

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ - ФИЛИАЛ ФЕДЕРАЛЬНОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «УЛЬЯНОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ П.А.СТОЛЫПИНА»**

Ю.Р. Гирфанова

Курс лекций

ПИЩЕВАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Направление подготовки: 19.03.04 Технология продукции и организация

общественного питания

Профиль: Технология продукции и организация ресторанного бизнеса

Квалификация выпускника: бакалавр

Форма обучения: очно-заочная, заочная

Димитровград 2022 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|-----|
| Тема 1. Введение. Предмет и история развития, задачи микробиологии и связь с другими наукам. Роль отечественных и зарубежных ученых в развитии микробиологии. Морфология и строение микробной клетки. Систематика микроорганизмов..... | 4 |
| Тема 2. Физиология микроорганизмов. Химический состав, питание, дыхание, рост и размножение микробной клетки | 40 |
| Тема 3. Влияние физических, химических, биологических факторов на микроорганизмы. Понятие об асептике и антисептике. Стерилизация и дезинфекция. Экология микроорганизмов (распространение в природе, почве, воде, воздухе) | 58 |
| Тема 4. Бактериологическое исследование мяса. Санитарно-микробиологическое исследование мяса и мясных продуктов..... | 89 |
| Тема 4.1. Микрофлора мяса при охлаждении и замораживании | 121 |
| Тема 4.2. Микрофлора мяса и мясопродуктов при посоле | 126 |
| Тема 5. Микробиология производства мясных, мясорастительных, растительных и молочных консервов..... | 131 |
| Тема 6. Микробиологические изменения при производстве колбас | 144 |
| Тема 7. Микробиология молока и молочных продуктов | 205 |
| Тема 7.1 Микрофлора питьевого молока..... | 206 |
| Тема 7.2 Характеристика основных представителей микрофлоры молочных продуктов..... | 223 |
| Тема 7.3. Взаимоотношения между основными представителями микрофлоры цельномолочных продуктов | 239 |
| Тема 7.4. Первичная микрофлора кисломолочных продуктов..... | 249 |
| Тема 7.5. Вещества, необходимые для развития молочнокислых бактерий..... | 269 |
| Тема 8. Микробиология рыбы и рыбных продуктов..... | 303 |
| Тема 8.1. Факторы, влияющие на жизнедеятельность микроорганизмов | 303 |
| Тема 8.2. Микроорганизмы, наиболее часто встречающиеся в рыбе и рыбных продуктах..... | 305 |
| Тема 8.3. Ветеринарно-санитарная оценка рыбы | 312 |
| Тема 8.4. Рыба как источник возбудителей болезней человека | 319 |
| Тема 9. Микробиология хлебопекарного, макаронного и кондитерского производств | 323 |
| Микробиология хлебопекарного производства..... | 323 |
| Микробиология макаронного производства и крупы | 329 |
| Микробиология кондитерского производства..... | 332 |
| Тема 10. Микробиология яиц и яйцепродуктов..... | 336 |
| Тема 11. Микробиология бродильных производств | 340 |
| Микробиология пивоваренного производства | 340 |
| Микробиология спиртового производства..... | 351 |
| Микробиология производства безалкогольных напитков и кваса..... | 357 |
| Микробиология виноделия..... | 364 |
| Список рекомендуемой литературы | 369 |

Тема 1. Введение. Предмет и история развития, задачи микробиологии и связь с другими наукам. Роль отечественных и зарубежных ученых в развитии микробиологии. Морфология и строение микробной клетки. Систематика микроорганизмов.

Микробиология (греч. *Mikros* - малый, лат. *bios* - жизнь) - наука, предметом изучения которой являются микроскопические существа, названные микроорганизмами, или микробами, их биологические признаки, систематика, экология, взаимоотношения с другими организмами, населяющими нашу планету, - животными, растениями и человеком.

Микроорганизмы - наиболее древняя форма организации жизни на Земле, они появились задолго до возникновения растений и животных - примерно 3-4 млрд. лет тому назад. В настоящее время они представляют собой по количеству самую значительную и самую разнообразную часть организмов, населяющих биосферу Земли. Это послужило основанием для разделения всех микроорганизмов на 4 больших царства: бактерии, грибы, простейшие и вирусы. Каждая из них является объектом изучения отдельных разделов микробиологии, самостоятельных дисциплин - бактериологии, микологии, протозоологии и вирусологии.

В процессе развития микробиологии были разработаны оригинальные методы исследования, многие заимствованы из других дисциплин - биофизики, биохимии, генетики, цитологии и т.д.

За всю историю своего развития перед микробиологией так же, как и другими естественными науками, стояли определенные цели и задачи, успешное развитие которых способствовало научному и общественному прогрессу всего человечества. Это в свою очередь стимулировало развитие специализированных разделов микробиологии.

Так сформировались общая, техническая, сельскохозяйственная, ветеринарная, медицинская, санитарная, морская, космическая микробиология.

Общая микробиология изучает наиболее общие закономерности, свойственные каждой группе перечисленных микроорганизмов: структуру, метаболизм, генетику, экологию и т.д.

Основной задачей технической (промышленной) микробиологии является разработка биотехнологии синтеза микроорганизмами биологически активных веществ: белков, витаминов, ферментов, спиртов, органических кислот, антибиотиков и др.

Сельскохозяйственная микробиология занимается изучением микроорганизмов, которые участвуют в круговороте веществ, используются для изготовления удобрений, вызывают заболевания растений, и другими проблемами.

Ветеринарная микробиология изучает возбудителей заболеваний животных, разрабатывает методы их биологической диагностики, специфической профилактики и этиотропного лечения, направленного на уничтожение микробов-возбудителей в организме больного животного.

Предметом изучения медицинской микробиологии являются болезнетворные (патогенные) и условно-патогенные для человека микроорганизмы, а также разработка методов микробиологической диагностики, специфической профилактики и этиотропного лечения вызываемых ими инфекционных заболеваний.

Одновременно с медицинской микробиологией сформировалась иммунология, которая занимается изучением специфических механизмов защиты организмов людей и животных от болезнетворных микроорганизмов и другими проблемами.

Предметом изучения санитарной микробиологии, тесно связанной с медицинской и ветеринарной микробиологией, является санитарно-микробиологическое состояние объектов окружающей среды, пищевых продуктов и напитков.

Важнейшая задача данного раздела - разработка санитарно-микробиологических нормативов и методов индикации патогенных микроорганизмов в различных объектах окружающей среды.

В большинстве медицинских вузов на кафедре микробиологии изучаются три самостоятельных дисциплины - медицинская микробиология, вирусология и иммунология, в становлении и развитии которых просматривается несколько исторических периодов.

1. Начальный период, который охватывает период второй половины XVIII в. - середины XIX в. Он связан с созданием А. Левенгуком простейшего микроскопа и открытием микроскопических существ, не видимых глазом человека.

2. Пастеровский период (вторая половина XIX в.), связанный с именем Луи Пастера, характеризуется становлением и развитием микробиологии и иммунологии как самостоятельной единой естественнонаучной дисциплины, имеющей свои объекты и оригинальные методы их исследования.

3. Третий период, охватывающий первую половину XX в., характеризуется дальнейшим развитием микробиологии и иммунологии и становлением вирусологии - науки о вирусах, особой форме живой материи.

Современный период, начало которому было положено в середине текущего столетия научно-технической революцией в естествознании.

Начальный период развития микробиологии

Мысль о существовании невидимых живых существ возникла еще в глубокой древности. Однако открытие мира микроорганизмов произошло только в XVII в. Первооткрывателем микробов явился *Антоний Левенгук* (1632-1723), купец по профессии, который стал крупнейшим натуралистом своего времени. Овладев искусством шлифования стекол, он изготовил линзы, которые давали большие увеличения. С их помощью Левенгук обнаружил мельчайших «живых зверьков» *animalculae vivae* в дождевой воде, зубном налете, загнившем мясе и других предметах. Свои наблюдения он обобщил в книге «Тайны природы, открытые Антонию Левенгуком».

Таким образом, был установлен сам факт существования

микроорганизмов, хотя роль их продолжала оставаться неизвестной *Антоний Левенгук* (1632-1723)

Предположения о роли микроорганизмов в возникновении заразных болезней человека, и прежде всего чумы, высказывались некоторыми учеными и врачами (А. Кирхер, Д. Самойлович и др.) еще в конце XVI в. Однако только в 30-х годах XIX в., после обнаружения трихомонад в вагинальном содержимом женщин, страдающих трихомонозом, а также грибов у больных фавусом (паршей) и трихофитией (стригушим лишаем), позволило французскому медику Я. Генле сформулировать идею о связи между инфекциями и их возбудителями. Эта связь проявлялась в способности возбудителя размножаться в тканях и вызывать типичное течение инфекционных болезней. В 1849-1850 гг. были описаны палочковидные бактерии, обнаруженные в крови коров и овец, больных сибирской язвой.

Эти и другие наблюдения предшествовали признанию этиологической роли микроорганизмов в инфекционных заболеваниях людей и животных.

Развитие микробиологии во второй половине XIX в. (пастеровский период)

Развивающаяся винодельческая промышленность Франции и других стран требовала решения ряда биотехнологических вопросов. В частности, выяснения и устранения причин скисания вина. Люди в течение двух тысячелетий получали виноградное вино с помощью спиртового брожения. Однако его природа оставалась загадкой. В области медицины также назрела необходимость установления причин нагноения ран и природы заразных заболеваний. История терпеливо ждала своего гения, которым оказался молодой французский химик *Луи Пастер* (1822-1895).

