорошо	удовлетворительно (предельные)
Молоко после пастеризации из ванны или сыроизготовителя (смесь молока)	<10	<10	<=30
Сыр после прессования	<= 3 000	<= 30 000	<= 300 000
Сыр зрелый (или в конце созревания)	< 100	<= 3 000	<= 3 000

Приготовление агара желчного фиолетово-красного. К 1 000 см³ гидролизованного молока добавляют 30 см³ дрожжевого автолизата, 15 см³ желчи, 0,03 г нейтрального красного, 0,004 г кристаллического фиолетового и 15 г агара. Среду кипятят 5 мин при перемешивании. Устанавливают pH 7,2-7,4 при помощи 2 %-ного водного раствора едкого натрия и разливают в пробирки по 10-12 см³ или во флаконы по 50-100 см³. Среду готовят непосредственно перед посевом.

Допускается применение среды, прокипяченной 30 мин на водяной бане или пастеризованной текучим паром по 30 мин в автоклаве в течение 3 сут.

Готовая среда должна иметь фиолетово-красный цвет.

Может использоваться сухая питательная среда, которую готовят

по прописи, прилагаемой к каждой партии среды.

Для приготовления дрожжевого автолизата 1 кг прессованных дрожжей разводят в 1 дм³ воды и помещают в термостат при 55-58 °С на 3 сут. Потом автоклавируют при 118 °С в течение 15 мин и фильтруют. Осадок промывают таким количеством воды, чтобы общее количество фильтра составило 4 дм³.

Фильтрат нейтрализуют 20%-ным раствором едкого натра до рН 6,8, разливают в пробирки и стерилизуют при 121 °С в течение 10 мин.

К объектам контроля санитарно-гигиенических условий производства относят оборудование и аппаратуру, посуду, инвентарь, руки и санитарную одежду работников, воду, воздух, а также материалы производства. Из материалов производства в сыроделии исследуют сычужный фермент, при этом определяют общее количество микроорганизмов, присутствие бактерий группы кишечных палочек и наличие анаэробных клостридий. Показатель КОЕ не должен превышать 6 тыс., кишечные палочки и анаэробные клостридии не должны выявляться соответственно в 3 и 1 г сычужного порошка.

МИКРОБИОЛОГИЯ КОНСЕРВИРОВАННЫХ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ И МОРОЖЕНОГО

19.1. ПРИНЦИПЫ КОНСЕРВИРОВАНИЯ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Молочные консервы — это продукты из натурального молока или молока и пищевых наполнителей (компонентов), которые в результате специальной обработки могут длительное время сохранять свои свойства без изменений.

Изменение свойств и порча пищевых продуктов вызываются главным образом действием микроорганизмов, обуславливающих гниение, гликолиз, липолиз, изменение цвета, запаха, консистенции и другие пороки.

Для того чтобы надежно предохранить продукты от порчи, необходимо создать, такие условия хранения либо так видоизменить их свойства, чтобы попавшие в них микробы были уничтожены или не могли развиваться.

Используя биологические принципы, все методы консервирования можно разделить на три основные группы:

методы, основанные на принципе биоза, т. е. поддержания жизненных процессов в сырье (молоке) и использования его естественного иммунитета;

методы, основанные на принципе анабиоза, т. е. на подавлении (замедлении) жизнедеятельности микроорганизмов при помощи различных физических, химических и биологических факторов;

методы, основанные на принципе абиоза, т. е. на полном прекращении всех жизненных процессов, как в сырье, так и в микроорганизмах.

Ни один из принципов, положенных в основу этой классификации, не может быть осуществлен на практике в чистом виде. Однако каждый метод консервирования характеризуется преобладанием какого-либо одного принципа, и поэтому приведенная классификация помогает лучше уяснить сущность этих методов.

Биоз — поддержание в продукте или сырье жизненных процессов, препятствующих развитию микроорганизмов, а также использование естественного иммунитета сырья. Так, в свежесвыдоенном молоке содержатся бактерицидные вещества, губительные для микроорганизмов, которые в течение определенного отрезка времени не могут размножаться (бактерицидная фаза молока).

Анабиоз — подавление биологических и физико-химических процессов, протекающих в сырье, пищевых продуктах и населяющей их микрофлоре. Различают несколько разновидностей анабиоза:

термоанабиоз, ксероанабиоз, осмоанабиоз, наркоанабиоз и ценоанабиоз.

Термоанабиоз — охлаждение (психроанабиоз) и замораживание (криоанабиоз). При охлаждении молока (2-10 °С) снижается биологическая и биохимическая активность микрофлоры и ферментов молока. При замораживании (-12 - -25 °С) ферментные процессы прекращаются и микробная клетка не размножается. В замороженном состоянии можно хранить сырое молоко, сливки, творог, сгущенное молоко.

Ксероанабиоз — прекращение развития микробов путем удаления из продукта воды или доведения ее до минимального количества, при котором микробиологические и ферментные процессы максимально подавляются.

В молочной промышленности применяют сушку молока и молочных продуктов, в которых погибает часть вегетативных форм микробов, а жизнеспособность спор сохраняется. При увлажнении продукта микроорганизмы начинают развиваться, что приводит к его порче.

Осмоанабиоз — подавление развития микроорганизмов созданием высоких концентраций сухих осмотически деятельных веществ в продукте, в результате чего происходит плазмолиз клеток.

Используют консервирующее действие сахарозы, глюкофруктозных сиропов, галактозы в производстве сгущенных молочных консервов с сахаром. Требуемое для эффективного консервирования осмотическое давление 16-18 МПа обеспечивается при концентрации в сгущенном молоке сахарозы 62,5-63,3 % или глюкозы 35-36 %, поскольку молярность растворов глюкозы почти вдвое больше, чем сахарозы. Осмотическое давление 1%-ного раствора сахарозы около 0,07 МПа, глюкозы 0,12 МПа.

Некоторые микроорганизмы адаптируются к повышенному осмотическому давлению и могут развиваться в сгущенных молочных продуктах с сахаром. В связи с этим для предупреждения порчи их необходимо хранить при низких температурах.

Наркоанабиоз — ингибирующее воздействие на микроорганизмы кислорода, углекислого газа, азота. Молоко и сухие продукты хранят в среде азота или углекислого газа.

Ценоанабиоз — подавление жизнедеятельности вредной микрофлоры путем введения полезных микроорганизмов и создания благоприятных условий для их развития. Используется при производстве кисломолочных продуктов, сыра, кисломолочного масла, а также заменителей цельного молока с применением заквасок молочнокислых бактерий, подавляющих развитие гнилостных микробов.

Абиоз — полное прекращение жизненных процессов в сырье, продукте и микрофлоре. Наблюдается при стерилизации продуктов.

Тепловая стерилизация — действие высокой температуры, вызывающей гибель клеток микробов в результате денатурации белка и других необратимых изменений в цитоплазме.

Молоко стерилизуют при высокой температуре (105-107, 130-150 °С).

Лучевая стерилизация осуществляется под действием ультрафиолетовых лучей. Наибольшим бактерицидным свойством обладают лучи с длиной волны 200-295 нм. Применяют для обеззараживания тары, воздуха, поверхности стен, упаковочного материала, поверхности головок сыра и др.

Радиационная стерилизация (радаппертизация) — применение ионизирующих излучений для уменьшения количества микроорганизмов, инаktivации ферментов, дезинсекции пищевых продуктов и сырья.

Облучение молока интенсивностью 1 кДж/кг способствует более продолжительному сохранению его при низких температурах. Однако при обработке молочных продуктов γ -лучами в них появляются посторонние запахи и привкусы, разлагается аскорбиновая кислота и быстро окисляется жир. Все это ограничивает применение ионизирующих излучений в молочной промышленности.

Химическая стерилизация — применение антисептиков и антибиотиков в целях подавления развития микроорганизмов в молочных продуктах.

Антисептики (сорбиновая кислота, сорбаты калия и натрия) добавляют в сгущенные молочные продукты с сахаром для подавления развития плесеней. Так, для подавления шоколадно-коричневой плесени сорбиновую кислоту в количестве 0,02 % массы продукта добавляют на стадии его охлаждения или в сахарный сироп.

Антибиотик низин используют при производстве стерилизованных молочных продуктов. Одновременно с тепловой обработкой он эффективно воздействует на спорообразующие бактерии при относительно мягких режимах. Стерилизацию проводят при 112 °С вместо 118 °С с выдержкой 10-12 мин вместо 18-20 мин.

По принципам консервирования молочные консервы разделяют на три основные группы: по принципу абиоза - стерилизованные молочные консервы; по принципу осмоанабиоза - сгущенные молочные консервы с сахаром; по принципу ксероанабиоза - сухие молочные продукты.

19.2. СТЕРИЛИЗОВАННЫЕ МОЛОЧНЫЕ КОНСЕРВЫ

Среди этой группы консервированных молочных продуктов наибольшее распространение имеет сгущенное стерилизованное молоко, представляющее собой продукт, приготовленный путем сгущения молока цельного, а также смеси его с молоком обезжиренным или сливками и

подвергнутый стерилизации в банках.

К сырому молоку, предназначенному для производства сгущенного стерилизованного молока, предъявляют особые требования по кислотности и степени обсеменения его спорообразующими бактериями.

Изменение микрофлоры в процессе производства. Сгущенное стерилизованное молоко вырабатывают двумя способами: путем ультравысокотемпературной обработки (УВТ) сгущенного молока с последующей асептической закаткой банок и иногда окончательной стерилизацией; путем розлива подготовленного сгущенного молока в жестяные банки с последующей их закаткой и стерилизацией.

При производстве стерилизованного сгущенного молока первым способом размножение сохранившихся спорообразующих бактерий может происходить на участке накопления молока между УВТ-установкой и розливом. Это в первую очередь термофильные спорообразующие *Bac. stearothermophilus*, способные размножаться при 50-55 °С.

При производстве вторым способом стерилизация сгущенного молока в жестяных банках приводит к уничтожению практически всех микроорганизмов. Единичные споры могут сохраниться в отдельных банках вследствие обильного обсеменения и неравномерного прогрета продукта в процессе стерилизации при малейших нарушениях режимов. Могут выживать в молоке после стерилизации споры следующих бацилл: *Bac. subtilis*, *Bac. megatherium*, *Bac. cereus*, *Bac. coagulans*, *Bac. circulans*, *Bac. licheniformis* и др.

Пороки сгущенного стерилизованного молока. При последующем хранении консервов в благоприятных условиях споры могут прорасти и вызвать порчу продукта в отдельных банках. В табл. 48 приведены данные о роли отдельных видов микроорганизмов в порче сгущенного стерилизованного молока.

48. Пороки сгущенного стерилизованного молока

Микроорганизмы	Вызываемые пороки	Условия, способствующие возникновению пороков
<i>Bac. subtilis</i>	Сладкое свертывание, горечь	Наличие кислорода, температура до 37 °С
Анаэробные клостридии, маслянокислые бактерии	Створаживание сгустка, бомбаж	Нарушение режимов стерилизации
<i>Bac. coagulans</i>	Сырный привкус, свертывание	Наличие кислорода
<i>Bac. cereus</i>	Коагуляция на поверхности, образование токсинов	То же
<i>Bac. stearothermophilus</i>	Свертывание, горечь	Температура выше 50 °С

Контроль производства стерилизованного сгущенного молока. По ходу технологического процесса отбирают пробы следующих объектов исследования: сырое молоко, пастеризованное молоко, молоко

из смести для хранения, нормализованное молоко из бака перед вакуум-выпарной установкой, сгущенное молоко после вакуум-выпарной установки (после гомогенизатора), из смести перед фасованием, сгущенное молоко из незакатанной банки после разливочно-укупорочного автомата, из 3-5 закатанных банок с продукцией перед стерилизацией.

Сырое молоко по общей бактериальной обсемененности по редуктазной пробе должно быть не ниже 1-го класса. Количество спор мезофильных и термофильных бацилл и клостридий не должно превышать 100 в 1 см³.

В пастеризованном молоке общее количество бактерий должно быть не более 5 тыс. в 1 см³, а в сгущенном молоке не более 10 тыс. в 1 см³. Количество спор мезофильных и термофильных микроорганизмов не более 10 в 1 см³.

В случае повышенного бактериального обсеменения сгущенного молока перед стерилизацией необходимо дополнительно проверить все стадии технологических процессов в целях выяснения мест загрязнения. Одновременно контролируют санитарно-гигиеническое состояние оборудования.

Молоко сгущенное стерилизованное в банках должно удовлетворять требованиям промышленной стерильности и не содержать патогенных микроорганизмов или их токсинов.

Готовую продукцию для бактериологического контроля отбирают от каждой партии по 5 банок (образцов), проверенных на герметичность. Образцы термостатируют при 37 °С в течение 6 сут. После этого банки осматривают. При вздутии крышки или доннышка, не опадающего при нажиме пальцами, банка с продуктом считается бомбажной. Банки без дефектов вскрывают и анализируют органолептически, по титруемой кислотности, по микроскопическому препарату.

В сгущенном молоке после термостатирования не должно происходить изменений органолептических и физико-химических свойств, а в микроскопическом препарате клетки и споры микробов не должны обнаруживаться.

Кислотность сгущенного стерилизованного молока в банках должна составлять не более 50 °Т.

19.3. СГУЩЕННЫЕ МОЛОЧНЫЕ КОНСЕРВЫ С САХАРОМ

Это пищевые продукты, получаемые из пастеризованного коровьего цельного или обезжиренного молока, пахты или молока с добавлением сливок путем выпаривания из молока некоторой части воды и консервирования его сахарозой (свекловичным или тростниковым сахаром). В качестве вкусовых наполнителей используют также какао, кофе, кофейный напиток. Среди этих продуктов наиболее высокой

пищевой ценностью отличается сгущенное молоко с сахаром. По степени сбалансированности белков, жиров и углеводов оно несколько уступает цельному молоку, но зато хорошо сохраняется при комнатных условиях.