Л. Пастер экспериментально доказал, что спиртовое брожение вызывается определенными видами микроорганизмов, а скисание вина связано с попаданием в виноградный сок посторонних видов, вызывающих уксуснокислое брожение. Для борьбы с ним он предложил метод термической обработки виноградного сока.

Полученные данные позволили Пастеру допустить, что инфекционные болезни человека представляют по сути «брожение соков организма», вызванное определенными микроорганизмами. Они же являются виновниками гнойных послеоперационных осложнений. Идеи Пастера разделил и английский хирург Д. Листер, который впервые использовал раствор карболовой кислоты для обеззараживания ран. Его статья «Об антисептическом принципе в хирургической практике» (1867) положила начало антисептической эре в медицине.

В эти же годы Пастер упорно доказывал скептически настроенным медикам, что родильная горячка, от которой погибала каждая пятая рожавшая в Париже женщина, фурункулез, остеомиелит и сибирская язва вызываются определенными микроорганизмами. Случай определил дальнейшую направленность научных поисков Пастера. Работая с

микроорганизмами - возбудителями куриной холеры, он получил культуры, потерявшие болезнетворные свойства. Прививка здоровым птицам такого штамма предохраняла их от последующего заражения болезнетворными возбудителями. Пастер назвал данный метод вакцинацией в честь Э. Дженнера, который еще в 1797 г. использовал прививки материала, взятого от больных оспой коров (осповакцины) для предупреждения заболеваний натуральной оспой среди людей.

Таким образом, открытие Дженнером отдельного факта, сущность которого оставалась неясной на протяжении почти 100 лет, было преобразовано Пастером в общую закономерность, свойственную болезнетворным микроорганизмам. Он открыл способ превращения смертельного «яда» в «противоядие» - вакцину.

Вершиной всей научной деятельности Пастера и апофеозом торжества микробиологической науки стали исследования, закончившиеся в 1886 г. изготовлением вакцины против бешенства. Хотя Пастеру не удалось обнаружить возбудителя бешенства у больных собак, он доказал, что последний находится в головном мозге больных животных. Из мозга зараженного бешенством кролика Пастер приготовил вакцину, которую случай помог ему испытать на мальчике, искусанном бешеным волком. Результат превзошел все ожидания - мальчик остался жив. В Париж из разных стран стали прибывать люди, искусанные бешеными животными. Они искали спасение в лаборатории Пастера, вследствие чего потребовались большие количества вакцин. Одной из первых стран, где было налажено производство антирабической вакцины по методу Пастера, оказалась Россия. В июне 1886 г. И.И. Мечников и Н.Ф. Гамалея организовали в Одессе лабораторию, в которой начали проводить прививки против бешенства.

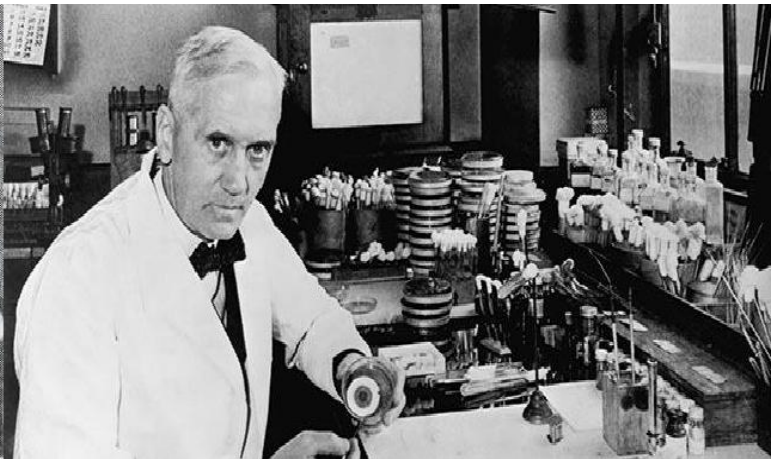
Эта лаборатория в честь Пастера была названа Пастеровской станцией. Гениальные идеи и открытия Л. Пастера составили целую эпоху в биологии и медицине и нашли широкое практическое применение. Он явился основоположником микробиологии как фундаментальной науки, так и основателем французской школы микробиологов, которая оказала существенное влияние на развитие микробиологии в других странах и прежде всего в России.

Примерно в те же годы сформировалась и успешно работала немецкая школа микробиологов во главе с Робертом Кохом (1843-1910). Кох начал свои исследования в то время, когда роль микроорганизмов в этиологии инфекционных заболеваний подвергалась серьезным сомнениям.

Для ее доказательства требовались четкие критерии, которые были сформулированы Кохом и вошли в историю под названием «триады Генле - Коха». Суть триады заключалась в следующем:



Р. Кох (1843-1910)



А.Флеминг (1881-1955)

1) предполагаемый микроб-возбудитель всегда должен обнаруживаться только при данном заболевании, не выделяться при других болезнях и от здоровых лиц;

2) микроб-возбудитель должен быть выделен в чистой культуре;

3) чистая культура данного микроба должна вызвать у экспериментальных зараженных животных заболевание с клинической и патологической картиной, аналогичной заболеванию человека.

Практика показала, что все три пункта имеют относительное значение, поскольку далеко не всегда удается выделить возбудителя болезни в чистой культуре и вызвать у подопытных животных заболевание, свойственное человеку. Кроме того, болезнетворные микроорганизмы были найдены у здоровых людей, особенно после перенесенного заболевания. Тем не менее на ранних этапах развития и формирования медицинской микробиологии, когда из организма больных выделяли многих микроорганизмов, не имеющих отношения к данной болезни, триада сыграла важную роль для установления истинного возбудителя заболевания. Исходя из своей концепции, Кох окончательно доказал, что ранее обнаруженный у животных, больных сибирской язвой, микроорганизм отвечает требованиям триады и является истинным возбудителем данного заболевания. Попутно Кох установил способность сибиреязвенных бактерий образовывать споры.

Велика роль Коха в разработке основных методов изучения микроорганизмов. Так, он ввел в микробиологическую практику метод выделения чистых культур бактерий на твердых питательных средах, впервые использовал анилиновые красители для окраски микробных клеток и применил для их микроскопического изучения иммерсионные объективы и микрофотографирование.

В 1882 г. Кох доказал, что выделенный им микроорганизм является возбудителем туберкулеза, который был впоследствии назван палочкой Коха. В 1883 г. Кох с сотрудниками выделил возбудителя холеры - холерный вибрион (вibriон Коха).

С 1886 г. Кох полностью посвящает свои исследования поискам средств, эффективных для лечения или профилактики туберкулеза. В ходе этих исследований им был получен первый противотуберкулезный препарат - туберкулин, представляющий собой вытяжку из культуры туберкулезных бактерий. Хотя туберкулин не обладает лечебным действием, его с успехом применяют для диагностики туберкулеза.

Научная деятельность Коха получила мировое признание, и в 1905 г. ему была присуждена Нобелевская премия по медицине.

Используя методы, разработанные Кохом, французские и немецкие бактериологи открыли многие бактерии, спирохеты и простейшие - возбудители инфекционных болезней человека и животных. Среди них возбудители гнойных и раневых инфекций: стафилококки, стрептококки, клостридии анаэробной инфекции, кишечная палочка и возбудители кишечных инфекций (брюшнотифозная и паратифозные бактерии, дизентерийные бактерии Шига), возбудитель кровяной инфекции - спирохета возвратного тифа, возбудители респираторных и многих других инфекций, в том числе вызванных простейшими (плазмодии малярии, дизентерийная амeba, лейшмании). Этот период называют «золотым веком» микробиологии.

Тогда же была открыта способность некоторых бактерий образовывать токсины (экзотоксины). Так, в 1888 г. Э. Ру и А. Иерсен впервые выделили дифтерийный экзотоксин, что объяснило патогенетические особенности дифтерии. Через несколько лет Э. Ру и Э. Беринг получили антитоксическую противодифтерийную сыворотку, спасшую сотни тысяч детей от смерти, а в 1894 г. Г.Н. Габричевский налазил ее производство в России.

Эти работы заложили основы иммунологии. Одним из основоположников новой науки явился И.И. Мечников (1845-1916) - создатель фагоцитарной, или клеточной, теории иммунитета. В 1888 г. Мечников принял приглашение Пастера и возглавил лабораторию в его институте. Однако Мечников не порвал тесных связей со своей родиной. Он неоднократно приезжал в Россию, а в его Парижской лаборатории работали многие русские врачи. Среди них Я.Ю. Бардах, В.А. Барыкин, А.М. Безредка, М.В. Вейнберг, Г.Н. Габричевский, В.И. Исаев, Н.Н. Клодницкий, И.Г. Савченко, Л.А. Тарасевич, В.А. Хавкин, Ц.В. Циклинская, Ф.Я. Чистович и другие, которые внесли существенный вклад в развитие отечественной и мировой микробиологии, иммунологии и патологии.

Большое созидательное значение приобрела дискуссия, развернувшаяся между Мечниковым и его сторонниками с последователями гуморальной теории, видевшими в основе иммунитета действие антител. Начало учению об антителах положили работы П. Эрлиха, а затем Ж. Борде, выполненные в последнее десятилетие XIX в.

Вклад Пауля Эрлиха (1854-1915) в развитие иммунологии, так же как в становление и развитие химиотерапии, не оценим. Этот ученый впервые сформулировал понятия об активном и пассивном иммунитете и явился автором всеобъемлющей теории гуморального иммунитета, в которой объяснялось как происхождение антител, так и их взаимодействие с

антигенами. Отдельные положения этой теории явились плодотворными рабочими гипотезами, экспериментальная проверка которых привела к новым открытиям. Предсказанное Эрлихом существование рецепторов клеток, специфически взаимодействующих с определенными группами антигенов, в течение многих лет подвергалось уничтожающей критике. Однако она была возрождена во второй половине XX столетия в теории Бернета и на молекулярном уровне получила всеобщее признание.