Источники обсеменения и изменение микрофлоры в процессе производства сгущенного молока с сахаром. В процессе производства сырое молоко нагревают до 95-120 °С, смешивают с сахарным сиропом (растворенным в воде сахаром) при 95 °С, чтобы обеспечить содержание 41,5-42 % сахара в готовом продукте, и выпаривают под вакуумом до соотношения сгущенного молока и сахара 2,5 : 1, затем быстро охлаждают для кристаллизации лактозы.

В вакуум-выпарной установке может происходить размножение термофильных спорообразующих микроорганизмов, находящихся на оборудовании после плохой мойки и дезинфекции. В процессе охлаждения и кристаллизации может произойти вторичное обсеменение. При розливе молока с сахаром может также происходить обсеменение продукта из воздуха, особенно если помещение для варки сиропа сообщается с цехом розлива.

Сгущенное молоко с сахаром не является стерильным продуктом. Наиболее опасными микроорганизмами являются дрожжи, микрококки и плесневые грибы, спорообразующие бактерии и другие осмофильные микроорганизмы, способные размножаться при высоких концентрациях сахара.

Микрококки могут выживать при пастеризации, поэтому во время хранения консервов их количество в литре 1,0-1,5 мес может увеличиться от 10^2 до 10^6 в 1 см^3 продукта. Затем начинается отмирание, и к концу года их содержание приближается к первоначальному. В сгущенном молоке с сахаром могут развиваться таким же образом и коагулоположительные стафилококки.

Бактерии группы кишечных палочек могут попадать в консервы на последней стадии производства - в момент фасования, но в дальнейшем не находят благоприятных условий для развития и при хранении продукта отмирают.

Спорообразующие термофильные бактерии, выживая в процессе пастеризации, могут впоследствии размножаться при длительном процессе сгущения. Однако в дальнейшем условий для их размножения не создается и они редко рассматриваются как возбудители пороков сгущенного молока с сахаром.

Дрожжи, сбраживающие сахарозу, интенсивнее размножаются при повышенной кислотности молока и пониженной концентрации сахара. Переносчиками дрожжей чаще всего служат непроваренный сахарный сироп, воздух, тара и руки рабочих. Развитие дрожжей в готовом продукте особенно интенсивно происходит в первые 15-30 дней после выработки. Впоследствии дрожжи постепенно отмирают, поэтому в

старых банках с явно выраженным бомбажом дрожжи могут быть не обнаружены.

Плесени развиваются на поверхности продукта или на внутренней поверхности крышки банки. Для предупреждения плесневения рекомендуется мыть и обсушивать банки и крышки, закрывать банки под вакуумом (при разрежении), хранить молоко при низкой температуре. Рекомендуется также устанавливать бактерицидные лампы над конвейером в тех местах, где проходят открытые банки со сгущенным молоком.

Пороки сгущенного молока с сахаром. Основные виды микроорганизмов, обнаруживаемые в сгущенном молоке с сахаром, источники их попадания, условия, способствующие размножению, и влияние на качество приведены в табл. 49.

49. Пороки сгущенного молока с сахаром

Микроорганизмы	Условия, способствующие размножению	Вызываемые пороки
Термофильные спорообразующие бактерии	Длительное пребывание в вакуум-выпарной установке	Горький вкус, коагуляция
Микрококки, стафилококки	Накопление на оборудовании, размножение при хранении	Прогорклый и горький вкус, зауставание
Дрожжи	Длительное хранение	Бомбаж
Плесневые грибы рода <i>Catenularia</i>	То же	Плесневение, образование шпигунца

Контроль производства сгущенного молока с сахаром. Не реже одного раза в декаду контролируют сырье, направляемое на выработку сгущенного молока с сахаром, какао, кофе.

В каждой партии выпускаемых молочных консервов определяют содержание бактерий группы кишечных палочек. Общее количество бактерий в готовом продукте и по ходу технологического процесса ustanавливают 1 раз в месяц.

По микробиологическим показателям продукты должны отвечать следующим нормативным требованиям:

- сгущенное цельное молоко с сахаром - бактерий группы кишечных палочек не допускаются в 1 г продукта, фасованного в потребительскую тару, и в 0,3 г продукта, фасованного в транспортную тару. Общая бактериальная обсемененность не должна превышать 25 тыс. клеток в 1 г;
- какао со сгущенным молоком и сахаром, сливки сгущенные с сахаром, кофе натуральный со сгущенным молоком и сахаром - бактерии группы кишечных палочек не должны содержаться 1 г продукта, общее количество не должно превышать 35 тыс. клеток в 1 г.

Для всех видов продуктов патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, не допускаются в 2 г.

Кроме того, сгущенное молоко с сахаром проверяют 1 раз в 5 дней на наличие дрожжей и плесеней. Иногда в свежесывабранном продукте из исследуемых объемов (0,1 см³ и меньше) не удастся высеять дрожжи, а при хранении консервов, особенно при повышенных температурах (25-30 °С), обнаруживается бомбаж. Поэтому партии сгущенного молока с сахаром, экспортируемые в зарубежные страны или в районы с жарким климатом, рекомендуется выдерживать в течение 10 дней при 25 °С, а затем определять в этих образцах содержание дрожжей. Если при посеве обнаружены дрожжи, то появляется опасность, что при дальнейшем хранении консервов возникнет бомбаж.

Сгущенные молочные консервы следует периодически проверять на содержание протеолитической и липолитической микрофлоры, которая биохимически очень активна и может вызвать в процессе хранения различные пороки готового продукта. Это в основном относится к микрококкам, обладающим высокой протеолитической и липолитической активностью. В процессе хранения сгущенных молочных консервов, содержащих микрококки, могут развиваться пороки вкуса в связи с липолизом жира и протеолизом белка.

Одновременно с отбором проб для контроля технологического процесса отбирают пробы для контроля санитарно-гигиенического состояния оборудования и цеха. При контроле чистоты мойки оборудования определяют общее количество бактерий, БГКП, а также периодически количество дрожжей, протеолитических и липолитических бактерий.

19.4. СУХИЕ МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ

Продукты получают из сгущенного цельного или обезжиренного молока, сливок и пахты высушиванием на распылительных или вальцовых сушильных установках.

К основным видам сухих молочных продуктов относят молоко коровье цельное сухое 20%-ной и 25%-ной жирности, молоко сухое «Домашнее», молоко коровье обезжиренное сухое, сливки сухие, сливки сухие высокожирные, продукты сухие кисломолочные, пахту сухую. Изготавливают также сухие молочные продукты с растительными компонентами.

Источники обсеменения и изменение микрофлоры в процессе производства сухого молока. При производстве сухого молока не достигается полного уничтожения микроорганизмов. Сохраняемость продукта обусловлена низким содержанием влаги (не более 5 %), поэтому увлажнение сухого молока приводит к быстрой его порче. Из микрофлоры сырого молока после пастеризации остаются споры

бактерий родов *Bacillus* и *Clostridium*, а также термостойчивые клетки энтерококков, микрококков, стафилококков.

Психротрофные бактерии погибают при термической обработке молока, однако вырабатываемые ими в сыром молоке протеолитические ферменты при пастеризации не разрушаются и впоследствии при хранении готового продукта могут отрицательно влиять на его вкус вследствие разложения белков.

Это обусловлено тем, что при сушке распылением температура капелек молока достигает лишь 60-90 °С, которая оказывает относительно небольшое губительное действие на микроорганизмы. При последующих операциях - охлаждении, транспортировании, упаковывании - может происходить дополнительное вторичное обсеменение продукта, в том числе и бактериями группы кишечных палочек, спорами плесеней и др.

Особенно опасны при производстве сухого молока патогенные и энтеротоксигенные микроорганизмы, которые могут в дальнейшем размножаться при восстановлении сухого молока. К таким бактериям относят сальмонеллы, патогенные стафилококки и *Vac. cereus*, являющиеся возбудителями пищевых отравлений.

Термофильные молочнокислые стрептококки и энтерококки могут развиваться в молоке в процессе выпаривания, особенно при пониженных температурах. При распылительной сушке в готовом продукте они составляют основную часть общей бактериальной обсемененности.

В 1 г сухого молока допускается до 100 клеток коагулазоположительных стафилококков, а в 1 г восстановленного молока - 5×10^5 клеток.

Бактерии группы кишечных палочек в процессе производства практически не размножаются и могут служить показателем санитарно-гигиенического состояния производства при контроле свежесывабранной продукции, так как при хранении эти микроорганизмы в сухом молоке отмирают.

Споры плесневых грибов попадают в продукт из воздуха и главным образом с транспортирующего и упаковочного оборудования. Впоследствии они вызывают плесневение готового продукта при хранении, если он подвергается увлажнению.

Пороки сухого молока. При нарушении условий хранения и повышенной влажности воздуха в складском помещении возможны увлажнение сухого молока и возникновение пороков. Основные виды микроорганизмов, обнаруживаемые в сухом молоке, и влияние их на качество продукта показаны в табл. 50.

50. Пороки сухого молока

Микроорганизмы	Условия, способствующие размножению	Вызываемые пороки
<i>Bac. subtilis</i> , <i>Bac. cereus</i>	При восстановлении сухого молока	Неприятный вкус
<i>Bac. stearothermophilus</i>	Длительное пребывание в вакуум-выпарной установке	Пороки вкуса
<i>Str. thermophilus</i> , <i>Ent. durans</i> , <i>Ent. faecalis</i>	Задержка в трубопроводах, длительное пребывание в вакуум-выпарных установках при пониженных температурах	Образование кислоты, горький вкус
Стафилококки	Задержка в трубопроводах, резервуарах	Горький вкус
Психротрофные бактерии	Низкие температуры и длительные сроки хранения	Распад белка при хранении, горький, прогорклый вкус
Плесневые грибы (<i>Mucor</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i>)	Увлажнение продукта в процессе хранения	Плесневение

Контроль производства. Контроль технологического процесса производства сухих молочных консервов проводят не реже одного раза в месяц. Каждую партию контролируют по двум показателям: содержание общего количества бактерий и бактерий группы кишечных палочек. При контроле детских сухих смесей также определяют количество дрожжей, плесеней, *E. coli*, *Bac. cereus*, *Staph. aureus*, патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы.

Общее количество бактерий в 1 г сухого цельного молока высшего сорта должно составлять до 50 тыс., а первого сорта - 70 тыс. клеток. В обезжиренном сухом молоке для непосредственного потребления общая бактериальная обсемененность должна составлять до 50 тыс., а для промышленной переработки - 100 тыс. клеток в 1 г.

Бактерии группы кишечных палочек в сухих молочных продуктах не должны обнаруживаться в 0,1 г. Наличие патогенных микроорганизмов не допускается в 25 г продукта.

Наряду с контролем технологического процесса производства сухого молока также контролируют санитарно-гигиеническое состояние производства (оборудования, цеха и др.).

19.5. МИКРОБИОЛОГИЯ МОРОЖЕНОГО

Источники обсеменения мороженого микроорганизмами. Под мороженым понимают твердые или пастообразные молочные продукты, получаемые из пастеризованной массы, замороженной при сильном взбивании, в результате которого объем массы за счет насыщения воздухом увеличивается на 20-120 %.

Основным сырьем для приготовления мороженого являются молоко, сухое молоко и сливки. Кроме того, используют другие продукты растительного или животного происхождения, а также

различного рода добавок.

В зависимости от исходных компонентов различают следующие виды мороженого: цельномолочное (цельное молоко или сухое цельное молоко), пломбир (с высоким содержанием яиц), фруктовое (фрукты или изделия из фруктов в качестве добавок), простое (обезжиренное молоко или сухое обезжиренное молоко), сливочное (минимально 10 % молочного жира), сливочное простое с растительным жиром (минимально 3 % жира) и др.

Во всех видах мороженого важной составной частью является сахароза (10-15 %). Добавками могут быть свежий белок, сухой лед, пищевая вода, масло, молочный белок, кофе, какао, шоколад, миндаль, орехи, вино, природные эссенции, ванилин, глюкоза, фруктоза, лактоза, пищевые органические кислоты, связующие вещества (эфир, целлюлоза, пектин, агар-агар, желатин, крахмал, амилпектин), жиродержащая глазурь, пищевые красители и др.

Большое разнообразие сырья и добавок, используемых для изготовления смеси для мороженого, приводит к содержанию в ней многих видов микроорганизмов.

Основными источниками обсеменения мороженого могут служить сырье и добавки, оборудование, вода, воздух, обслуживающий персонал, упаковочные материалы и др. Длительное таяние мороженого перед употреблением может привести к интенсивному размножению микроорганизмов, имеющихся в перерабатываемой массе.

Пригодность компонентов для производства мороженого определяется количеством в них микроорганизмов и качественным составом микрофлоры. В используемых для приготовления мороженого молоке и молочных продуктах до пастеризации могут накапливаться ферменты микробов и продукты их обмена, обуславливающие изменение органолептических свойств мороженого (прогорклый, кислый привкус).

Из оставшихся после пастеризации молока жизнеспособных микробов на качество мороженого могут влиять бациллы, термоустойчивые микрококки и энтерококки, а после вторичного обсеменения - клетки *E. coli*.

В яйцах и яичных продуктах, используемых при производстве мороженого, могут присутствовать сальмонеллы и β-гемолитические стрептококки, которые сохраняются при нарушении режимов пастеризации смеси или вследствие вторичного обсеменения, особенно при совместном хранении сырья и готовых продуктов.

Шоколад и какао-порошок в значительной степени свободны от влаги, и поэтому развития микроорганизмов в них не наблюдается.

В них часто выявляются споры бацилл и реже - осмодильные дрожжи и плесневые грибы.

Сахароза в кристаллической форме не является средой для развития

микроорганизмов, но часто загрязнена осмофильными дрожжами.

Из связующих веществ наибольшее количество микроорганизмов содержит желатин, получаемый из отходов животного происхождения. В нем часто находятся споры бацилл и клостридий, бактерии группы кишечных палочек и др.

Флоды, плодовые изделия, орехи часто бывают заражены дрожжами и плесневыми грибами. Последние способны продуцировать афлатоксин и другие микотоксины, обладающие канцерогенным действием, т. е. влиянием, способствующим возникновению опухолей.

Вода, используемая в производстве мороженого, должна отвечать стандартам на питьевую воду. Упаковочный материал также может служить источником загрязнения.

При сбыте мороженого к числу источников загрязнения, подлежащих контролю, относят фасовочные устройства (шпильки, дозаторы), воду, в которую кладут порционирующие приспособления. В связи с этим целесообразно помещать порционирующие приспособления в 1,5%-ный раствор лимонной или винной кислоты.

Контроль производства мороженого. Контроль производства мороженого включает контроль санитарно-гигиенических условий производства, технологического процесса и готового продукта.

Санитарно-гигиенические условия производства мороженого контролируют по общей схеме с учетом специфики производства, оборудования, инвентаря и материалов. Для контроля эффективности мойки и дезинфекции оборудования, инвентаря и рук производственного персонала проводят санитарно-микробиологическое исследование смывов на выявление бактерий группы кишечных палочек.

Контроль технологического процесса производства мороженого предусматривает контроль сырья, смеси для мороженого - до и после пастеризации, различных наполнителей (сиропов, гарниров, джемов и др.). В пробах из всех названных объектов определяют общее количество бактерий и содержание бактерий группы кишечных палочек.

В молочных продуктах, используемых для изготовления мороженого, могут содержаться различные микроорганизмы в количестве от десятков до сотен тысяч в 1 см³.

В смеси для мороженого после пастеризации общее количество бактерий не превышает 1 тыс. клеток в 1 см³, а бактерии группы кишечных палочек не обнаруживаются в 0,01 г.

Каждую партию желатина, используемого для производства мороженого, контролируют на общую бактериальную обсемененность, содержание БГКП и аэробных спорообразователей.

В других связующих веществах обычно обнаруживают бактерии группы кишечных палочек, дрожжи, плесени и другие микроорганизмы, общее количество которых составляет десятки тысяч в 1 см³.

В готовом продукте определяют общую бактериальную обсемененность, содержание БГКП, *Staph. aureus*, а при необходимости - наличие патогенных микробов. Общая обсемененность должна составлять не более 100 тыс. клеток в 1 г, присутствие БГКП не допускается в 0,01-0,1 г, а золотистого стафилококка - в 1 г. Патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, не должны выявляться в 25 г мороженого (табл. 51).

51. **Микробиологические показатели мороженого**

Вид продукта	КМАФАнМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта (г, см ³), в котором не допускается		
		БГКП (колиформы)	патогенные, в том числе сальмонеллы	<i>Staph. aureus</i>
Мороженое на молочной основе	1x10 ⁵	0,01	25	1,0
Мороженое мягкое из жидких смесей	1x10 ⁵	0,1	25	1,0
Мороженое мягкое из сухих смесей	1x10 ⁵	0,1	25	1,0
Жидкие смеси для мягкого мороженого	3x10 ⁴	0,1	25	1,0

МИКРОБИОЛОГИЯ ВТОРИЧНОГО МОЛОЧНОГО СЫРА

Молочная сыворотка, пахта и обезжиренное молоко являются важным сырьевым резервом в производстве пищевых продуктов, которые содержат комплекс биологически активных веществ при минимальной энергетической ценности.

Широкое использование этих продуктов питания позволяет оказывать оздоровительно-профилактическое действие в предупреждении ожирения и сердечно-сосудистой патологии.

20.1. МОЛОЧНАЯ СЫВОРОТКА

При производстве сыров, творога, казеина получают молочную сыворотку: подсырную, творожную или казеиновую. В сыворотке содержится 50 % сухих веществ молока, в их числе тонкодиспергированный молочный жир, растворимые азотистые соединения и минеральные соли, а также витамины, ферменты, органические кислоты. Все виды молочной сыворотки являются источником молочного сахара (лактозы), содержание которого составляет более 70 % сухого вещества. Наряду с пищевой ценностью молочная сыворотка и продукты, получаемые из нее, имеют диетическое и даже лечебное значение.

По органолептическим и физико-химическим показателям сыворотка должна отвечать требованиям ГОСТа. Она представляет собой однородную жидкость зеленоватого цвета, без посторонних примесей, допускается наличие белкового осадка. Вкус и запах чистые, свойственные молочной сыворотке, для казеиновой и творожной - вкус слегка кисловатый, для подсырной - от солоноватого до соленого.

Молочная сыворотка является хорошей питательной средой для развития микроорганизмов. В ней быстро размножаются различные группы микробов, происхождение которых связано как с остаточной, термостойкой и термофильной микрофлорой пастеризованного молока, так и с микрофлорой заквасок, используемых при производстве белковых продуктов.

Среди микрофлоры, оставшейся после пастеризации, имеются представители спорообразующих и неспорообразующих бактерий. Большинство термостойких микробов являются мезофилами, они не развиваются при температурах пастеризации, но, когда температура понижается, возобновляют свой рост.

Среди остаточной микрофлоры из рода *Streptococcus* наиболее часто встречается *Str. thermophilus*, а также энтерококки - *Ent. faecalis* biovar. *liquefaciens* и biovar. *zymogenes*, *Ent. faecium* biovar. *bovis*.

При этом часто в сыворотке присутствует наиболее термостойкий вид среди всех беспоровых бактерий - *Microbacterium lacticum*.

В летнем молоке и соответственно в летней сыворотке термостойких бактерий значительно больше, чем в зимнем. В ней могут встречаться и психрофильные бактерии родов *Pseudomonas*, *Achromobacter* и *Flavobacterium*. При длительном хранении охлажденной сыворотки эти бактерии могут обуславливать различные пороки вкуса и запаха (нечистый, гнилостный, фруктовый, прогорклый и др.).

Среди заквасочных микроорганизмов, вводимых в молоко при производстве различных сыров и творога, имеются представители молочнокислой микрофлоры, пропионовокислые бактерии, плесневые грибы и дрожжи.

Кроме перечисленных микроорганизмов в молочной сыворотке имеется значительное количество представителей вторичного обсеменения, возникающего в ходе технологического процесса. Это бактерии группы кишечных палочек, гнилостная микрофлора, кокковые микроорганизмы и др.

Развитие микрофлоры в молочной сыворотке в процессе хранения может существенно влиять на ее сохранность и изменение компонентов. При этом предельная кислотность может достигать 300 °Т и выше. С такой кислотностью молочная сыворотка непригодна как сырье для производства молочного сахара, так как повышение титруемой кислотности до 100 °Т ведет к потере более 20 % лактозы.

Для консервирования сыворотки используют тепловую обработку и химические вещества. При тепловой обработке сыворотку нагревают до 70-75 °С с последующим охлаждением до 6-8 °С.

Из консервантов применяют 30%-ный раствор пероксида водорода в количестве 0,03 %; хлорид натрия - 5-10 %; сорбиновую кислоту с оптимальной дозой 0,05 %. Для сохранения сыворотки ее сгущают или сушат.

В настоящее время из молочной сыворотки вырабатывают более 25 видов различных продуктов: белковые концентраты, напитки, продукты биологической обработки, молочный сахар, сгущенные и сухие продукты, мороженое, сыры и др.

Использование молочной сыворотки в производстве хлебобулочных, кондитерских и колбасных изделий позволяет обогатить их полноценными белками животного происхождения, улучшить потребительские и биологические качества. Молочную сыворотку широко используют в сельском хозяйстве: получение альбумина для корма скота и птицы, приготовление бактериальных заквасок для силосования кормов, сухого и жидкого концентрата и др. Молочный сахар, получаемый из сыворотки, используется в медицинской промышленности для производства антибиотиков, в пищевой

промышленности и производстве продуктов для детского питания.

Микробиологический контроль продуктов, вырабатываемых из молочной сыворотки, осуществляют по общепринятым методикам. Например, концентрат сывороточный белковый (полученный методом ультрафильтрации и электродиализа) исследуют для определения общей бактериальной обсемененности, наличия бактерий группы кишечных палочек и патогенных микроорганизмов. При этом количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 г концентрата не должно превышать 5×10^4 , бактерии группы кишечных палочек не должны обнаруживаться в 1,0 г, а патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, не должны выявляться в 25 г продукта.

20.2. ПАХТА

Пахта является ценным молочным сырьем для производства широкого ассортимента продуктов питания. Она образуется при сбивании или сепарировании сливок в процессе маслообразования. При невысокой энергетической ценности пахты и низком уровне липидов в ней содержится значительное количество биологически активных антиатеросклеротических веществ, объединенных общим названием «фосфолипиды». Содержание фосфолипидов в пахте более чем в два раза превышает их содержание в масле.

Состав и свойства пахты зависят от метода производства и вида вырабатываемого масла, особенно они различаются при выработке сладко- и кисломолочного масла.

По органолептическим показателям пахта представляет собой однородную жидкость без осадка и хлопьев, белого или слабо-желтого цвета. Вкус и запах пахты, полученной при производстве сладкомолочного масла, чистые, молочные, свойственные пахте, допускается слабокормовой привкус. Пахта, полученная при производстве кисломолочного масла, должна иметь кисломолочные, чистые вкус и запах, допускается слабокормовой привкус.

По физико-химическим показателям пахта должна соответствовать следующим требованиям: кислотность не более 20 и 40 °Т соответственно сладко- и кисломолочного масла. Плотность при температуре 20 °С не менее 1,027 г/см³ независимо от метода производства и вида вырабатываемого масла.

Количественный и качественный состав микрофлоры пахты соответствует составу микрофлоры сливок, используемых для переработки. Общее количество бактерий допускается до 4 млн клеток в 1 см³. Качественный состав микрофлоры пахты представлен спорообразующими и термоустойчивыми микроорганизмами, а также микрофлорой вторичного (после пастеризации сливок) обсеменения - молочнокислыми бактериями, бактериями группы кишечных палочек,

энтерококками, гнилостными микроорганизмами.

Пахта не должна содержать патогенных микроорганизмов, в том числе и сальмонелл, в 25 см³.

При необходимости хранения и транспортирования пахту охлаждают до температуры не выше 10°С и хранят в закрытых резервуарах. Пахту можно сушить и сушить, при этом все компоненты, содержащиеся в исходной пахте, концентрируются, что оказывает консервирующий эффект.

Возможность использования пахты для выработки различных молочных продуктов предопределяется коагуляцией белков под действием различных факторов - молочной кислоты, сычужного фермента, хлорида кальция и др.

При заквашивании пахты чистыми культурами мезофильных молочнокислых стрептококков образуется в меру плотный сгусток. При использовании для сквашивания пахты бактериальных заквасок термофильного стрептококка процесс geleобразования ускоряется на 2-3 ч, кислотность сгустка увеличивается.

При заквашивании пахты культурами болгарской и ацидофильной палочек получают сгустки с малой величиной синерезиса. Использование чистой культуры слизееобразующих штаммов ацидофильной палочки обуславливает получение сгустка тягучей консистенции.

Из пахты выпускают продукты более 40 наименований: кисломолочные напитки (пахта сладкая, кефир из пахты), концентраты (пахта сгущенная с сахаром, пахта сухая, сливочная паста и др.), творог и творожные изделия, мороженое, сыры и др.

Микробиологический контроль и оценку санитарного состояния продуктов, получаемых из пахты, проводят по общепринятым показателям. Например, в напитке из пахты «Новинка» не допускается содержание бактерий группы кишечных палочек в 0,1 см³, а патогенные микроорганизмы, в том числе и сальмонеллы, не должны выявляться в 25 см³ продукта.

20.3. ОБЕЗЖИРЕННОЕ МОЛОКО

Обезжиренное молоко получают в результате сепарирования цельного молока с разделением на концентрат жировой фазы (сливки) и плазму (обезжиренное молоко). От цельного обезжиренное молоко отличается пониженной массовой долей жира и соотношением между жиром и нежировыми компонентами.

Состав и качество обезжиренного молока определяются таковыми исходного молока. По органолептическим показателям оно представляет собой однородную жидкость без посторонних механических примесей, цвет - белый со слегка синеватым оттенком, вкус и запах - чистые, без посторонних привкусов и запахов, допускается слабый кормовой

привкус. Кислотность обезжиренного молока не должна превышать 19 °Т, плотность - не менее 1,028 г/см³. Массовая доля жира не должна превышать 0,05 %.

Количественный и качественный состав микрофлоры обезжиренного молока зависит от микрофлоры исходного цельного молока, от условий сепарирования и санитарного состояния используемого оборудования. При этом остаточная микрофлора пастеризованного молока представлена спорообразующими бактериями и клостридиями, термостойкими молочнокислыми бактериями, энтерококками, бактериофагами и др. После вторичного обсеменения помимо остаточной микрофлоры в обезжиренном молоке могут обнаруживаться молочнокислые стрептококки и палочки, бактерии группы кишечных палочек, стафилококки и другие микрококки, гнилостная неспорообразующая микрофлора, споры дрожжей, плесеней.