И.И. Мечников одним из первых понял, что гуморальная и фагоцитарная теории иммунитета не являются взаимоисключающими, а только дополняют друг друга. В 1908 г. Мечникову и Эрлиху совместно была присуждена Нобелевская премия за работы в области иммунологии.

В заключение следует отметить, что конец XIX в. ознаменовался эпохальным открытием царства *Vira*. Первым представителем этого царства явился вирус табачной мозаики, поражающий листья табака, открытый в 1892 г. сотрудником кафедры ботаники Петербургского университета Д.И. Ивановским, вторым - вирус ящура, вызывающий одноименное заболевание у домашних животных, открытый в 1898 г. Ф. Леффлером и П. Фрошем. Однако эти открытия не могли быть в то время по достоинству оценены и остались едва замеченными на фоне блестящих успехов бактериологии.

Развитие микробиологии в первой половине XX в.

Бурное развитие микробиологии и иммунологии в последние десятилетия XIX в. закончилось к началу XX в. Это объясняется неравномерностью развития естественных наук, когда одна из них намного обгоняет другие. Так случилось с микробиологией и иммунологией, дальнейшее развитие которых тормозилось отставанием биохимии, генетики, биофизики.

Основные цели и задачи, которые встали перед микробиологией в этот период, заключались в дальнейшем изучении болезнетворных микроорганизмов, открытии новых возбудителей, особенно вирусов, а также средств борьбы с вызываемыми ими инфекционными заболеваниями и усовершенствовании методов их диагностики.

В первые десятилетия текущего столетия продолжалось выделение и изучение возбудителей инфекционных болезней, вызывающих возвратный тиф, лептоспироз, сифилис и др. В данный период американским микробиологом Риккетсом и независимо от него Э. Роха-лимой и С. Провацекком была открыта новая группа микроорганизмов, получившая впоследствии название риккетсий (возбудители сыпного тифа и других лихорадок). Позднее были открыты хламидии, вызывающие трахому, орнитозы; болезнетворные простейшие возбудители токсоплазмоза.

Особый интерес представили открытия фильтрующихся агентов, размеры которых были значительно меньше размеров бактерий и простейших, что позволяло им проходить через фильтры, задерживающие другие микроорганизмы. Поэтому они получили название фильтрующихся вирусов.

После открытия вируса табачной мозаики и вируса ящура в 1901 г. был выделен первый фильтрующийся вирус, вызывающий желтую лихорадку у человека. Затем были описаны подобные агенты, вызывающие полиомиелит, ветряную оспу, грипп, паротит и другие заболевания человека.

Таким образом, в течение двух десятилетий были описаны необычные возбудители инфекционных заболеваний растений, животных и человека. Они были названы фильтрующимися вирусами (лат. *virus* - яд). Точнее, были открыты не сами вирусы, а инфекционное начало, содержащееся в фильтрате материалов, взятых для исследования. Впоследствии, когда оказалось, что фильтруемость присуща не только вирусам, но и некоторым формам бактерий (L-формы) и микоплазмам, их просто стали называть вирусами. Следует особо отметить открытие П. Раусом в 1911 г. онкогенного вируса, вызывающего саркому у кур, и д'Эррелем в 1917 г. Бактериофага - вируса, поражающего бактерий.

Однако в этот период развитие вирусологии происходило медленными темпами. Это было связано с отсутствием электронного микроскопа, что делало вирусы невидимыми, почти гипотетическими агентами, а также использующихся ныне химических и физических методов исследования, необходимых для изучения их структуры, химического состава и других признаков. Вместе с тем неспособность вирусов расти аналогично бактериям на искусственных питательных средах чрезвычайно затрудняла их выделение и изучение. Единственным методом до 1933 г. было культивирование вируса в организме восприимчивых животных, т.е. заражение лабораторных животных с целью воспроизведения экспериментальной инфекции. В 1933 г. положение несколько облегчилось после открытия А. Вудраффом и Э. Гудпасчером способности вируса гриппа размножаться внутри куриного эмбриона. Позднее было доказано, что куриные эмбрионы можно использовать для накопления многих других вирусов.

В 1944 г. в Институте им. Листера М. Итоном и др. был выделен возбудитель атипичной пневмонии, являющийся первым представителем нового класса микроорганизмов - микоплазм.

Классические работы Пастера по вакцинопрофилактике сибирской язвы и бешенства стимулировали поиски новых вакцин. Французскими ветеринарными врачами Ш. Кальметом и К. Гереном была получена вакцина из туберкулезной палочки, названная БЦЖ (BCG - первые буквы фамилий этих ученых), которая до сих пор используется для вакцинации детей против туберкулеза.

В 20-х годах Г. Рамоном были созданы анатоксины (токсины, обезвреженные формалином) для профилактики дифтерии и столбняка.

Кроме того, продолжались исследования по серологической диагностике инфекционных заболеваний, основанные на выявлении антител в сыворотке крови больных и переболевших людей. Так были разработаны серологические реакции для диагностики сифилиса (реакция Вассермана), брюшного тифа и паратифов (реакция Видаля), сыпного тифа (реакция Вейля - Феликса).

Вместе с тем применение лечебных сывороток, содержащих антитела к возбудителям заболеваний или их токсинам, нередко сопровождалось тяжелыми осложнениями и даже смертельным исходом. Французские ученые *Ш. Рише* и *П. Портье* (1902) показали, что причиной подобных осложнений является чужеродный сывороточный белок, поскольку лечебные сыворотки приготавливались путем иммунизации лошадей или других животных. Так было положено начало изучению иммунопатологических реакций организма (аллергия и др.), которое продолжается и в настоящее время.

В первой половине XX столетия произошло и другое важное событие в истории микробиологии и медицины - становление и развитие химиотерапии. Основоположник этого направления - П. Эрлих.

Химиотерапевтические идеи Эрлиха, соответствующие его иммунологическим воззрениям, получили свое выражение в концепции «большой стерилизующей терапии». Они заключались в создании химических соединений («волшебных пуль»), которые, избирательно фиксируясь на рецепторах микробной клетки, оказывают угнетающее действие только на нее, не затрагивая при этом клеток организма. Эрлихом было установлено губительное действие ряда красителей, в частности трипанового красного, на трипаносом, который не повреждал при этом клетки макроорганизма.

Следующей мишенью химического нападения был избран возбудитель сифилиса - бледная трепонема, которая по своим свойствам напоминала трипаносомы. При этом Эрлих в качестве «волшебной пули» избрал не красители, а производное мышьяка - атоксил, который наряду с трипаноцидным действием обладал токсическими свойствами. Эрлих с сотрудниками синтезировали и испытали на зараженных сифилисом кроликах свыше 600 производных атоксила. Лучший из них, сальварсан (препарат № 606) уничтожал трепонем в организме кроликов, не оказывая на животных токсического действия. Через несколько лет была получена более стабильная и легко растворимая форма сальварсана - неосальварсан (препарат № 914). Синтез этих противосифилитических препаратов явился триумфом химиотерапии.

В начале 30-х годов был синтезирован противомаларийный препарат - плазмахин, заменяющий естественный алкалоид хинин, который позднее под названием плазмоцид был получен в СССР. В 1932 г. в Германии, а затем в СССР был синтезирован второй заменитель хинина - атебрин (акрихин). В те же годы в Германии Г. Домакгом был получен первый антибактериальный препарат, действующий на стрептококки, гонококки и некоторые другие бактерии. Он представлял собой производное сульфаниламида, связанное с красителем. Вскоре было показано, что его антибактериальная активность обусловлена сульфаниламидом, а не красителем. Очищенный препарат был выпущен в продажу под названием белого стрептоцида. В 1937 г. советскими химиками И.И. Постовским и Л.Н. Гульдеревым и независимо от них Эваном и Филипсом было синтезировано другое производное сульфаниламида - сульфидин, который действовал на пневмококки и другие бактерии. В

последующие годы было получено огромное количество сульфа-миламидов, из которых практическое применение нашли немногие. Это объясняется довольно узким антибактериальным спектром этих препаратов, формированием резистентных к ним бактерий и другими причинами.

После начала Второй мировой войны потребовались новые лечебные препараты, прежде всего для борьбы с гнойными раневыми инфекциями. Еще в 1928 г. английский микробиолог А. Флеминг обратил внимание на отсутствие роста стафилококков вокруг колоний зеленой плесени - гриба рода *Penicillium*. Однако выделить продуцируемое этим грибом антибактериальное вещество, названное Флемингом пенициллином, ему не удалось. Только в 1940 г. английскими исследователями Г. Флори и Э. Чейном была получена стабильная форма пенициллина (в виде его соли). Огромный успех, сопутствующий клиническому применению пенициллина при гнойных инфекциях и сепсисе, стимулировал проведение широких исследований, направленных на поиски новых антибактериальных веществ, выделяемых грибами. Эти вещества, по предложению американского микробиолога Э. Ваксмана, были названы антибиотиками. В 1944 г. Ваксман с сотрудниками получили новый антибиотик из актиномицетов, который они назвали стрептомицином. Он обладал высокой антибактериальной активностью в отношении многих бактерий, в том числе туберкулезной палочки.

В 1943 г. производство пенициллина было налажено в США. В конце Великой Отечественной войны пенициллин начал производиться в нашей стране под руководством З.В. Ермольевой. Сенсационными успехами химиотерапии заканчивается первая половина XX в.