В связи с обсеменением обезжиренного молока различной микрофлорой его сразу после получения необходимо направлять на промышленную переработку. Если молоко направляют на другие предприятия, его пастеризуют при температуре 72 °С с выдержкой 20 с или при температуре 86 °С без выдержки с последующим охлаждением до температуры не выше 8 °С. Допускается (по договоренности сторон) отгрузка непастеризованного обезжиренного молока, охлажденного до температуры 8 °С и ниже. Разрешается хранение пастеризованного обезжиренного молока до переработки не более 36 ч.

К основным разновидностям молочных продуктов, выработываемых из обезжиренного молока или с его использованием, относят питьевое нежирное молоко, кисломолочные напитки (кефир нежирный, простокваша нежирная, ацидофильные напитки, йогурт), белковые кисломолочные продукты (творог нежирный, творожные изделия, кисломолочный сухой нежирный продукт), молочнобелковые пасты, сыры (сыр диетический, сыр рассольный обезжиренный и др.), молочные консервы (молоко сгущенное обезжиренное, молоко нежирное сгущенное с сахаром, молоко обезжиренное сухое), молочнобелковые концентраты (казеин технический, казеин пищевой кислотный, белок молочный пищевой, белок сухой молочный пищевой).

Микробиологический контроль производства молочных продуктов, выработываемых из обезжиренного молока, проводят по общепринятым методикам в соответствии с утвержденными схемами. Например, молоко коровье сухое обезжиренное для непосредственного употребления должно содержать в 1 г. колониеобразующих единиц не более 5×10^4 , бактерию группы кишечных палочек не должны выявляться в 0,1 г, патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, - в 25 г продукта.

ОСНОВЫ ПРОМЫШЛЕННОЙ САНИТАРИИ НА ПРЕДПРИЯТИЯХ МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Санитарно-эпидемиологическое качество молочных продуктов обуславливается наличием в них патогенных и других микроорганизмов. В связи с этим на предприятиях молочной промышленности необходимо неукоснительно соблюдать санитарно-гигиенические правила, направленные на создание должного санитарного режима производства продукции гарантированного качества.

Для обеспечения выпуска высококачественной, безвредной в эпидемическом отношении продукции на молокоперерабатывающих предприятиях организуется санитарно-микробиологический контроль, на основании данных которого дается оценка санитарно-гигиенического состояния производства и готовой продукции.

При проведении микробиологического контроля основным определяемым показателем является наличие санитарно-показательных микроорганизмов.

21.1. ПОНЯТИЕ О ГИГИЕНЕ И САНИТАРИИ

Гигиена (от греч. *hygienos* - приносящий здоровье) - наука, изучающая влияние внешней среды на здоровье человека. Она неразрывно связана с санитарией (от лат. *sanitas* - здоровье), так как на основании рекомендаций гигиены органы Санэпиднадзора разрабатывают методы и средства оздоровления (санации) внешней среды.

Гигиена имеет ряд направлений: общая, личная, пищевая, школьная, промышленная, коммунальная, транспортная и др.

Санитария - наука о профилактике инфекционных и инвазионных болезней людей, о получении продуктов, сырья и кормов животного происхождения высокого санитарного качества. Разделами промышленной санитарии являются дезинфекция, дезинсекция, дератизация и дезодорация.

Дезинфекция (от лат. *infectio* - инфекция и французского *des* - уничтожение) - наука, изучающая способы и средства уничтожения патогенных микроорганизмов. Наряду с дезинфекцией используют мероприятия, направленные на уничтожение микроорганизмов: обезвреживание объектов внешней среды, стерилизацию и пастеризацию.

При обеззараживании объектов внешней среды происходит уничтожение не только патогенных микроорганизмов, но и выделенных ими продуктов жизнедеятельности - токсинов с

одновременной ликвидацией агрессивных и опасных для жизни человека и животных химических веществ. Химические вещества, применяемые для уничтожения микроорганизмов, называют дезинфицирующими или антисептическими.

Под **антисептикой** понимают уничтожение при помощи физических или химических средств микроорганизмов, попавших в продукт или на оборудование.

А с е п т и к а - это мероприятия, направленные на предупреждение попадания микроорганизмов в продукты из окружающей среды. Молоко, получаемое в условиях, когда в него не попадают микробы извне, называется асептическим.

Д е з и н с е к ц и я - методы и средства борьбы с членистоногими.

Д е р а т и з а ц и я - методы и средства борьбы с грызунами.

Д е з о д о р а ц и я - это устранение неприятных запахов. Для дезодорации производственных цехов применяют приточно-вытяжную вентиляцию, а для дезодорации объектов - растворы перманганата калия, хлорамина и осветленные растворы хлорной извести с содержанием активного хлора 0,1-0,2 %. Режимы дезодорации изложены в специальных рекомендациях.

21.2. ОБЩИЕ САНИТАРНО-ГИГИЕНИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ПРЕДПРИЯТИЯМ МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Вопросы санитарии и гигиены должны быть в центре внимания при проектировании и строительстве предприятий, при благоустройстве территории и при комплектке технологического оборудования в цехах, при организации технологического процесса производства продукции от приемки сырья до отправки ее в торговую сеть.

При строительстве предприятий молочной промышленности учитывают наличие сырьевой базы и подъездных путей, спуска сточных вод, обеспечение питьевой водой, а также направление господствующих ветров. С целью предупреждения загрязнения окружающей среды строят местные очистные сооружения и скважины для забора питьевой воды. Городские молочные заводы подключают к городскому водопроводу и канализационной сети. Предприятия сооружают с наветренной стороны по отношению к санитарно-техническим сооружениям и другим промышленным предприятиям и с подветренной стороны - к жилым и культурно - бытовым зданиям. Санитарно-защитная зона для молочных заводов должна быть не менее 50 м, для сыродельных - 100 м.

Уровень грунтовых вод должен быть не менее чем на 0,5 м ниже пола нижнего этажа здания. Сооружения на территории предприятия располагают в такой последовательности, чтобы обеспечить поступление сырья и вывоз готовой продукции без встречных или перекрестных путей с поступающим топливом, вывозом мусора и отходов.

В воротах предприятия устраивают дезинфекционный барьер для обеззараживания колес автотранспорта, который заполняют 2%-ным раствором едкого натра. У входа в предприятие устанавливают скребки или решетки для очистки обуви от грязи и дезинфекционные коврики.

Топливо, тару, строительные материалы и т. п. хранят на складах или специально отведенных площадках на расстоянии не менее 25 м от производственного корпуса. Мусороприемники и неканализованные уборные располагают от производственных и складских помещений на расстоянии не менее 25 м. Территорию предприятия ежедневно убирают, мусор и отходы из бачков и контейнеров удаляют ежедневно с последующей их дезинфекцией.

Территория предприятия должна быть огорожена. Свободные участки ее озеленяют древесно-кустарниковыми насаждениями. Хозяйственную часть территории отделяют от производственной зелеными насаждениями шириной не менее 3 м.

21.3. САНИТАРНО-ГИГИЕНИЧЕСКИЕ МЕРОПРИЯТИЯ НА ПРЕДПРИЯТИЯХ МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

На молочном заводе санитарно-гигиенические мероприятия проводят в соответствии с Санитарными правилами для предприятий молочной промышленности.

Мылка и дезинфекция. Обычно дезинфекция предшествует мойке, цель которой - полное удаление с оборудования и других предметов остатков молока и иных загрязнений. Водные растворы моющих средств должны обеспечивать чистоту обрабатываемых ими поверхностей оборудования, инвентаря и т. п. Моющим и дезинфицирующим средством может быть однородное химическое вещество или смесь химических соединений. Они не должны оказывать вредного воздействия на организм человека и разрушать материалы, из которых создано оборудование.

Дезинфицирующие вещества можно разделять на органические и неорганические. Из органических веществ наибольшее значение имеют фенол (карболовая кислота), крезол, формалин. Губительно действуют на микроорганизмы органические кислоты - салициловая, масляная, уксусная, бензойная, молочная и др.

Из неорганических соединений сильными ядами для микробов являются соли тяжелых металлов (Ag, Hg), ионы некоторых тяжелых металлов (Au, Cu, Zn, Ag). Ионы серебра, находясь в растворах в ничтожно малых концентрациях, не поддающихся химическому обнаружению, губительно действуют на микроорганизмы. Такое действие называют олигодинамическим. На этом действии основан метод очистки и дезинфекции воды при помощи фильтров из осеребренного песка.

Бактерицидным свойством обладают многие окислители (хлор, гипохлорит натрия, гипохлорит кальция, йод, озон, пероксид водорода, перманганат калия), минеральные кислоты (сернистая, борная, фтористоводородная), щелочи и щелочные вещества, некоторые газы (сероводород, сернистый газ, оксид углерода, диоксид углерода).

Большое практическое значение имеет углекислый газ. Наличие в воздухе 20-30 % CO_2 значительно тормозит развитие многих микроорганизмов. Особенно чувствительны плесени, интенсивность размножения которых при 20%-ном содержании CO_2 снижается на 50-80 %, а при 50%-ном содержании CO_2 рост большинства плесеней прекращается.

Для мойки оборудования на молочных предприятиях в основном применяют следующие химикаты: кальцинированную соду, жидкое стекло, тринатрийфосфат, каустическую соду, азотную кислоту и синтетические моющие средства, разрешенные органами здравоохранения.

Для мойки технологического оборудования и посуды применяют моющие смеси (табл. 52), которые могут быть заказаны на химическом заводе или приготовлены путем смешивания компонентов на молочных предприятиях.

52. Моющие смеси

Номер смеси	Состав смеси, %			
	Сода каустическая	Сода кальцинированная	Тринатрийфосфат	Жидкое стекло
1	-	50	40	10
2	-	18,5	18,5	63
3	10	50	35	5
4	65	-	30	5

Смесь 1 предназначена для мойки оборудования, не соприкасающегося с горячим молоком и изготовленного из нержавеющей стали или другого материала с оловянным покрытием.

Смесь 2 используют для мойки оборудования, изготовленного из алюминия.

Смесь 3 применяют для удаления молочного камня с оборудования, соприкасающегося с горячим молоком (кроме выполненного из алюминия).

Смесь 4 используют для мойки оборудования и тары, изготовленной из стекла и фарфора.

В зависимости от объекта мойки рабочие растворы могут иметь разную концентрацию.

Оборудование и посуду дезинфицируют растворами хлорной извести и свежегашеной известью, которую готовят перед употреблением

из негашеной извести. Хлорировать оборудование можно только в том случае, если оно хорошо отмыто от остатков молока, так как последние резко снижают эффективность действия указанных веществ.

Хлорная известь представляет собой белый или слегка сероватый порошок с резким запахом хлора. В хлорной извести должно содержаться не менее 25 % активного хлора. На предприятиях готовят концентрированный 10%-ный раствор хлорной извести, из которого получают рабочие растворы, содержащие 0,1 и 0,5 % активного хлора. Их используют для дезинфекции рук, уборочного инвентаря, оборудования, санузлов и др. После мойки и дезинфекции оборудование ополаскивают водопроводной водой до полного удаления моющих и дезинфицирующих средств.

Мылку и дезинфекцию на предприятиях молочной промышленности проводят согласно утвержденным инструкциям.

Кроме химической дезинфекции применяют дезинфекцию острым паром или горячей водой.

Дезинсекция и дератизация. Дезинсекцией называют комплекс мероприятий, направленных на уничтожение насекомых (мух, тараканов).

Мухи являются переносчиками возбудителей различных инфекционных заболеваний, в том числе и через пищевые продукты. Они очень быстро размножаются. Комнатная муха откладывает за один раз 120-150 яиц.

Для предупреждения выплода мух необходимо плотно закрывать мусорные ящики, выгребные ямы, уборные. Их следует систематически обрабатывать 20%-ным раствором хлорной извести или известковым молоком. Чтобы не допустить проникновения мух в производственные цехи, с наступлением теплого времени года на окнах, дверных проемах и вентиляторах устанавливают металлические сетки.

Тараканы также опасны как переносчики возбудителей инфекционных болезней и пороков пищевых продуктов. Они наиболее активны при температуре воздуха 20 °С. Температура минус 5 °С действует на них губительно. Тараканы чаще обитают в местах, хорошо обогреваемых, при наличии воды и гниющих отбросов.

Для предупреждения появления тараканов необходимо зацементировать и заделать все щели в стенах и других местах производственных помещений, соблюдать чистоту в помещениях, регулярно убирать отбросы, тщательно укрывать продукты.

Для борьбы с появившимися тараканами применяют кипяток и острый пар, опаривая открытые места с гнездами тараканов. Места обитания тараканов на металлическом оборудовании выжигают паяльной лампой. Тараканов истребляют также приманками, содержащими буру и специальные химические препараты.

Дератизацию проводят механическими и химическими методами. Механические предусматривают применение различных ловушек и капканов, химические заключаются в отравлении грызунов ядами, которыми начиняют приманки.

С целью защиты сырья и готовой продукции от порчи грызунами окна в подвальных этажах и отверстия в вентиляционных каналах закрывают защитными сетками, заделывают металлической стружкой и раствором цемента отверстия в стенах, полах, около трубопроводов и радиаторов, своевременно очищают цехи от пищевых остатков и отбросов.

21.4. ЛИЧНАЯ ГИГИЕНА РАБОТНИКОВ

Для предупреждения загрязнения молока, молочных продуктов и других объектов внешней среды возбудителями заразных болезней все работники предприятия обязаны соблюдать правила личной гигиены.