З.Ф Ермольева
(1898-1974)



С.Н.Виноградский
(1898-1974)

Развитие микробиологии в России

К одним из первых «охотников за микробами» в России относится русский ботаник Л.С. Ценковский (1822-1887), который организовал в руководимой им лаборатории производство сибиреязвенной вакцины, а в 1883 г. успешно использовал ее для вакцинации скота. Существенный вклад в изучение сибирской язвы у человека, чумы и проказы внес Г.Н. Минх (1836-1896). Его имя получило широкую известность после проведенного им опыта самозаражения, доказавшего, что спирохета возвратного тифа, обнаруженная Обермейером в крови больных, действительно является возбудителем данного заболевания.

О.О. Мочутковский (1845-1903) в одном из опытов самозаражения ввел себе кровь больной сыпным тифом и заболел, доказав тем самым, что возбудитель заболевания присутствует в крови больного.

Широкую известность получили работы Ф.А. Леша (1840-1903), в которых было показано, что дизентерию могут вызывать простейшие, принадлежащие к амебам.

Большое значение в развитии отечественной микробиологии сыграла общественная и научная деятельность И.И. Мечникова, создателя фагоцитарной теории иммунитета. В 1892 г. он опубликовал свой труд «Лекции по сравнительной патологии воспаления», в котором как выдающийся мыслитель рассмотрел патологические процессы с позиций эволюционной теории. В 1901 г. появляется его новая книга «Невосприимчивость к инфекционным болезням», в которой подведены итоги многолетних исследований в области иммунитета.

Введение в России прививок против сибирской язвы открыло дорогу вакцинации против бешенства. При содействии Луи Пастера в Одессе была открыта в 1886 г. первая бактериологическая, Пастеровская, станция, заведовать которой был приглашен И.И. Мечников, а его помощниками стали Н.Ф. Гамалея и Л.В. Бардах.

В 1887 г. в Харькове была открыта вторая Пастеровская станция. В 90-х годах в России уже существовал ряд бактериологических школ.

Главным центром Петербургской бактериологической школы стал Институт экспериментальной медицины. Заведующим бактериологическим отделом был утвержден С.Н. Виноградский, получивший мировую известность своими работами в области общей микробиологии. С помощью разработанного им метода элективных культур Виноградский открыл серо- и железобактерии, нитрифицирующие бактерии - возбудители процесса нитрификации в почве.

В этом отделе одной из лабораторий заведовал Д.К. Заболотный (1866-1929), работы которого по микробиологии и эпидемиологии чумы, холеры, брюшного тифа и экспериментального сифилиса получили широкую известность. В 1898 г. он организовал и в течение 30 лет руководил первой в России самостоятельной кафедрой микробиологии при Женском медицинском институте (ныне С.-Петербургский Государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова).

Д.К. Заболотным были установлены пути передачи чумы от грызунов, роль тарбаганов как носителей возбудителя, природная очаговость чумы. Эти работы положили начало развитию отечественной эпидемиологии.

В состав Института экспериментальной медицины входила чумная лаборатория, созданная в 1898 г. на одном из фортов, вблизи Кронштадта. Она стала российским центром исследований по чуме. Здесь готовили противочумную сыворотку и вакцину, а также противохолерную сыворотку. В 1903 г. в Петербурге было учреждено Русское микробиологическое общество.

Главой московской бактериологической школы и одним из лидеров российских бактериологов был Г.Н. Габричевский (1860-1907), который в 1895 г. возглавлял открытый на частные средства Бактериологический институт при Московском университете. Он работал в области специфического лечения и профилактики скарлатины, возвратного тифа. Его стрептококковая теория происхождения скарлатины в конечном итоге завоевала всеобщее признание. Габричевский является автором «Руководства к клинической бактериологии для врачей и студентов» (1893) и учебника «Медицинская бактериология», который выдержал четыре издания.

Московскую школу представляли М.Н. Берестнов (изучение возбудителя актиномикоза), В.И. Кедровский (получение культуры возбудителя проказы на искусственной питательной среде), Е.И. Марциновский (установление природы кожного лейшманиоза), П.В. Циклинская (1859-1923) - первая женщина-бактериолог (работы по микрофлоре кишечного тракта взрослых и детей), проделала огромнейшую работу по предотвращению эпидемий различных инфекционных заболеваний.

В 50-70-е годы А.А. Смородинцевым с сотрудниками были получены вакцины для профилактики гриппа, кори, краснухи, паротита и совместно с М.П. Чумаковым - живая вакцина против полиомиелита.

Многие отечественные ученые - В.А. Барыкин, И.Л. Криевский, Л.А. Зильбер, П.Ф. Здродовский, В.Д. Тимаков, З.В. Ермольева, А.А. Смородинцев, В.И. Иоффе, В.М. Жданов и др. - внесли существенный вклад в развитие микробиологии, вирусологии и иммунологии.

Следует отметить уникальный вклад, внесенный ленинградскими медиками в годы блокады Ленинграда (1941-1943 гг.), когда они сумели предотвратить возникновение эпидемических заболеваний, особенно кишечных инфекций, в голодающем городе. Это М.А. Рапопорт, М.Н. Фишер, Э.М. Новгородская, Н.К. Токаревич и многие другие.

При медицинских институтах, переименованных сейчас в академии и университеты, работают кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, где наряду с учебной проводится научно-исследовательская работа по разным проблемам медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии

Морфология бактерий (прокариот)

Бактериальный организм состоит из одной клетки, которая обладает определенным строением, свойствами и функциями. В зависимости от строения клетки, или ее организации, существует два основных типа клеток - эукариотные и прокариотные.

Эукариоты - это микроорганизмы с истинным ядром (от греч. эу-истинный, карио - ядро); к ним относят грибы, водоросли и простейшие микроорганизмы. Клетки эукариот содержат ряд органелл (ядро, пластиды), которые аналогичны соответствующим органеллам клеток высших растений. В этом проявляется сходство строения одноклеточных организмов с клетками высших растений.

Прокариоты - микроорганизмы, имеющие примитивный ядерный аппарат и не содержащие митохондрий и хлоропластов. К ним относят бактерии и синезеленые водоросли, или цианобактерии, как их теперь принято называть. Таким образом, прокариотная и эукариотная организации клеток принципиально различны. Ниже рассматривается строение прокариотной (бактериальной) клетки

Бактерии (греч. *bakterion* - палочка) - микроорганизмы с прокариотным типом строения. Преимущественно это одноклеточные организмы, однако существует немало форм, состоящих из многих клеток. Термин «прокариоты» равнозначен термину «бактерии».

Форма и размеры бактерий

По форме клеток бактерии подразделяются на три основные группы: шаровидные, или кокки, палочковидные и извитые (рис. 1).

Кокки (греч. *kokkos* - зерно, лат *coccus* - ягода). Имеют сферическую форму в виде правильного шара, эллипса, боба, ланцета. В зависимости от взаимного расположения клеток после деления различают: микрококки, или монококки, стафилококки, диплококки, стрептококки, тетракокки и сардины.

Микрококки (лат. *micrococcus* - маленький) делятся в равных плоскостях и располагаются одиночно, парами или беспорядочно. Сапрофиты, обитают в почве, воде, воздухе. Например, *Micrococcus luteus*.

С тафилококки (греч. *staphyle* - виноградная гроздь) - кокки, делящиеся в различных плоскостях и располагающиеся несимметричными гроздьями, иногда одиночно, парами, тетрадами. Сапрофиты и патогенные. Например, *Staphylococcus aureus*.

Диплококки (греч. *diploos* - двойной) делятся в одной плоскости, образуя попарно соединенные кокки. Например, *Azotobacter chroococcum*.

Стрептококки (греч. *streptos* - цепочка) - кокки, расположенные в виде цепочки, встречаются одиночные и парные клетки, иногда тетрады. Образуются при делении в одной плоскости. Сапрофиты и патогенные. Например, *Streptococcus pyogenes*.

Тетракокки (греч. *tetra* - четыре) - кокки, которые делятся в двух взаимно перпендикулярных плоскостях и располагаются по четыре.

С а р ц и н ы (лат. *sarcio* - связываю) - кокки, делящиеся в трех взаимно перпендикулярных плоскостях и образующие правильные пакеты по 8-16 клеток и более. Сапрофиты, встречаются в воздухе, почве, кишечнике животных и человека. Например, *Sarcina ureae*