Важнейшей профилактической мерой является предохранение заноса микроорганизмов в цех с обувью и одеждой. Особенно строго следует соблюдать меры, гарантирующие предупреждение распространения фекального загрязнения из туалета в цех через обувь, одежду, руки работников.

При посещении туалета необходимо оставлять санитарную одежду в предуборной, а после посещения тщательно мыть руки с мылом и дезинфицировать осветленным раствором хлорной извести или хлорамина. Подошву обуви надо вытирать о коврик, пропитанный раствором хлорной извести с содержанием 1% активного хлора.

Для предупреждения обсеменения продуктов микроорганизмами работники производственных цехов перед началом работы надевают чистую санитарную или специальную одежду и моют руки с мылом и дезинфицируют их осветленным 0,2%-ным раствором хлорной извести или хлорамина.

В целях предупреждения попадания посторонних предметов в молоко и молочные продукты рабочие должны повязывать голову косынкой или надевать колпак и подбирать волосы. Не разрешается застегивать одежду булавками или иголками, приносить в цех в карманах одежды зеркало, мелкие предметы и т. п. Ногти на руках должны быть коротко подстрижены, не окрашены лаком.

Рабочее место в процессе работы необходимо содержать в чистоте. Санитарную и специальную одежду после работы оставлять в гардеробной или сдают лицу, ответственному за ее прием, хранение и выдачу. Запрещается выходить в санитарной одежде за пределы своего цеха в целях предупреждения ее загрязнения.

Для выявления лиц, больных заразными болезнями и опасных для окружающих (они могут обсеменять продукты патогенными

микроорганизмами), проводят медицинское обследование, которое включает: медицинский осмотр на наличие кожных и других болезней, исследование на носительство возбудителей кишечных инфекций и яиц гельминтов, прохождение рентгенографии. Результаты медицинских исследований записывают в санитарную книжку.

Для работы на предприятиях молочной промышленности не допускают лиц, болеющих открытой формой туберкулеза, гнойничковыми заболеваниями кожи, оказавшихся носителями возбудителей брюшного тифа, сальмонеллез, дизентерии, дифтерии и других инфекционных болезней.

К *санитарной одежде* относят халаты, колпаки, косынки, изготовленные из гладкой хлопчатобумажной ткани чаще белого, реже голубого цвета. Для предупреждения попадания в продукты пуговиц от халатов целесообразно применять халаты с поясом. Иногда используют хлопчатобумажные комплекты (рубашки без пуговиц и брюки), а также кепки с сетчатым верхом.

Санитарная одежда предохраняет от загрязнения и микробного обсеменения продукты через одежду рабочего. Санитарная одежда должна находиться в опрятном состоянии и быть чистой.

Специальные одежда и обувь являются средствами защиты здоровья людей от вредного воздействия физических, химических и биологических факторов, а также предохраняют личную одежду от загрязнения. К специальной одежде относят теплые куртки, комбинезоны, фартуки, нарукавники, резиновые перчатки, к специальной обуви - сапоги, ботинки, брезентовые чулки на обувь (бахилы).

Специальную одежду содержат в чистоте (своевременно моют и дезинфицируют), а после работы сдают ее в гардероб рабочей одежды.

21.5. САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ НОРМИРОВАНИЕ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ. ГРАНИЦА РИСКА

Санитарно-микробиологическое состояние молочных и других пищевых продуктов, а также различных объектов внешней среды оценивают, как правило, по косвенным микробиологическим показателям, позволяющим судить о возможном обсеменении их патогенными микроорганизмами.

К ним относят общую бактериальную обсемененность, выраженную показателем КОЕ (колониобразующие единицы), и наличие санитарно-показательных микроорганизмов.

За показатель КОЕ принимают количество колоний микроорганизмов, которые вырастают на питательном агаре с гидролизированным молоком при посеве 1 см³ или 1 г продукта или субстрата и культивировании посевов при 30 °С в течение 72 ч.

При определении КОЕ образуются колонии аэробных и факультативно-анаэробных мезофильных микроорганизмов. Это в основном сапрофитные представители. Их количество увеличивается в процессе загрязнения внешней среды и уменьшается при ее самоочищении. Общая микробная обсемененность значительно меньше, чем количество микроорганизмов в исследуемом объекте. Это объясняется тем, что при высеве на агаре не дадут роста мертвые клетки, а также клетки, утратившие способность к размножению, анаэробные микроорганизмы, термофилы и психрофилы, многие представители патогенной микрофлоры и молочнокислые бактерии, не растущие на обычных питательных средах, вирусы. Кроме того, не учитываются плесени и актиномицеты, рост которых можно обнаружить только на 4-е сутки. Необходимо также иметь в виду, что не всегда разбиваются бактериальные конгломераты и одна колония вырастает из нескольких клеток.

В связи с тем что сапрофитные микробы являются основными возбудителями порчи пищевых продуктов, по показателю КОЕ можно судить о санитарном состоянии этих продуктов.

Косвенными показателями загрязнения объектов внешней среды патогенными микробами являются санитарно-показательные микроорганизмы.

Контроль качества продуктов осуществляется по альтернативному методу, когда нормируется отсутствие санитарно-показательных, условно-патогенных, патогенных и других микроорганизмов в определенной массе продукта.

Во всех молочных продуктах ранее использовавшийся контроль по коли-титру или титру бактерий группы кишечных палочек (бродильный титр) заменен на показатель отсутствия бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий) в определенной массе продукта.

Максимально допустимое количество микроорганизмов в 1 г (1 см^3) продукта, не нарушающее его микробиологической стабильности в процессе хранения и не представляющее опасности для здоровья человека, называется *границей риска*.

В слабоохлажденном молоке (температура охлаждения несколько выше 10°C) преобладают молочнокислые стрептококки и граница риска находится в районе 10^7 микробных клеток в 1 см^3 , т. е. из молока, в котором количество микробов находится ниже этой границы, можно еще изготовить безопасные для потребителя молочные продукты.

Сырое молоко, предназначенное для переработки в высококачественные молочные продукты, оценивают как хорошее, если содержание в нем микробов меньше 3×10^5 в 1 см^3 , а БКП не выявляют в $0,001 \text{ см}^3$.

В сыром молоке, перерабатываемом на питьевое, содержание

микробов не должно превышать 10^6 в 1 см^3 , а содержание термостойких микробов - 3×10^4 в 1 см^3 . Для аэробных спорообразователей, вызывающих порчу питьевого молока, 100 бактерий в 1 см^3 являются уже критической границей, которую нельзя превышать.

По перечисленным показателям проводят санитарную оценку и других молочных продуктов, т. е. дают заключение о соответствии их требованиям нормативно-технических документов (ГОСТа, технических условий, инструкций и пр.).

21.6. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ПРОИЗВОДСТВА МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Контроль поступающего сырья, готовой продукции, технологических процессов и санитарно-гигиенических условий производства осуществляет лаборатория предприятия в соответствии с инструкциями по микробиологическому и технологическому контролю.

Контроль позволяет своевременно обнаружить бактериальное загрязнение продукта, установить источник загрязнения, а также дает возможность проконтролировать эффективность дезинфекции.

Имеется два вида микробиологического контроля: контроль санитарно-гигиенического состояния производства; контроль технологического процесса и готовой продукции.

Контроль санитарно-гигиенического состояния производства. К объектам контроля относят оборудование, трубопроводы, аппаратуру, посуду, инвентарь, деревянную тару, руки и спецодежду работников, воздух, а также вспомогательные материалы производства.

Для контроля чистоты большинства объектов определяют общее количество бактерий, а также наличие бактерий группы кишечных палочек. Последний показатель считается основным. При обнаружении бактерий группы кишечных палочек объект считается загрязненным, при отсутствии их, чистоту объекта оценивают по общему количеству бактерий.

Аппаратуру и оборудование контролируют после мойки и дезинфекции (хлорирования или пропаривания) непосредственно перед началом работы. Смыть с плоских поверхностей оборудования отбирают ватными или марлевыми тампонами, отмывают их в $3-4 \text{ см}^3$ физиологического раствора. Затем весь объем физиологического раствора засевают в 5 см^3 среды Кесслер. Бактерии группы кишечных палочек в смывах должны отсутствовать. В случае необходимости проводят посев 1 см^3 смыва на общее количество бактерий, а оставшееся количество засевают в среду Кесслер.

Смывы с кранов берут со всей поверхности. При анализе трубопроводов смыв берут, вводя тампон внутрь трубы на $6,5 \text{ см}$ или на

9 см при диаметре труб соответственно 50 и 36 мм. Смывы с крупной оборудования и инвентаря берут с поверхности 100 см².

Для анализа санитарного состояния стеклянных бутылок и банок смыв делают путем обмывания внутренней поверхности последовательно 10 единиц посуды физиологическим раствором объемом 20 см³. Из последней бутылки смывную жидкость используют для посева на чашку Петри (1 см³), а остальное количество вносят в пробирку с 5 см³ среды Кесслер.

Руки работников контролируют без предварительного предупреждения перед началом производственного процесса, и только у тех работников, руки которых непосредственно соприкасаются с чистым оборудованием или продукцией. Пробу отбирают тампоном, обтирая им обе ладони и пальцы работника. Контроль хлорирования рук проводят, протирая отдельные участки рук йодо-крахмальным раствором. Появление на тампоне и поверхности рук сине-бурого окрашивания указывает на то, что руки были обработаны раствором хлорной извести. Следы окрашивания удаляют тампоном, смоченным в растворе гипосульфита натрия.

При исследовании воды определяют микробное число, коли-титр и коли-индекс. Пригодной для использования является вода, удовлетворяющая требованиям ГОСТа на питьевую воду. Чистоту воздуха производственных цехов молочных заводов оценивают по количеству бактерий, дрожжей и плесеней.

Пергамент, фольгу, пленку для упаковки, комбинированные материалы для упаковки молока и молочных продуктов разворачивают и с внутренней стороны берут смыв стерильным ватным или марлевым тампоном (со 100 см² поверхности). Определяют наличие плесеней и бактерий группы кишечных палочек.

53. Показатели оценки результатов микробиологического контроля вспомогательных материалов

Объект контроля	Масса образца, г	Площадь поверхности образца, см ²	Общее количество бактерий в 1 см ³ или результат посева на наличие БГКП	
			Хорошо	Плохо
Соль	1	-	КОЕ 100 и не менее	КОЕ более 100
Сахар	1	-	Отсутствие дрожжей и плесеней	Наличие дрожжей и плесеней
Пергамент, фольга, пленка поливиниловая и др.	-	100	Плесневые грибы от 0 до 10, отсутствие БГКП	Плесневые грибы свыше 10, наличие БГКП

Поваренную соль контролируют на общее содержание бактерий. Для приготовления разведения берут 5 г соли и растворяют в 95 см³

стерильной воды. Сахар исследуют на наличие дрожжей и плесеней, раствора 10 г в 90 см³ воды.

Санитарную оценку проводят по показателям, приведенным в табл. 53.

Контроль технологического процесса и готовой продукции. К молоку как к сырию, поступающему на переработку, а также к технологическим процессам производства и готовым молочным продуктам предъявляют определенные санитарные требования.

Первичную обработку молока проводят в специальном помещении - прифермской молочной. После доения молоко фильтруют и охлаждают до температуры 4-5 °С. Охлажденное молоко разрешается хранить не более 24 ч в отдельном помещении. Запрещается смешивать парное и охлажденное молоко. Транспортируют молоко в запломбированных автомолцистернах и флягах, которые предварительно должны быть чисто вымыты.

Запрещено сдавать на предприятия без специального разрешения ветеринарного врача молоко, полученное от больных животных. Такое молоко доставляют в отдельной таре с соответствующей этикеткой или биркой.

Предприятия не должны принимать молоко без справок, представляемых ежемесячно органами ветеринарного надзора о ветеринарно-санитарном благополучии молочных ферм и предприятий (комплексов) по производству молока. От индивидуальных сдаччиков аналогичные справки представляются 1 раз в год. Не допускается смешивать молоко от подозреваемых на заболевание коров с молоком от здоровых животных. Все технологические процессы производства молока и молочных продуктов должны проводиться в условиях тщательной чистоты и защищенности молока от попадания посторонних микроорганизмов, предметов и веществ. В зависимости от особенностей технологии производства молочных продуктов применяют различные схемы микробиологического контроля, описанные выше.

ПРОБИОТИКИ

22.1. ПОНЯТИЕ О ПРОБИОТИКАХ

Пробиотиками называют биологические препараты, состоящие из живых непатогенных микроорганизмов или продуктов их ферментации, обладающие антагонистической активностью по отношению к патогенной и нежелательной микрофлоре кишечника человека или животных.

Чаще в качестве микроорганизмов-пробионтов, вводимых в состав пробиотиков, используют молочнокислые и бифидобактерии, реже — пропионовокислые бактерии, энтерококки, дрожжи, бациллы и др.

Препараты, изготовленные на основе бактерий-пробионтов, используются для профилактики желудочно-кишечных заболеваний, особенно у детей и молодняка животных, для коррекции кишечного микробиоценоза, после терапии антибиотиками и химическими препаратами, для стимуляции роста и повышения естественной резистентности макроорганизма.

Кишечный микробиоценоз представляет собой эволюционно сложившийся с макроорганизмом взаимозависимый биокомплекс, участники которого в равной степени влияют друг на друга и неспособны нормально существовать отдельно в искусственных условиях.

У физиологически зрелого здорового организма в кишечном биоценозе равноправно присутствуют многочисленные представители как полезной, так и условно-патогенной микрофлоры. Стабильность биоценоза поддерживается взаимными антагонистическими отношениями между этими группами микроорганизмов, а также макроорганизмом, который посредством сложных иммунных, гормональных и секреторных реакций принимает участие в регуляции численности представителей кишечной микрофлоры и поддерживает определенный баланс между ними.