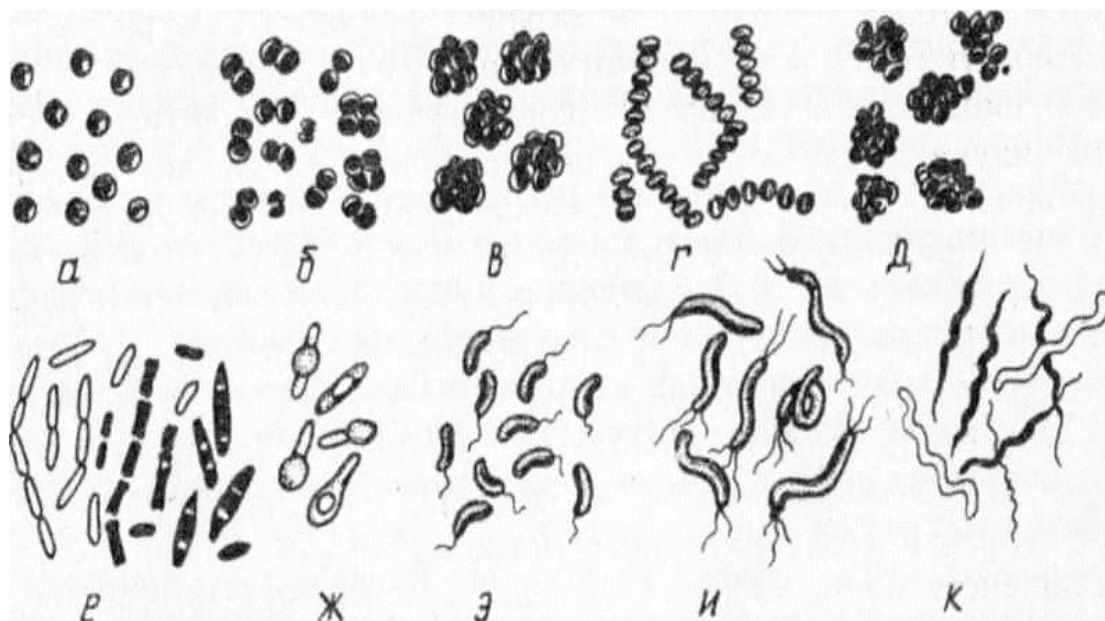


Рис. 1. Основные формы бактерий

а - микрококки; б - диплококки и тетракокки; в - сарцины; г - стрептококки; д - стафилококки; е, ж - палочковидные бактерии; з - вибрионы; и - спириллы; к - спирохеты

Палочковидные бактерии. Это самая многочисленная группа прокариот. Они имеют осевую симметрию и цилиндрическую форму тела с округлыми или заостренными концами. Палочковидные формы делят на две группы: неспоровые палочки - *бактерии* (*Bacterium*) палочки, образующие споры, - *бациллы* (*Bacillus*). Палочки, у которых диаметр споры превышает ширину вегетативной клетки, принято называть *кlostридиями* (*Clostridium*).

В зависимости от взаимного расположения клеток палочковидные бактерии подразделяют на *одиночные* и *бессистемные скопления*, *диплобактерии* и *диплобациллы* (располагающиеся попарно), а также *стрептобактерии* и *стрептобациллы* (формы, образующие длинные или короткие цепочки). Сапрофиты и патогенные виды. Например, *Bacillus anthracis*, *Clostridium tetani*.

К палочковидным формам также относят *коринебактерии* и *фузобактерии*.

Коринебактерии (греч. *koryne* - булава) - прямые или изогнутые палочки с булавовидными утолщениями на концах. Сапрофиты, патогенны для животных и человека. Например, *Corynebacterium pseudotuberculosis* и др.

Фузобактерии - длинные, толстые, с заостренными концами палочки. Имеются патогенные виды - возбудитель некробактериоза (*Fusobacterium necrophorum*).

Извитые бактерии. Обладают спиральной симметрией. К ним относятся вибрионы, спириллы и спирохеты.

Вибрионы (лат. *vibrio* - извиваюсь). Клетки вибрионов имеют цилиндрическую изогнутую форму, образуя $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{2}$ завитка спирали, и напоминают запятую. Сапрофиты и патогенные. Например, *Vibrio cholerae*.

Спириллы (лат. *spira* - изгиб) - бактерии, имеющие форму спирально извитых палочек с 4-6 витками. Обитают в пресной и морской воде. Преимущественно сапрофиты (*Spirillum volutans*); к патогенным видам относятся *S. minus* и кампилобактеры (*Campylobacter fetus*).

Спирохеты (*spirochaeta*; греч. *speira* - изгиб и *chaite* - длинные волосы) - прокариоты спирально извитой формы. У спирохет выявляется два типа витков: первичные - образованные изгибами протоплазматического цилиндра, и вторичные - представляющие изгибы всего тела. Спирохеты - эластичные спиралевидные длинные клетки, состоящие из осевой нити (аксистиля), цитоплазмы с рибосомами и включениями, нуклеоида, мезосом, цитоплазматической мембраны и клеточной стенки. Тонкая эластичная клеточная стенка состоит из наружной липопротеидной мембраны и несплошного слоя паптидогликана. Осевая нить растянута на всю длину клетки, выполняет локомоторную и опорную функции, содержит пучок из 2-150 аксиальных (опорных) фибрилл, состоящих из аминсахара кутина. Количество и величина фибрилл у разных видов неодинаковы. Протоплазматический цилиндр упакован спиралевидно и окружен аксиальными фибриллами, прикрепляющимися к дискам на его концах. Фибриллы заключены в перипласте (между цитоплазматической мембраной и клеточной стенкой). Движение спирохет осуществляется за счет активного сокращения осевой нити и протоплазматического цилиндра; формы движения разнообразны: вращательное, поступательное, сгибательное.

Размножаются поперечным делением. В неблагоприятных условиях спирохеты могут переходить в цисту - укороченную и свернутую в спираль, окруженную прочной оболочкой клетки.

По морфологии (размерам, числу и форме завитков), количеству осевых фибрилл, характеру движения, типу биологического окисления, экологии, патогенности в пределах группы спирохет дифференцируют: спирохеты, кристиспиры, трепонемы, боррелии и лептоспиры.

Спирохеты и кристиспиры обитают в открытых водоемах, иле, сточных водах; для позвоночных непатогенны. *Кристиспиры* - гигантские прокариоты (28-150 мкм) спирально изогнутой формы с плоской зернистой килевидной мембраной (креста), идущей вдоль тела клетки. Число фибрилл более 100.

Трепонемы - спиралевидно извитые эластичные бактерии, размер 0,1-0,5 × 5-20 мкм; осевая нить состоит из 1 или 4 фибрилл; хорошо выражены

равномерные или неравномерные завитки; подвижны. Типовой вид - *Treponema pallidum*.

Боррелии - извитые нитевидные бактерии, размер 0,2-0,5 x 5-30 мкм; осевая нить состоит из 15-20 параллельных фибрилл.

Лептоспиры - спиралевидные бактерии диаметром 0,1-0,25 мкм и длиной 6-30 мкм, формирующие около 20 мелких, тесно расположенных первичных завитков и 1-2 вторичных, придающих клетке форму, букв Г, S, С. Осевая нить состоит из 2 фибрилл. Главный тип движения - вращательно-поступательный. Например, *Leptospira interrogans*.

Бактерии не видимы невооруженным глазом. Поэтому для их изучения используют световые и электронные микроскопы. Клетки бактерий измеряются в микрометрах ($1 \text{ мкм} = 10^{-6} \text{ м}$), элементы тонкого строения - в нанометрах ($1 \text{ нм} = 10^{-9} \text{ м}$). Предел разрешения светового микроскопа составляет 0,2 мкм, современных моделей электронных микроскопов - 0,15-0,3 нм. Средние размеры прокариот лежат в пределах 0,5-3 мкм. Наиболее стабильны кокки - их размер 0,5-2 мкм. Палочковидные формы обычно длиной 2-10 и шириной 0,5-1 мкм, мелкие палочки соответственно 0,7-1,5 и 0,2-0,4 мкм.

В 1967 г. Адлер описал мини-клетки. Они примерно в 10 раз меньше исходных бактерий, не содержат хромосомную ДНК и имеют только плазмидную. Среди бактерий могут быть гиганты, достигающие в длину 125 мкм и более. Размеры спирохет 0,2-0,75 x 5-500 мкм.

Строение бактериальной клетки

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

Структурные компоненты бактериальной клетки делят на основные и временные (рис. 2). Основными структурами являются: клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана с ее производными, цитоплазма с рибосомами и различными включениями, нуклеоид; временные - капсула, слизистый чехол, жгутики, ворсинки, эндоспоры, образующиеся лишь на определенных этапах жизненного цикла бактерий, у некоторых видов они отсутствуют полностью.

У прокариотической клетки структуры, расположенные снаружи от цитоплазматической мембраны, называют поверхностными (клеточная стенка, капсула, жгутики, ворсинки). Термин «оболочка» в настоящее время используется для обозначения клеточной стенки и капсулы бактерий или только клеточной стенки, цитоплазматическая мембрана не входит в состав оболочки и относится к протопласту.

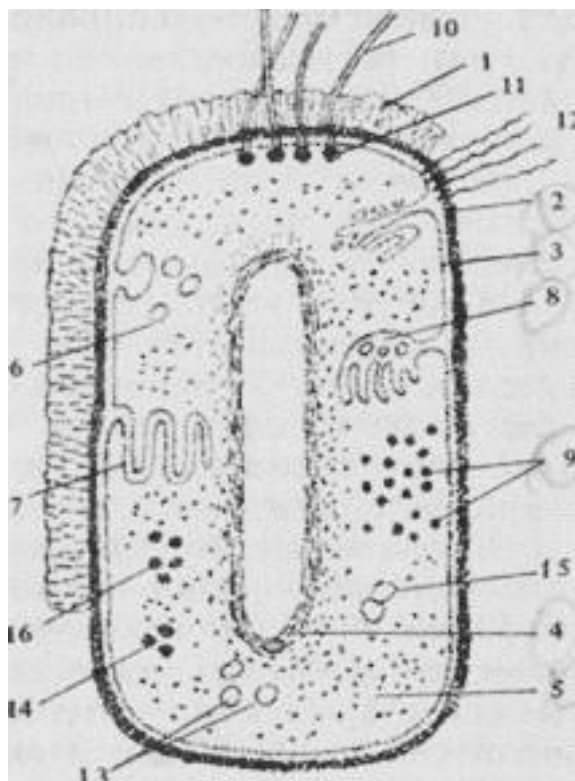


Рис. 2. Схема строения прокариотической клетки:

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

Клеточная стенка - важный структурный элемент бактериальной клетки, располагающийся между цитоплазматической мембраной и капсулой; у бескапсульных бактерий - это внешняя оболочка клетки. Она обязательна для всех прокариот, за исключением микоплазм и L-форм бактерий. Выполняет ряд функций: защищает бактерии от осмотического шока и других повреждающих факторов, определяет их форму, участвует в метаболизме; у многих видов патогенных бактерий токсична, содержит поверхностные антигены, а также несет на поверхности специфические рецепторы для фагов. В клеточной стенке бактерий имеются поры, которые участвуют в транспорте экзотоксинов и других экзобелков бактерий. Толщина клеточной стенки 10-100 нм, и на ее долю приходится от 5 до 50 % сухих веществ клетки.