Микроорганизмы-пробионты осуществляют синтез аминокислот, ферментов, участвуют в общем метаболизме, восполняют дефицит белков животного происхождения, ускоряют процессы переваривания пищи, усвоения питательных веществ.

Лактобактерии наиболее активно осуществляют регуляторные функции внутри популяции кишечных бактерий и являются основными представителями нормальной микрофлоры кишечника. Наиболее часто в состав пробиотических препаратов входят следующие виды молочнокислых бактерий: *Lbm. acidophilum*, *Lbm. casei*, *Lbm. bulgaricum*, *Lbm. helveticum*, *Lbm. plantarum*, *Lbm. buchneri*, *Lbm. brevis*, *Lbm. fermentum*.

Идея целенаправленного изменения состава симбиотической микрофлоры желудочно-кишечного тракта принадлежит основоположнику отечественной микробиологии И. И. Мечникову. Предложенный им метод энтерального введения живых культур молочнокислых бактерий в качестве антагонистов гнилостных микробов явился началом современных исследований в области бактериотерапии и профилактики различных патологических состояний, связанных с нарушениями состава нормальной микрофлоры кишечника.

Сегодня этот метод лечения и профилактики получил широкое развитие в нашей стране и за рубежом под названием «заместительная терапия», в которой основными микроорганизмами являются молочнокислые бактерии.

Термин «пробиотики» был предложен в 1977 г. Ричардом и Паркером для обозначения живых микроорганизмов и продуктов их ферментации, обладающих антагонистической активностью по отношению к патогенной микрофлоре.

Микроорганизмы, используемые как пробиотики, классифицируют на 4 основные группы:

- бактерии, продуцирующие молочную и пропионовую кислоты (роды *Lactobacterium*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Enterococcus* и др.);
- спорообразующие аэробы рода *Bacillus* (*Bac. subtilis*, *Bac. cereus*, *Bac. licheniformis*, *Bac. coagulans*);
- дрожжи, которые чаще используются в качестве сырья при изготовлении пробиотиков;
- комбинации перечисленных микроорганизмов.

Пробиотические препараты подразделяют на зубиотики, пребиотики и симбиотики.

Зубиотики — это биологические препараты, состоящие из живых микроорганизмов — представителей нормальной микрофлоры кишечника.

Пребиотики являются пищевыми или другими ингредиентами, преимущественно благотворно влияющими на развитие полезной микрофлоры кишечника организма человека или животного. При помощи пребиотиков, т.е. используя определенную диету, можно регулировать микробиоценоз кишечника.

Полезные добавки пребиотиков могут содержать специфические вещества (факторы идентификации), вырабатываемые лактобактериями, которые предотвращают адгезию (прикрепление) *E. coli* и других нежелательных микроорганизмов к эпителиальным клеткам кишечника хозяина.

В качестве пребиотиков могут использоваться олигосахариды, ингибирующие развитие некоторых групп микроорганизмов.

Если живые микробиологические добавки (пробиотики)

используются в сочетании со специфическими субстратами роста (пребиотики), то такие биопрепараты называют **симбиотиками**.

В настоящее время созданы и разрабатываются композиции симбиотиков, обогащенные витаминами, ростовыми добавками, микроэлементами, лактозой, молочной кислотой, антибиотиками и др.

22.2. ТРЕБОВАНИЯ, ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫЕ К МИКРООРГАНИЗМАМ-ПРОБИОНТАМ

При изготовлении эффективных пробиотиков, основанных на молочнокислых и других бактериях, проводят идентификацию и селекцию выделенных штаммов. Они должны обладать определенными свойствами, обеспечивающими выживание пробионтов в условиях кишечного тракта, должны ингибировать развитие нежелательной микрофлоры, обладать ключевой ферментативной активностью и повышать скорость роста и продуктивности животных.

Микроорганизмы-пробионты должны быть непатогенными, грамположительными, устойчивыми к кислотам, продуцентам кислот, принадлежать к определенному штамму, обеспечивающему колонизацию кишечного тракта; выделять анти-*E. coli*-фактор и обладать устойчивостью к желчи. Для проверки перечисленных свойств разработаны специальные тесты.

Непатогенность молочнокислых, пропионовокислых и бифидобактерий очевидна, но их культуры могут быть загрязнены болезнетворными микроорганизмами. Другие пробионты контролируют по токсинообразованию и другим факторам патогенности.

Грамположительным микроорганизмам отдается предпочтение в связи с тем, что они более устойчивы к разрушению пищеварительными ферментами, лизозимом, как замораживанию и высушиванию.

Пробионты должны быть **кислотоустойчивыми**, чтобы пройти неповрежденными через желудок, где находятся хлористоводородная кислота. Они сами должны **продуцировать кислоты** и тем самым способствовать созданию среды, неприемлемой для развития более кислоточувствительных колибактерий.

Специфичность вводимого в пробиотик штамма заключается в прикреплении к слизистой кишечного тракта, а не просто его колонизацию в содержимом кишечника.

Микроорганизмы-пробионты должны продуцировать **анти-*E. coli*-фактор**, ингибирующий развитие колибактерий в кишечнике.

Устойчивость к желчи является одним из важнейших свойств микроорганизмов, вводимых в состав пробиотиков. В желчи содержатся соли желчных кислот, которые эмульгируют жиры, гидролизуют жирные кислоты и водонерастворимые мыла.

Жельц поступает в дуоденальный отдел тонкого кишечника, что обуславливает отмирание большого количества бактерий, так как их ключевые мембраны, состоящие из липидов и жирных кислот, очень чувствительны к разрушению солями желчных кислот. В связи с этим эффективность пробиотических микроорганизмов зависит от устойчивости их к желчи.

Многие виды и штаммы молочнокислых и бифидобактерий отвечают практически всем перечисленным требованиям.

На последней стадии производства пробиотиков контролируют стабильность полезных биологических свойств микроорганизмов-пробионтов и их жизнеспособность.

22.3. МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ПРОБИОТИКОВ

Механизм действия пробиотиков направлен на принудительное заселение кишечника конкурентоспособными штаммами бактерий-пробионтов, которые осуществляют неспецифический контроль за численностью условно-патогенной микрофлоры, вытесняя ее из состава кишечной популяции и сдерживая усиление факторов патогенности у ее представителей.

Механизмы антагонизма нормофлоры кишечника наиболее изучены на примере лактобактерий и в целом справедливы по отношению к различным представителям нормальной микрофлоры кишечника (нормобиоза). При этом действие микроорганизмов-пробионтов осуществляется в четырех основных проявлениях:

- подавление численности нежелательных микроорганизмов;
- изменение метаболизма микробов;
- стимуляция иммунитета организма хозяина;
- детоксикация экзогенных и эндогенных субстратов и метаболитов.

Подавление численности нежелательных микроорганизмов. Снижение численности или полное исчезновение специфической группы бактерий после применения пробиотиков объясняется прямым антагонистическим действием, вызванным антибиотическими веществами; пищевой конкуренцией или конкуренцией за места прикрепления к кишечному эпителию.

Способность прикрепляться к эпителию кишечника является для многих микроорганизмов существенным условием закрепления в такой подвижной среде, как кишечник, так как они могут избежать удаления перистальтикой кишечника и оставаться поблизости к поступающей свежей пище.

Следовательно, одним из способов предотвращения колонизации (заселения) кишечника патогенными микроорганизмами является насыщение рецепторов адгезии (прикрепления) эпителия кишечника

бактериями пробиотиков, что предотвращает прикрепление патогенов и обеспечивает защиту от кишечных заболеваний.

Изменение метаболизма микробов. Влияние одних бактерий на развитие других может обуславливаться изменением концентрации микробных метаболитов или активности их ферментов. Основными продуктами метаболизма гомо- и гетероферментативных лактобактерий являются молочная и уксусная кислоты.

Антимикробная активность молочной кислоты зависит не столько от величины pH, сколько от совместного присутствия молочной, уксусной и пропионовой кислот. Синергизм такого сочетания обеспечивает задержку роста сальмонелл, эшерихий, клостридий и некоторых видов дрожжей, при этом такое сочетание не оказывает ингибирующего действия на развитие лактобактерий.

Другим продуктом метаболизма гетероферментативных видов лактобактерий является углекислый газ, присутствие которого в содержимом кишечника способствует поддержанию анаэробных условий и высокого парциального давления, что положительно сказывается на развитии полезных анаэробных пропионовокислых и бифидобактерий. Углекислый газ выступает в роли акцептора водорода при биосинтезе некоторыми кишечными микроорганизмами ацетата из гекозов.

Особое место среди продуктов метаболизма молочнокислых бактерий занимает **перекись водорода**, которая образуется в результате активации кислорода лактобактериями под влиянием флавиносодержащих ферментов или NADH (никотинамидадениндинуклеотид) пероксидазы.

В клетке бактерии перекиси водорода вступает в реакцию с тиоцианатом, в результате чего образуется гипотиоцианат, токсичный для многих микроорганизмов. Защитное действие от токсического эффекта перекиси водорода оказывает фермент каталаза, который ее разрушает.

Ингибирующий эффект перекиси водорода имеет важное значение для сдерживания численности грамотрицательных, не образующих каталазу бактерий (эшерихий, сальмонелл и др.).

Особенно выраженный ингибирующий эффект перекись водорода оказывает на стафилококки и псевдомонады, который обусловлен ее сильным окислительным действием на бактериальные клетки и разрушением молекулярной структуры клеточных белков.

Некоторые виды лактобактерий образуют **ароматическое вещество диацетил**, которое повышает бактерицидное действие других продуктов метаболизма и обладает ингибирующим действием на некоторые патогенные микроорганизмы, например на возбудителя туберкулеза. Биологический эффект диацетила в сочетании с низким значением pH способствует снижению скорости роста эшерихий и некоторых грамположительных кишечных бактерий, не относящихся к лактобактериям.

Продуктами метаболизма лактобактерий являются также **биологическиактивные бактериостатические вещества**, называемые бактериоцинами, лантантиотиками и неидентифицированными субстанциями.

Первое сообщение об антимикробном веществе, продуцируемом *Lac. lactis* и *Lbm. bulgaricus*, было сделано Роджерсом в 1928 г. Это вещество, подавляющее рост стафилококков и стрептококков, было названо низином. Другую антимикробную субстанцию — диплококин секретирует *Lac. stremoris*. В дальнейшем эти ингибирующие белки были названы **бактериоцинами**. Они характеризовались узким спектром бактериостатического действия против близкородственных видов микроорганизмов. Их часто называют также антибиотиками.

По механизму действия бактериоцины весьма близки к антибиотикам, существенно отличаются от них тем, что большинство бактериоцинов ингибирует ограниченное число близкородственных микроорганизмов.

По физико-химическим характеристикам бактериоцины являются низкомолекулярными белками, которые фиксируются на специфических клеточных рецепторах большинства бактериальных клеток. В результате этого нарушаются процессы транспорта через клеточную мембрану различных катионов, снижается синтез ДНК. В некоторых случаях бактериоцины вызывают лизис клеточных стенок, уплотнение ядерного материала, частичное изменение рибосом и лизосом.

Бактериоцины угнетают рост сальмонелл, шигелл, клостридий, листерий, синегнойной палочки.

Способностью продуцировать бактериоцины обладают ацидофильные бактерии, лактококки, лейконостоки, стрептококки и педиококки.

Бактериоцины ацидофильных палочек объединили термином «Лантацин В», они угнетают синтез ДНК у эшерихий, а лактацин, продуцируемый *Lbm. helveticum*, ограничивает синтез белков у микроорганизмов. Некоторые бактериоцины подавляют развитие грибов рода *Aspergillus* и *Rhizopus*.

Кроме бактериостатического действия бактериоцины сдерживают рост опухолевых клеток.

Другими бактериостатическими продуктами метаболизма являются **антибиотикоподобные субстанции**. В отличие от бактериоцинов эти антибиотики менее чувствительны к действию ферментов амлаз и протеиназ, они содержат аминокислоты, обычно не присутствующие в бактериоцинах. Эти антибиотические вещества получили название **лантантиотиков**.

Кроме бактериоцинов и лантантиотиков лактобактерии продуцируют **неидентифицированные субстанции**, обладающие

бактериостатическим эффектом. Это низкомолекулярные вещества *непептидной природы*, проявляющие свою активность в присутствии кислот или перекиси водорода. Они ингибируют развитие сальмонелл, шигелл, клостридий, бацилл, псевдомонад, стафилококков, стрептококков, бифидобактерий и бактероидов.

Все бактериостатические вещества водорастворимы, не имеют вкуса и запаха, неканцерогенны, неаллергенны и активны в малых концентрациях.

В последнее время выявлена антибиотикоподобная субстанция, продуцируемая *Lbm. reuteri* и получившая название «реутерин». Это комплекс новых типов метаболитов, который в дальнейшем объединили под названием «система реутерина». Широкий спектр ингибирующей активности и низкая концентрация активной дозы реутерина выводят его на первое место среди других бактериостатических веществ.

Кроме органических кислот, углекислого газа, диацитила и бактериостатических веществ, оказывающих ингибирующее влияние на патогенную и условно-патогенную микрофлору, лактобактерии вырабатывают множество ферментов, коферментов, витаминов и провитаминов, которые в совокупности с основными продуктами метаболизма оказывают биологически активное действие на организм хозяина и способствуют повышению его естественной резистентности.

Внесение бактерий-пробионтов может изменять метаболическую активность ферментов макроорганизма. Так, активность нитроредуктазы и бетаглюкоронидазы в кишечнике может снизиться при употреблении добавок *Lbm. acidophilum* и живого йогурта. Эти ферменты участвуют в синтезе или активации канцерогенов и таким образом оказывают вредное длительное воздействие на организм хозяина.