Основным компонентом клеточной стенки бактерий является *пептидогликан*, или *муреин* (лат. *muris* - стенка), - опорный полимер, имеющий сетчатую структуру и образующий ригидный (жесткий) наружный каркас бактериальной клетки. Пептидогликан имеет основную цепь (остов), состоящую из чередующихся остатков N-ацетил-N-глюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, соединенных β -1,4-гликозидными связями, идентичные тетрапептидные боковые цепочки, прикрепляющиеся к молекулам N-ацетилмурамовой кислоты, и короткие поперечные пептидные мостики, связывающие полисахаридные цепи. Два типа связей (гликозидные и пептидные), которые соединяют субъединицы пептидогликана, придают этому гетерополимеру структуру молекулярной сети. Остов пептидогликанового слоя у всех видов бактерий одинаков; тетрапептидные

белковые цепочки и пептидные (поперечные) у неодинаковых видов различны.

По тинкториальным свойствам все бактерии подразделяются на две группы: *грамположительные* и *грамотрицательные*. В 1884 г. Х. Грам предложил метод окраски, который был использован для дифференцирования бактерий. Сущность метода состоит в том, что грамположительные бактерии прочно фиксируют комплекс генцианвиолета и йода, не подвергаются обесцвечиванию этанолом и поэтому не воспринимают дополнительный краситель фуксин, оставаясь окрашенными в фиолетовый цвет. У грамотрицательных бактерий этот комплекс легко вымывается из клетки этанолом, и они при дополнительном нанесении фуксина окрашиваются в красный цвет. У некоторых бактерий положительная окраска по Граму наблюдается только в стадии активного роста. Способность прокариот окрашиваться по методу Грама или обесцвечиваться этанолом определяется спецификой химического состава и ультраструктуры их клеточной стенки. Пептидогликан у грамположительных бактерий - основной компонент клеточной стенки и составляет от 50 до 90 %, у грамотрицательных - 1-10 %. Структурные микрофибриллы пептидогликана грамотрицательных бактерий сшиты менее компактно, поэтому поры в их пептидогликановом слое значительно шире, чем в молекулярном каркасе грамположительных бактерий. При такой структурной организации пептидогликана фиолетовый комплекс генцианвиолета и йода у грамотрицательных бактерий будет вымываться быстрее.

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

Клеточная стенка грамотрицательных бактерий многослойна, толщина ее 14-17 нм. Внутренний слой - пептидогликан, который образует тонкую (2 нм) непрерывную сетку, окружающую клетку. Пептидогликан содержит только мезодиаминопи-мелиновую кислоту и не имеет лизина. Внешний слой клеточной стенки - наружная мембрана - состоит из фосфолипидов, липополисахарида, липопротеина и белков. В наружной мембране содержатся белки основы (матричные), они прочно связаны с пептидогликановым слоем. Одной из их функций является формирование в мембране гидрофильных пор, через которые осуществляется диффузия молекул с массой до 600, иногда 900. Матричные белки, кроме того, выполняют еще роль рецепторов для некоторых фагов. Липополисахарид (ЛПС) клеточных стенок грамотрицательных бактерий состоит из липида А и полисахарида. Токсичный для животных ЛПС получил название

эндотоксина. Тейхоевые кислоты у грамотрицательных бактерий не обнаружены.

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

Протопласты и сферопласты. *Протопласты* - формы прокариот, полностью лишенные клеточной стенки, образующиеся обычно у грамположительных бактерий.

Сферопласты - бактерии с частично разрушенной клеточной стенкой. У них сохраняются элементы наружной мембраны. Наблюдаются у грамотрицательных бактерий и значительно реже у грамположительных. Образуются в результате разрушения пептидогликанового слоя литическими ферментами, например лизоцимом, или блокирования биосинтеза пептидогликана антибиотиком пенициллином и др. в среде с соответствующим осмотическим давлением.

Протопласты и сферопласты имеют сферическую или полусферическую форму и в 3-10 раз крупнее исходных клеток. В обычных условиях наступает осмотический лизис и они погибают. В условиях повышенного осмотического давления способны некоторое время переживать, расти и даже делиться. При снятии фактора, разрушающего пептидогликан, протопласты, как правило, отмирают, но могут превращаться в L-формы; сферопласты легко реверсируют в исходные бактерии, иногда трансформируются в L-формы или же гибнут.

L-Формы бактерий. Это фенотипические модификации, или мутанты, бактерий, частично или полностью утратившие способность синтезировать пептидогликан клеточной стенки. Таким образом, L-формы - бактерии, дефектные по клеточной стенке. Свое название они получили в связи с тем, что были выделены и описаны в институте Листера в Англии в 1935 г. Образуются при воздействии L-трансформирующих агентов - антибиотиков (пенициллина, полимиксина, бацитрацина, венкомицина, стрептомицина), аминокислот (глицина, метионина, лейцина и др.), фермента лизоцима, ультрафиолетовых и рентгеновых лучей. В отличие от протопластов и сферопластов L-формы обладают относительно высокой жизнеспособностью и выраженной способностью к репродукции. По морфологическим и культуральным свойствам они резко отличаются от исходных бактерий, что обусловлено утратой клеточной стенки и изменением метаболической активности.

L-Формы бактерий полиморфны. Встречаются элементарные тельца размером 0,2-1 мкм (минимальные репродуцирующие элементы), шары - 1-5, большие тела - 5-50, нити - до 4 мкм и более. Клетки L-форм имеют хорошо развитую систему внутрицитоплазматических мембран и миелиноподобные структуры. Вследствие дефекта клеточной стенки L-формы осмотически неустойчивы и их можно культивировать только на специальных средах с

высоким осмотическим давлением; они проходят через бактериальные фильтры.

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

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

L-Формам придается большое значение в развитии хронических рецидивирующих инфекций, носительстве возбудителей, длительной персистенции их в организме. Доказана трансплацентарная инвазивность элементарных телец L-форм бактерий.

Инфекционный процесс, вызванный L-формами бактерий, характеризуется атипичностью, длительностью течения, тяжестью заболевания, трудно поддается химиотерапии.

Капсула - слизистый слой, расположенный над клеточной стенкой бактерии. Вещество капсулы четко отграничено от окружающей среды. В зависимости от толщины слоя и прочности соединения с бактериальной клеткой различают *макрокапсулу*, толщиной более 0,2 мкм, хорошо различимую в световом микроскопе, и *микрокапсулу*, толщиной менее 0,2 мкм, обнаруживаемую лишь при помощи электронного микроскопа или выявляемую химическими и иммунологическими методами. Макрокапсулу (истинную капсулу) образуют *B. anthracis*, *C1. perfringens*, микрокапсулу - *Escherichia coli*. Капсула не является обязательной структурой бактериальной клетки: потеря ее не приводит к гибели бактерии. Известны бескапсульные мутанты бактерий, например, сибиреязвенный вакцинный штамм СТИ-1.

Вещество капсул состоит из высокогидрофильных мицелл, химический же состав их весьма разнообразен. Основные компоненты большинства капсул прокариот - гомо- или гетерополисахариды (энтеробактерии и др.). У некоторых видов бацилл капсулы построены из полипептида. Так, в состав капсулы *B. anthracis* входит полипептид Д-глутаминовой кислоты (правовращающий изомер). В состав микрокапсулы микобактерий туберкулеза млекопитающих входят гликопептиды, представленные сложным эфиром трегалозы и миколовой кислоты (корд-фактор).

Синтез капсулы - сложный процесс и у различных прокариот имеет свои особенности; считают, что биополимеры капсулы синтезируются на наружной поверхности цитоплазматической мембраны и выделяются на поверхность клеточной стенки в определенных специфических ее участках.

Существуют бактерии, синтезирующие слизь, которая откладывается на поверхности клеточной стенки в виде бесструктурного слоя

полисахаридной природы. Слизистое вещество, окружающее клетку, по толщине часто превосходит диаметр последней. У сапрофитной бактерии лейконостока наблюдается образование одной капсулы для многих особей. Такие скопления бактерий, заключенных в общую капсулу, называются *зооглеями*.

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

В ветеринарной микробиологии выявление капсулы используют в качестве дифференциального морфологического признака возбудителя при исследовании на сибирскую язву. Для окрашивания капсул применяют специальные методы - Романовского - Гимзы, Гинса - Бурри, Ольта, Михина и др.

Микрокапсулу и слизистый слой определяют серологическими реакциями (РА), антигенные компоненты капсулы идентифицируют при помощи иммунофлюоресцентного метода (РИФ) и РДД.

Жгутики - органоиды движения бактерий, представленные тонкими, длинными, нитевидными структурами белковой природы. Их длина превышает бактериальную клетку в несколько раз и составляет 10-20 мкм, а у некоторых спирилл достигает 80-90 мкм. Нить жгутика (фибрилла) - полный спиральный цилиндр диаметром 12-20 нм. У вибрионов и протей нить окружена футляром толщиной 35 нм.