Стимуляция иммунитета. Пробиотики многосторонне действуют на организм хозяина, оказывая иммуностимулирующее проявление даже в малых дозах, что указывает на тесную связь между иммунным статусом организма и заселением микрофлорой желудочно-кишечного тракта. Кишечная микрофлора принимает активное участие в работе иммунокомпетентных органов, в формировании клеточного и гуморального иммунитета. Это подтверждается снижением фагоцитарной активности и концентрации иммуноглобулинов у стерильных животных.

Под влиянием пробиотиков изменяется комплекс факторов неспецифической резистентности: повышается содержание лизоцима, бактерицидная активность сыворотки крови, фагоцитарная активность нейтрофилов и др.

Микроорганизмы, входящие в состав пробиотиков, активизируют Т- и В-системы иммунитета, влияя на выработку иммуноглобулинов, особенно секреторного иммуноглобулина А, обуславливающего местный иммунитет слизистой оболочки кишечника.

Имуноглобулин А вместе с другими защитными механизмами составляют сильный слизистый барьер, предотвращающий адгезию и внедрение патогенов в стенку кишечника, а также создают локальную окружающую среду, которая является неблагоприятной для многих энтеритных бактерий. Пробиотики укрепляют эпителиальный барьер благодаря стимуляции иммунных клеток подслизистого слоя кишечника, предотвращая таким образом перемещение патогенных микроорганизмов через эпителий кишечника.

Молоко, ферментированное *Lbm. casei* или *Lbm. acidophilum*, а также живой йогурт являются эффективными стимуляторами врожденной иммунной системы, особенно они, усиливая фагоцитоз макрофагов и расширяют функции естественных киллерных клеток.

С другой стороны иммунодефицитное состояние макроорганизма является предпосылкой для изменения кишечного микробиоценоза. Это обусловлено тем, что при угнетении иммунной системы организма у нормальной кишечной микрофлоры наблюдается полная утрата способности прикрепляться к рецепторам эпителиальных клеток слизистой оболочки, что проявляется резким выведением бактерий-пробионтов из кишечника.

Таким образом, действие пробиотических препаратов можно рассматривать в качестве антигенов, не оказывающих негативного влияния, являющихся стимуляторами иммунной системы, активизирующими специфическую и неспецифическую защиту организма хозяина.

Детоксикация экзогенных и эндогенных субстратов и метаболитов. Микрофлора пробиотиков и пищеварительного тракта является одним из главных механизмов защиты макроорганизма от потенциально токсичных соединений, поступающих в организм с пищей, водой, воздухом или образующихся эндогенно.

В кишечнике протекают процессы в анаэробных условиях преимущественно за счет гидролитических и восстановительных реакций, осуществляемых нормальной микрофлорой.

Процесс детоксикации с участием нормальной микрофлоры и пробионтов идет по нескольким направлениям: образование микроорганизмами метаболитов, которые подвергаются быстрому разрушению в печени; изменение полярности соединений таким образом, что изменяется скорость их выведения в окружающую среду; непосредственное всасывание кишечной микрофлорой токсических продуктов.

Доказана антимутагенная роль нормальной кишечной микрофлоры. Микроорганизмы пищеварительного тракта способны гидролизовать сульфаматы, амиды, титраты; редуцировать альдегиды, алкоголи; восстанавливать нитрозамины.

Бактерии пищеварительного тракта способны инактивировать афлатоксины, другие микотоксины и токсины растений.

Пробионты и кишечные микроорганизмы способны к метаболизации многих лекарственных препаратов. Установлено, что бактерии-пробионты обладают свойством обезвреживать бактериальные токсины. В частности, болгарская палочка нейтрализует энтеротоксин E. coli.

Кроме перечисленных эффективных механизмов действия перспективы широкого использования пробиотиков обусловлены также относительно простой биотехнологией их производства, которая сводится к выращиванию одного или нескольких микроорганизмов-пробионтов на соответствующих питательных средах с последующим высушиванием культуральной жидкости.

Помимо белковых, углеводных, жировых и ферментных фракций, имеющихся в составе пробиотиков, большая доля биологическиактивных веществ приходится на различные витамины, особенно группы B, и поэтому пробиотики по существу являются бактериально-витаминными препаратами и могут вводиться в состав продуктов детского питания и комбикормов с целью предупреждения заболеваний и стимуляции роста детей и молодняка животных.

При контроле готовых пробиотиков определяют число жизнеспособных клеток в дозе или весовой единице препарата, которое должно удовлетворять требованиям НТД на конкретный препарат. Пробиотики не должны содержать посторонней микрофлоры либо могут иметь незначительное количество непатогенных микроорганизмов (до 10^3 - 10^4 клеток в 1 г). Не допускается наличие в них БГКП.

Безвредность пробиотиков контролируют путем постановки биопробы на лабораторных животных, задавая препарат перорально. Остаточная влажность сухих препаратов, высушенных при лиофильной и распылительной сушке не должна превышать 3-5 %, при сорбиционной - 7-8 %.

В ряде случаев ТУ предусматривают контроль готового пробиотика на его антагонистическую активность по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

А

Абиоз 366
Автолизат дрожжевой 364
Автотрофы 47
Агар 59
- водный 188
- желточно-соловой 241
- желчный фиолетово-красный 363
- молочно-соловой 241
- молочный 187
- с гидролизованым молоком и мёлом 129
Агглютинины 122
Агрессивность 115
Азотификация 93
Актиномицеты 36
Алкалоиды 76
Аллели 107
Аллергены 123
Амилаза 45
Аминоавтотрофы 48
Аминогетеротрофы 48
Аминофазы 45
Амфитрихи 30
Анабиоз 365
Анаболизм 39, 46
Анатоксины 116
Анаэробы облигатные 52
Анаэробы факультативные 53
Антагонизм 81
Антибиотик 81
Антигены 123
Антигепатита 384
Антигела 121
- нормальные 122
Антигистамины 121
Антропозоны 114
Асептика 384
Асцитисы 13, 31
Ассимиляция (см. Анаболизм)
Атрихи 30
Ауксотрофы 48, 111
Ацидофилы 76
Аэробы 52

Б

Базидиомицеты 15
Бактерии 18
- грамположительные 12, 21
- мезофильные 12
- терерофильные 12
- термолабильные 69
- термоустойчивые 12, 21
Бактериостаз 78
Бактериофаги 16, 38

Бациллы 18, 29
Биоз 365
Биотехнология 4
Брожение молочнокислое 96

В

Вибрионы 19
Вид 9
Вироны 37
Вирулентность 114
Вирусы 15, 63
- авирулентные 64
- вирулентные 64
- дефектные 66
- латентные 64
Включения цитоплазмы 25
Ворота инфекции 116

Г

Галофилы 71
- умеренные 71
- экстремальные 71
Генетика 101
Генетика молекулярная 101
Геном 103
Генотип 104
Генетический код (см. нуклеотид)
Гены 103
- модифицированные 103
- структурные 103
- гены-операторы 104
- гены-регуляторы 104
Гетеротрофы 47
Гибридизация нуклеиновых кислот 26
Гигиена 383
Гидролазы 44
Гифомицеты 32
Гниение 94
Гомология ДНК 27
Граница риска 390
Гранулаза 189
Грибы высшие 13
- низшие 13

Д

Дегидрогеназы 45
Дегидрогенирование 51
Дейтерометины 13
Дезинсекция 384
Дезинфекция 383
Дезодорация 384

Дератизация	384	Капсомеры	37
Десмурбосислазы	46	Капсула	23
Деслеша	107	Карбогидраты	45
Денитрификация	95	Катаболиты	39, 51
Деструкторы	92	Каталаза	45
Диацилгил	62	Классификация	9
Диплококки	17	Клетки соматические	260
Диссимилиция (см. Катаболизм)		Клон	11
Диссоциация	110	Кластридии	18, 29
Дифференциация	9	Кокки	17
Диффузия облегченная	49	Колифаги	244
Диффузия пассивная	49	Колонии «негативные»	195
Дрожжи	31	Колонии микробов	57
Дрожжи молочные	15	Комменсализм	80
Дупликация	107	Комплекс признаков ТИМАЦ	231
Ж		Конидии	33
Жгутки бактерий	30	Консуменция	92
Желатин	58	Конформация	103
Желатоза	280	Конъюгация	106
З		Криофора	254
Зона спорогенная	28	Культирование непрерывное	56
Зоны сапробности водоемов	86	Культура аксеническая	11
Зооантропонозы	114	Культуры эндогенные	194
Зооген	24	Л	
Зоонозы	114	Лейкоциты	252
И		Лиазы	45
Идентификация	9	Лигазы	46
Иерархия таксономическая	9	Лизоцимы	252
Изменчивость	101, 105	Липазы	45
Изомеры	46	Локус хромосомы	103
Иммунитет	118	Лифотрихи	30
- активный	125	М	
- врожденный	125	Макроэлементы	41
- естественный	125	Мезосомы	23
- искусственный	125	Мезофилы	68
- колостральный	126	Мезофлора	254
- пассивный	125	Мембрана цитоплазматическая	22
- приобретенный	125	Метабиоз	81
Иммуноглобулины	122	Метаболизм	39
Имунология	118	Метафазы	47
Инвазивность (см. Агрессивность)		Микроаэрофилы	53
Иверсия	107	Микробиология	3
Илженерия генная	112	- ветеринарная	4
Илтипа	28	- космическая	4
Илфидия	113	- медицинская	4
- латентная	117	- молока и молочных продуктов	4
Инфекции адвентарные	117	- общая	3
- аэрогенные	117	- санитарная	4
- почвенные	117	- сельскохозяйственная	3
- трансмиссивные	117	- техническая	4
К		Микрокапсула	24
Кавитация	74	Микрококки	17
Капсид	37	Микроорганизмы	
		- аутохтонные	91
		- автохтонные	91
		- грамположительные	21
		- грамотрицательные	22

- контаминанты	91	Перитрихи	30
Микрофлора эпифитная	90	Пероксидазы	45
Микроэлементы	41	Пигменты микробов	61
Минерализация	92	Пили общие	31
Модификация	108	Пили половые	31
Молоко	249	Плазмиды бактерий	27, 103
- гидролизованное	129	Плазмодесмы	17
- иммунное	196	Плазмолит	49, 71
- обезжиренное с парафином	189	Плазмолитиз	49
- стерильное обезжиренное	130	Плектридии	29
Монокки	17	Плазмоформизм	101
Мономорфизм	102	Плесени многоклеточные	32
Монотрихи	30	Плесени одноклеточные	32
Морфология	17	Показатель КОЕ	246
Мутации	107	Полиморфизм	109
- генные	108	Полосомы	25
- индуцированные	108	Пороки молока	256
- нуклеотидные	108	Пробиотики	395
- спонтанные	108	Презентация антигена	120
- точечные	108	Презинтинги	122
- хромосомные	108	Проба на редуктазу	258
- цитоплазматические	108	Проба фосфатазная	263
Мутуализм	80	Пробиотик	394
Н		Продукты	92
Наследственность	101	Прокариоты	8
Нейтрофилы	76	Пропора	28
Нитрификация	95	Протеазы	44
Нитрификация	96	Протопласт	22
Номенклатура	9	Прототрофы	48
Нуклеиод	25	Трофаги	194
Нуклеокапсид	37	Психротрофы	68
О		Психрофилы	68
Обмен веществ		Птоманы	94
- белковый	40	Р	
- водно-солевой	41	Реактив Эрлиха	232
- липидный	41	Реактив Мира	233
- углеводный	40	Реакция Кларка	232
Одежда санитарная	389	- плазмокоагуляции	241
- специальная	389	- Фогес-Проскауэра	233
Оксидазы	45	Репликация ДНК	103
Оксидоредуктазы	45	Репродукция вируса	65
Опсонины	122	Реснички	31
П		Рибосомы	24
Пандемия (пазоэтии)	118	РНК-информационная	104
Паразитизм	80	РНК-рибосомная	105
Паразиты (см. Паратрофы)		РНК-транспортная	105
Паратрофы	47	С	
Пастеризация	263	Сапробность водоемов	86
Патогенность	113	Санитария	383
Пептидогликан	21	Сапрофиты	47
Пептон	58	Сарцины	17
Перенос групп	50	Свойства тинкториальные	22
Период инкубационный	117	Селекция	111
- продормальный	117	Септы	32
- реконвалесценции	117	Симбиоз	80
Перипласт (см. Мембрана цитоплазматическая)		Симбиотки	396
		Синергизм	80

Система иммунная	118
Систематика	9
Содержание гуанина + цитозина (Г+Ц)	25
Спириллы	19
Спирохеты	19
Спорангии	33
Споры	32
Споры бактерий	28
Среда ацетатная (СА)	150
- Блаурок	173
- гидролизно-молочная (ГМ среда)	174
- ЖИК (GYC)	177
- картофельная	189
- Кесслер	234
- Кларка	232
- Козера	233
- лактатно-ацетатная	359
- молочная с полимиксином	190
- МРС	150
- Сабуро	243
- Симмонса	233
- синтетическая с лизиним	180
- сульфит-железная	238
- Эйкмана	232
- Энда	227
Среды дифференциально-диагностические	59
- специальные	59
- универсальные	58
- элективные	59
Стафилококки	17
Стенка клеточная	20
Стеригмы	33
Стерилизация	265
Стрептококки	17
Суператигены	120
Супероксида	37