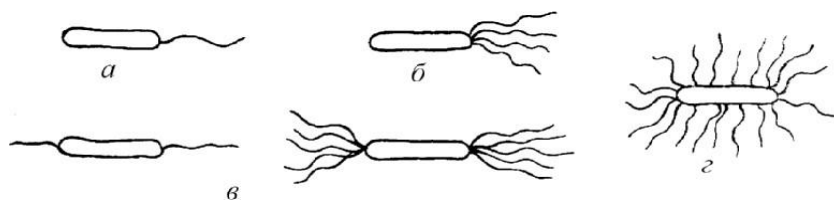


Рис. 3. Жгутики:

а - монотрихи; *б* - амфитрихи; *в* - лэфотрихи; *г* - перитрихи

Жгутик состоит из трех частей: спиральной нити, крюка и базального тельца. *Крюк* - изогнутый белковый цилиндр, выполняющий функцию гибкого связывающего звена между базальным тельцем и жесткой нитью жгутика. *Базальное тельце* - сложная структура, состоящая из центрального стержня (оси) и колец.

Жгутики не являются жизненно важными структурами бактериальной клетки: существуют фазовые вариации бактерий, когда в одной фазе развития клетки они имеются, у другой - отсутствуют. Так, у возбудителя столбняка в старых культурах преобладают клетки без жгутиков.

Количество жгутиков (от 1 до 50 и более) и места их локализации у бактерий разных видов неодинаковы, но стабильны для одного вида. В зависимости от этого выделяют следующие группы жгутиковых бактерий: *монотрихи* - бактерии с одним полярно расположенным жгутиком; *амфитрихи* - бактерии с двумя полярно расположенными жгутиками или имеющие по пучку жгутиков на обоих концах; *лофотрихи* - бактерии, имеющие пучок жгутиков на одном конце клетки; *перитрихи* - бактерии с множеством жгутиков, расположенных по бокам клетки или на всей ее поверхности (рис. 3). Бактерии, не имеющие жгутиков, называют атрихиями.

Будучи органами движения, жгутики типичны для плавающих палочковидных и извитых форм бактерий и лишь в единичных случаях встречаются у кокков. Они обеспечивают эффективное движение в жидкой среде и более медленное перемещение по поверхности твердых субстратов. Скорость движения монотрихов и лофотрихов достигает 50 мкм/с, амфитрихи и перитрихи движутся медленнее и обычно за 1 с проходят расстояние, равное размерам их клетки.

Бактерии передвигаются беспорядочно, однако они способны к направленным формам движения - таксисам, которые определяются внешними стимулами. Реагируя на различные факторы окружающей среды, бактерии за короткое время локализуются в оптимальной зоне обитания. Таксис может быть положительным и отрицательным. Принято различать: хемотаксис, аэротаксис, фототаксис, магнототаксис. *Хемотаксис* вызывается разницей в концентрации химических веществ в среде, *аэротаксис* - кислорода, *фототаксис* - интенсивностью освещения, *магнототаксис* определяется способностью микроорганизмов ориентироваться в магнитном поле.

Выявление подвижных жгутиковых форм бактерий имеет значение для их идентификации при лабораторной диагностике инфекционных болезней.

Пили (фимбрии, ворсинки) - прямые, тонкие, полые белковые цилиндры толщиной 3-25 нм и длиной до 12 мкм, отходящие от поверхности бактериальной клетки. Образованы специфическим белком - пил ином, берут начало от цитоплазматической мембраны, встречаются у подвижных и неподвижных форм бактерий и видимы только в электронном микроскопе (рис. 4). На поверхности клетки может быть от 1-2, 50-400 и более пилей до нескольких тысяч.

Существует два класса пилей: половые (секс-пили) и пили общего типа, которые чаще называют фимбриями. У одной и той же бактерии могут быть пили разной природы. *Половые пили* возникают на поверхности бактерий в процессе конъюгации и выполняют функцию органелл, через которые происходит передача генетического материала (ДНК) от донора к реципиенту.

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

Цитоплазматическая мембрана и ее производные.
Цитоплазматическая мембрана (плазмолемма) - полупроницаемая липопротеидная структура бактериальных клеток, отделяющая цитоплазму от клеточной стенки. Она является обязательным полифункциональным компонентом клетки и составляет 8-15 % ее сухой массы. Разрушение цитоплазматической мембраны приводит к гибели бактериальной клетки. На ультратонких срезах в электронном микроскопе выявляется ее трехслойное строение - два ограничивающих осмиофильных слоя, толщиной 2-3 нм каждый, и один осмиофобный центральный слой толщиной 4-5 нм. Цитоплазматическая мембрана в химическом отношении - белково-липидный комплекс, состоящий из 50-75 % белков и 15-50 % липидов. Основная часть мембранных липидов (70-90 %) представлена фосфолипидами. Она построена из двух мономолекулярных белковых слоев, между которыми расположен липидный слой, состоящий из двух рядов правильно ориентированных молекул липидов.

Цитоплазматическая мембрана служит осмотическим барьером клетки, контролирует поступление питательных веществ в клетку и выход продуктов метаболизма наружу, в ней содержатся субстратспецифические ферменты - пермеазы, осуществляющие активный избирательный перенос органических и неорганических молекул.

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

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

Установлена связь мезосом с хромосомой бактерии, такие структуры называются *нуклеоидосомами*. Интегрированные с нуклеоидом мезосомы принимают участие в кариокинезе и цитокинезе микробных клеток, обеспечивая распределение генома после окончания репликации ДНК и последующее расхождение дочерних хромосом. Мезосомы, как и цитоплазматическая мембрана, являются центрами дыхательной активности бактерий, поэтому их иногда называют аналогами митохондрий. Однако значение мезосом окончательно еще не выяснено. Они увеличивают рабочую

поверхность мембран, возможно, выполняют только структурную функцию, производя разделение бактериальной клетки на относительно обособленные отсеки, что создает более благоприятные условия для протекания ферментативных процессов. У патогенных бактерий обеспечивают транспорт белковых молекул экзотоксинов.

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

Рибосомы - органоиды, осуществляющие биосинтез белка. Состоят из белка и РНК, соединенных в комплекс водородными и гидрофобными связями. Бактериальные рибосомы - гранулы диаметром 15-20 нм, имеют константу седиментации 70S и образованы из двух рибонуклеопротеидных субъединиц: 30S и 50S. Одна бактериальная клетка может содержать от 5000-50 000 рибосом, посредством иРНК они объединяются в полисомы-агрегаты, состоящие из 50-55 рибосом, обладающих высокой белоксинтезирующей активностью.

В цитоплазме бактерий выявляются различного типа *включения*. Они могут быть твердыми, жидкими и газообразными, с белковой мембраной или без нее и присутствовать непостоянно. Значительная часть их представляет собой запасные питательные вещества и продукты клеточного метаболизма. К запасным питательным веществам относятся: полисахариды, липиды, полифосфаты, отложения серы и др. Из включений полисахаридной природы чаще обнаруживаются гликоген и крахмалоподобное вещество гранулеза, которые служат источником углерода и энергетическим материалом. Липиды накапливаются в клетках в виде гранул и капелек жира, к ним относятся окруженные мембраной гранулы поли- β -оксимасляной кислоты, резко преломляющие свет и хорошо различимые в световом микроскопе. Выявляются и бациллы антракса и аэробных спорообразующих сапрофитных бактерий. Микобактерии в качестве запасных веществ накапливают воски. В клетках некоторых коринебактерии, спирилл и других содержатся гранулы волютина, образованные полифосфатами. Они характеризуются метакромазией: толуидиновый синий и метиленовый синий окрашивают их в фиолетово-красный цвет. Волютиновые гранулы играют роль фосфатных депо.

К включениям, окруженным мембраной, также относятся *газовые вакуоли*, или *аэросомы*, они снижают удельную массу клеток, встречаются у водных прокариот.

Нуклеоид - ядро у прокариот. Он состоит из одной замкнутой в кольцо двухспиральной нити ДНК длиной 1,1 -1,6 мкм, которую рассматривают как одиночную бактериальную хромосому, или *генофор*.

Нуклеоид у прокариот не ограничен от остальной части клетки мембраной - у него отсутствует ядерная оболочка.

В состав структур нуклеоида входят РНК-полимераза, основные белки и отсутствуют гистоны; хромосома закрепляется на цитоплазматической мембране, а у грамположительных бактерий - на мезосоме. Бактериальная хромосома реплицируется поликонсервативным способом: родительская двойная спираль ДНК раскручивается и на матрице каждой полинуклеотидной цепи собирается новая комплементарная цепочка. Нуклеоид не имеет митотического аппарата, и расхождение дочерних ядер обеспечивается ростом цитоплазматической мембраны.

Бактериальное ядро - дифференцированная структура. В зависимости от стадии развития клетки нуклеоид может быть Дискретным (прерывистым) и состоять из отдельных фрагментов. Это связано с тем, что деление бактериальной клетки во времени осуществляется после завершения цикла репликации молекулы ДНК и оформления дочерних хромосом.

В нуклеоиде сосредоточен основной объем генетической информации бактериальной клетки.

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

Споры и спорообразование

Споры (эндоспоры) бактерий - особый тип покоящихся репродуктивных клеток, характеризующихся резко сниженным уровнем метаболизма и высокой резистентностью.

Бактериальная спора формируется внутри материнской клетки и называется *эндоспорой*. Способностью к образованию спор обладают преимущественно палочковидные грамположительные бактерии родов *Bacillus* и *Clostridium*, из шаровидных бактерий лишь единичные виды, например, *Sporosarcina ureae*. Как правило, внутри бактериальной клетки образуется только одна спора.