Т

Таксис	30
Таксономия	9
Терморезистентность	69
Термофилы облигатные	68
- факультативные	69
Термофлора	254
Тест шпательный	233
Тест Эйкмана	231
Тетракокки	17
Гление	94
Токсигенность	115
Токсокозы	197
Токсоинфекции	197
Тонопласт	25
Точка плавления ДНК	26
Трансдукция	107
Транспозиция	107
Транспорт активный	50
Трансфермы	45
Трансформация	106

Тургор клетки	49
---------------	----

Ф

Фаги вирулентные	194
Фаги гомологичные	194
Фаги умеренные	194
Фаголизосома	120
Фагосома	120
Филоцитоз	120, 124
Филоциты	252
Фаза бактерицидная	252
Фаза дрожжей и плесени	256
Фаза молочнокислых бактерий	255
Фаза смешанной микрофлоры	253
Факторы роста	50
Фенотип	104
Ферменты индуктивные	43
Ферменты конститутивные	43
Ферменты микроорганизмов	39
Фикомицеты	13
Фитонциды	82
Фосфофазы	45
Фотоавтотрофы	47
Фотобактерии	62
Фотосинтез бактериальный	40

Х

Хемоавтотрофы	47
Хемотип пептидогликана	21
Хромосома бактериальная	25
Хромосомы	103

Ц

Царство грибы	12
Царство прокариот	11
Цитоплазма	24

Ш

Штамм	11
-------	----

Э

Экзина	28
Экзотоксины	115
Экзоферменты	44
Экстракт дрожжевой	177
Эмульсия яичного желтка	241
Эндемии (эпизоотии)	118
Эндотоксины	116
Эндоферменты	44
Эндоситоз	9, 46
Эпидемии (эпизоотии)	118
Эстеразы	45
Эубиотики	395
Эукариоты	8

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Банникова Л.А., Королева Н.С., Семенихина В.Ф. Микробиологические основы молочного производства. - М.: Агропромиздат, 1987. - 400 с.
- Королева Н.С., Семенихина В.Ф. Санитарная микробиология молока и молочных продуктов. - М.: Пищевая промышленность, 1980. - 256 с.
- Микробиология продуктов животного происхождения /г.-Д. Мюнх, Х. Заупе, М. Шрайтер и др./ Пер. с нем. Е.Г. Токаря под ред. д-ра биол. наук Н.С. Королевой, канд. биол. наук Н.В. Билетовой, канд. вет. наук Р.П. Корнелаевой. - М.: Агропромиздат, 1985. - 591 с.
- Полищук П.К., Дербинова Э.С., Казанцева Н.Н. Лабораторный практикум по микробиологии молока и молочных продуктов. - М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. - 200 с.
- Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов. Санитарные правила и нормы (СанПиН 2.3.2.560-96). - М., 1997.
- Определитель бактерий Берджи 9-е изд. в 2-х т. /Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса/ Пер. с англ. под ред. акад. РАН Г.А. Заварзина. - М.: Мир, 1997. Т. 1: - 432 с, Т. 2: - 368 с.
- Производство сыра: технология и качество. Пер. с фр. Б.Ф. Богомолова; Под ред. Г.Г. Шилера. - М.: Агропромиздат, 1989. - 496 с.
- Андрианов Ю.П., Вышемирский Ф.А., Качераускис Д.В. и др., Производство сливочного масла. Справочник. - М.: Агропромиздат, 1988. - 303 с.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
Раздел I. ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ	8
Глава 1. Систематика микроорганизмов	8
1.1. Место бактерий в живой природе	8
1.2. Понятие о систематике микроорганизмов	9
1.3. Классификация бактерий	11
1.4. Классификация грибов	12
1.5. Классификация вирусов	15
Глава 2. Морфология микроорганизмов	17
2.1. Основные формы бактерий	17
2.2. Размеры микроорганизмов	19
2.3. Строение бактериальной клетки	20
2.4. Особенности морфологии грибов	31
2.5. Актиномицеты	36
2.6. Морфология вирусов	36
Глава 3. Физиология микроорганизмов	39
3.1. Особенности метаболизма микроорганизмов	39
3.2. Химический состав микроорганизмов	42
3.3. Ферменты микроорганизмов и их роль в обмене веществ	43
3.4. Анаболизм (питание) микроорганизмов	46
3.5. Катаболизм (дыхание) микроорганизмов	51
3.6. Рост и размножение микроорганизмов	53
3.7. Основные принципы культивирования микроорганизмов	58
3.8. Образование микроорганизмами пигментов и ароматических веществ. Свечение микробов	61
3.9. Особенности физиологии вирусов	63
Глава 4. Влияние экологических факторов на микроорганизмы	67
4.1. Физические факторы	67
4.2. Химические факторы	75
4.3. Биологические факторы	80
Глава 5. Мир микроорганизмов в природе	83
5.1. Микрофлора почвы	83
5.2. Микрофлора воды	85
5.3. Микрофлора воздуха	88
5.4. Микрофлора растений и кормов	90
5.5. Микрофлора тела животных и человека	90
Глава 6. Роль микроорганизмов в превращении веществ	92
6.1. Круговорот азота	92
6.2. Круговорот углерода	95
Глава 7. Основы генетики микроорганизмов	101

7.1. Понятие о наследственности и изменчивости	101
7.2. Материальная основа наследственности. Генотип и фенотип	102
7.3. Формы изменчивости	105
7.3.1. Генетические рекомбинации	105
7.3.2. Мутации	107
7.3.3. Модификация	108
7.4. Основные типы изменчивости	109
7.5. Селекция микроорганизмов. Сущность геной инженерии.	111
Глава 8. Инфекция и иммунитет	113
8.1. Понятие об инфекции и инфекционной болезни	113
8.2. Роль микро- и макроорганизмов в инфекционном процессе	114
8.3. Способы передачи возбудителей, течение и распространение инфекционных болезней	117
8.4. Понятие об иммунитете	118
8.5. Строение системы иммунитета	119
8.6. Взаимодействие клеток в иммунном ответе	120
8.7. Специфические факторы иммунитета (антитела)	121
8.8. Антигены	123
8.9. Барьерные функции тканей и факторы естественной защиты организма	124
8.10. Виды (формы) иммунитета	125
8.11. Практическое использование учения об иммунитете	126
Раздел II. СПЕЦИАЛЬНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ	127
Глава 9. Микроорганизмы, используемые при производстве молочных продуктов	127
9.1. Молочнокислые бактерии	127
9.1.1. Лактококки	127
9.1.2. Лейкококки	135
9.1.3. Термофильный стрептококк	138
9.1.4. Лактобактерии	141
9.2. Пропионовокислые бактерии	163
9.3. Бифидобактерии	167
9.4. Уксуснокислые бактерии	176
9.5. Дрожжи	179
9.6. Слизеобразующая палочка – <i>Brevibacterium linens</i>	182
Глава 10. Возбудители порчи (пороков) молока и молочных продуктов	184
10.1. Гнилостные (протеолитические) бактерии	184
10.2. Маслянокислые бактерии	188
10.3. Энтерококки	189
10.4. Термостойчивые молочнокислые палочки	192
10.5. Бактериофаги	193
Глава 11. Патогенные микроорганизмы, встречающиеся в молоке и молочных продуктах	197
11.1. Возбудители пищевых отравлений	197
11.1.1. Понятие о пищевых токсикозах и токсикоинфекциях	197
11.1.2. Возбудители пищевых токсикозов	198
Патогенные стафилококки	198
Патогенные стрептококки	200
Возбудитель ботулизма	201
Возбудители микотоксикозов	203
11.1.3. Возбудители пищевых токсикоинфекций	204

101	Сальмонеллы	204
201	Кишечные палочки рода <i>Escherichia</i> (Эшерихии)	206
206	Бактерии рода <i>Proteus</i> (Протеи)	207
201	Кластридии перфрингенс (<i>Cl.perfringens</i>)	208
201	<i>Vacillus cereus</i>	210
11.2.	Возбудители кишечных инфекционных заболеваний человека	210
211	Возбудитель бактериальной дизентерии	211
213	Возбудитель холеры	213
215	Возбудители брюшного тифа и паратифов А и В	215
11.3.	Возбудители зооантропонозов	217
217	Возбудители туберкулеза	217
218	Возбудители бруцеллеза	218
219	Возбудитель сибирской язвы	219
221	Возбудитель ящура	221
11.4.	Возбудители мастита	221
Глава 12.	Санитарно-показательные микроорганизмы	224
12.1.	Понятие о санитарно-показательных микроорганизмах	224
12.2.	Бактерии группы кишечных палочек	226
12.3.	Энтерококки	235
12.4.	Сульфитредуцирующие кластридии	237
12.5.	Бактерии рода <i>Proteus</i>	239
12.6.	Стафилококки	240
12.7.	Дрожжи и плесени	242
12.8.	Кишечные бактериофаги	244
12.9.	Общая бактериальная обсемененность (аэробные и факультативно анаэробные мезофильные микроорганизмы)	246
Глава 13.	Микробиология сырого молока	249
13.1.	Источники обсеменения молока микроорганизмами	249
13.2.	Изменение микрофлоры молока при хранении	251
13.3.	Пороки сырого молока	256
13.4.	Микробиологический контроль молока и сливок, поступающих на завод	258
13.5.	Требования, предъявляемые к молоку при приеме	260
Глава 14.	Микробиология питьевого молока и сливок	262
14.1.	Методы снижения бактериальной обсемененности молока	262
14.2.	Пороки питьевого молока	266
14.3.	Контроль производства пастеризованных молока и сливок	267
14.4.	Контроль производства стерилизованных молока и сливок	268
Глава 15.	Закваски	270
15.1.	Исторические сведения об использовании заквасок в молочной промышленности	270
15.2.	Классификация заквасок	270
15.3.	Выделение чистых культур молочнокислых бактерий и определение их производственной ценности	272
15.4.	Принципы подбора культур в состав заквасок	275
15.5.	Приготовление заквасок в специальных лабораториях	277
15.6.	Приготовление и применение заквасок в производственных условиях	283
15.7.	Требования к молоку, используемому для производства заквасок	289
15.8.	Перспективные способы приготовления и применения заквасок	290
15.9.	Научная разработка заквасок и совершенствование их качества	291
15.10.	Пороки заквасок	292

15.11.	Микробиологический контроль качества заквасок	294
Глава 16.	Микробиология кисломолочных продуктов	299
16.1.	Диетические и лечебные свойства кисломолочных продуктов	299
16.2.	Источники микрофлоры кисломолочных продуктов	300
16.3.	Продукты, приготовляемые с использованием многокомпонентных заквасок	301
16.4.	Продукты, приготовляемые с использованием мезофильных молочнокислых стрептококков	304
16.5.	Продукты, приготовляемые с использованием термофильных молочнокислых бактерий	308
16.6.	Продукты, приготовляемые с использованием мезофильных и термофильных молочнокислых стрептококков	309
16.7.	Продукты, приготовляемые с использованием ацидофильных палочек	311
16.8.	Продукты с бифидобактериями	313
16.9.	Микробиологический контроль производства кисломолочных продуктов	315
Глава 17.	Микробиология масла	320
17.1.	Условия развития микроорганизмов в масле	320
17.2.	Источники микрофлоры масла	322
17.3.	Бактериальная закваска для кисломолочного масла и биологическое сквашивание сливок	323
17.4.	Формирование запаха масла	326
17.5.	Состав микрофлоры и его изменение в процессе хранения масла	327
17.6.	Пороки масла	329
17.7.	Повышение стойкости масла	331
17.8.	Микробиологический контроль производства масла	333
Глава 18.	Микробиология сыра	335
18.1.	Значение микроорганизмов в сыроделии	336
18.2.	Источники первичной микрофлоры сыра	337
18.3.	Сыроригиальность молока	337
18.4.	Развитие микробиологических процессов при выработке сыра	339
18.5.	Особенности микробиологических процессов при созревании различных сыров	344
18.6.	Сушность биохимических процессов при созревании сыров	348
18.7.	Образование рисунка сыров	352
18.8.	Способы ускорения процессов созревания сыров	353
18.9.	Пороки сыров	354
18.10.	Микробиологический контроль производства сыров	357
Глава 19.	Микробиология консервированных молочных продуктов и мороженого	365
19.1.	Принципы консервирования молочных продуктов	365
19.2.	Стерилизованные молочные консервы	367
19.3.	Стуженные молочные консервы с сахаром	369
19.4.	Сухие молочные продукты	372
19.5.	Микробиология мороженого	374
Глава 20.	Микробиология вторичного молочного сырья	378
20.1.	Молочная сыворотка	378
20.2.	Пахта	380
20.3.	Обезжиренное молоко	381

Глава 21. Основы промышленной санитарии на предприятиях молочной промышленности	383
21.1. Понятие о гигиене и санитарии	383
21.2. Общие санитарно-гигиенические требования к предприятиям молочной промышленности	384
21.3. Санитарно-гигиенические мероприятия на предприятиях молочной промышленности	385
21.4. Личная гигиена работников	388
21.5. Санитарно-микробиологическое нормирование молочных продуктов. Граница риска	389
21.6. Микробиологический контроль производства молочных продуктов	391
Глава 22. Пробиотики	394
22.1. Понятие о пробиотиках	394
22.2. Требования, предъявляемые к микроорганизмам-пробиотам	396
22.3. Механизм действия пробиотиков	397
Предметный указатель	403
Список рекомендуемой литературы	407

Формат 60x80 1/16
 Бумага офсетная
 Гарнитурa "Times"
 Подписано в печать 30.12.99г.
 Объем 26 п.л.
 Тираж 1000, заказ № 1948-99
 Типография ООО "Все для Вас-Подмосковье"
 г. Сергиев Посад Московской области