Основная функция спор - сохранение бактерий в неблагоприятных условиях внешней среды. Переход бактерий к спорообразованию наблюдается при истощении питательного субстрата, недостатке углерода, азота, фосфора, накоплении в среде катионов калия и марганца, изменении рН, повышении содержания кислорода и т. д.

От вегетативных клеток споры отличаются репрессией генома, почти полным отсутствием обмена веществ (анабиозом), малым количеством свободной воды в цитоплазме, повышением в ней концентрации катионов кальция и появлением дипиколиновой (пиридин-2,6-дикарбоновой) кислоты в виде Са-хелата, с которыми связывают пребывание спор в состоянии покоя и их термоустойчивость.

В световом микроскопе споры имеют вид овальных, иногда округлых, сильно преломляющих свет образований размером 0,8- 1,0 x 1,2-1,5 мкм; они могут располагаться *центрально* (*B. anthracis*), *субтерминально* - ближе к концу (*Cl. botulinum*), *терминально* - на конце палочек (*Cl. tetani*). Строение

зрелой споры сложное и однотипное у разных видов бактерий. Центральная ее часть представлена *седцевинной*, или *спороплазмой*, в состав которой входят нуклеиновые кислоты, белки и дипиколиновая кислота. Она содержит нуклеоид, рибосомы и нечетко выраженные мембранные структуры. Спороплазма окружена *цитоплазматической мембраной*, к ней прилегает зачаточный *пептидогликановый* слой, затем располагается специфический для спор массивный слой *кортекса*, или *коры*. На поверхности кортекса имеется внешняя мембрана. Снаружи спора одета *многослойной оболочкой*. У многих бактерий по окружности наружного слоя споровой оболочки располагается *экзоспориум*.

Спорообразование (споруляция) - один из сложнейших процессов дифференцировки бактериальной клетки, который контролируется комплексом специальных генов - спорулоном. У многих бацилл во время образования спор синтезируются полипептидные антибиотики, подавляющие рост вегетативных клеток.

Процесс образования спор проходит ряд последовательных стадий:

- *подготовительная*. Изменяется метаболизм, завершается репликация ДНК, и происходит ее конденсация. Клетка содержит два или более нуклеоида, один из них локализуется в спорогенной зоне, остальные - в цитоплазме спорангия. Одновременно синтезируется дипиколиновая кислота;

- *стадия предспоры*. Со стороны цитоплазматической мембраны вегетативной клетки происходит врастание двойной мембраны, или септы, отделяющей нуклеоид с участком уплотненной цитоплазмы (спорогенная зона). В результате чего образуется проспора, окруженная двумя мембранами;

- *образование оболочек*. Вначале между мембранами проспоры образуется зачаточный пептидогликановый слой, затем над ним откладывается толстый пептидогликановый слой кортекса и вокруг его наружной мембраны формируется споровая оболочка;

- *созревание споры*. Заканчивается образование всех структур споры, она становится термоустойчивой, приобретает характерную форму и занимает определенное положение в клетке.

При попадании в благоприятные условия споры прорастают в вегетативные клетки. Этот процесс начинается с поглощения воды и гидратации структур споры. Одновременно активизируются ферменты и резко возрастает энергия дыхания. Литические ферменты разрушают покровы споры и пептидогликан кортекса, выделяются наружу дипиколиновая кислота и соли кальция. На месте разрыва оболочки споры возникает ростовая трубка и формируется вегетативная клетка. Прорастание спор длится около 4-5 ч.

Споры бактерий устойчивы к действию высоких температур, химических соединений, в том числе органических растворителей и поверхностно-активных веществ; могут длительное время (десятки, сотни лет) существовать в покоящемся состоянии.

Некоторые виды бактерий одновременно со спорами образуют параспоровые тельца, которые не являются элементами или компонентами бактериальной клетки, описаны у *B.anthraxis*, *B.cereus* и др. У *B.anthraxis* это правильной формы сферические образования диаметром 120-200 нм, расположенные изолированно или же на поверхности спор. В клетках *B. thuringiensis* параспоровые тельца формируются в виде крупных белковых кристаллов. Они токсичны и используются для приготовления препарата, применяемого в борьбе с вредными насекомыми.

Морфологические особенности других групп прокариот

Актиномицеты (лучистые грибы; *actis* - луч, *mykes* - гриб) - одноклеточные грамположительные бактерии, внешне сходные с мицелиарными грибами. Их тело (мицелий) состоит из тонких (0,05-2,0 мкм) и длинных гиф (нитей), способных к истинному ветвлению; гифы могут быть прямыми или спиралевидными и имеют единую с основной нитью оболочку и протопласт. На плотных средах актиномицеты образуют субстратный, растущий в среду, и воздушный мицелий. Кроме мицелиарных встречаются палочковидные и кокковидные формы. Строение актиномицетов аналогично грамположительным бактериям, клеточная стенка содержит пептидогликан и не имеет, как у грибов, хитина и целлюлозы. Размножаются при помощи спор (конидий); из отдельных ветвей зрелых гиф воздушного мицелия образуются спороносцы, которые в результате фрагментации или сегментации превращаются в споры. В благоприятных условиях они прорастают в вегетативные клетки.

Для актиномицетов характерен гетеротрофный тип питания и аэробный (окислительный) тип получения энергии, встречаются также и анаэробы. Отдельные виды синтезируют пигменты: розовый, желтый, синий и др. Обитают преимущественно в почве, обнаруживаются в воде, на растениях, коже и слизистых оболочках животных, разлагают органические субстраты, в том числе недоступные для других микроорганизмов. Играть важную роль в круговороте веществ и энергии, образовании почвы и ее плодородии. Многие актиномицеты служат продуцентами антибиотиков, витаминов, аминокислот, ферментов. Большинство сапрофиты, но есть и патогенные. К ним относится *Actinomyces bovis* - возбудитель актиномикоза крупного рогатого скота.

Риккетсии и хламидии

Риккетсии - облигатные внутриклеточные паразиты эукариот; плеоморфные грамотрицательные бактерии, имеющие форму коротких палочек с закругленными концами и кокков размером 0,2-0,6* 0,4-2 мкм, иногда нитей длиной 40 мкм и более. Клеточная стенка содержит пептидогликан, цитоплазматическая мембрана характеризуется высокой проницаемостью. Имеют рибосомы, нуклеоид, размножаются в цитоплазме,

реже в ядре пораженных клеток хозяина поперечным делением, нитевидные формы - дроблением.

Хламидии - облигатные внутриклеточные паразиты млекопитающих и птиц со сложным циклом развития. Это - грамотрицательные бактерии, имеющие форму кокков. В процессе развития проходят две стадии: инфекционного элементарного тельца и репродуктивного инициального (ретикулярного) тельца.

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

Основным липидным компонентом мембраны являются стеринны, в цитоплазме располагаются рибосомы и нуклеоид. Микоплазмы не синтезируют пептидогликан. Обладают выраженным полиморфизмом - от мелких сферических, эллипсоидных, кольцевидных клеток до нитевидных, ветвящихся мицелиальных форм размером 0,6-30 мкм. В культурах на жидких питательных средах обнаруживаются шаровидные образования размером 75-250 нм, их называют элементарными телами, они являются минимальными репродуцирующими единицами. Все микоплазмы грамотрицательны.

Морфология грибов

Грибы (*Fungi*) - бесхлорофилльные низшие эукариотические хемоорганотрофные организмы. Вегетативное тело грибов - грибница, или мицелий, состоит из ветвящихся нитей, называемых гифами. У низших одноклеточных грибов гифы не разделены поперечными перегородками (септами) на отдельные участки, у высших грибов мицелий септирован, они многоклеточные организмы. Гифы могут располагаться на поверхности субстрата, где обитает грибок, или проникать внутрь его.

Толщина гиф составляет 5-50 мкм и более. Клеточная стенка грибов толстая, прочная, содержит целлюлозу и хитин; цитоплазматическая мембрана может иметь стероиды. В цитоплазме располагаются одно или несколько истинных ядер с двойной мембраной, ядрышком и хромосомами, митохондрии, полисомы, лизосомы, вакуоли, включения волютина, гликогена. В клетках грибов отсутствует крахмал, одним из продуктов метаболизма является мочевины, у прокариот она не встречается.

У грибов различают три типа размножения: вегетативное, бесполое и половое. При вегетативном размножении происходит отделение от мицелия его частей, которые, развиваясь, образуют новую грибницу. Кроме того, мицелий может фрагментироваться на артрспоры (оидии) и хламидоспоры. **Артрспоры** - короткие овальные клетки, образующиеся при распаде гиф, каждая из которых дает начало новой клетке. **Хламидоспоры** - споры вегетативного размножения грибов, покрытые толстой темноокрашенной оболочкой; образуются при распаде гиф на отдельные клетки. Этот тип размножения также может осуществляться путем почкования мицелия или

отдельных клеток, например, у дрожжевых грибов. Наиболее распространено бесполое размножение при помощи спор.

Различают *эндоспоры* (спорангиоспоры, зооспоры) и *экзоспоры* (конидии). Спорангиоспоры развиваются внутри особых клеток - спорангий. Гифы, несущие спорангии, называются спорангиеносцами. Зооспоры - подвижные спорангиоспоры низших грибов, имеющие жгутики. Конидии - споры бесполого размножения многих грибов, образующиеся экзогенно на концах вертикальных ответвлений мицелия - конидиеносцах.

Спорангиоспоры и конидии бывают различной формы и окраски, благодаря чему грибы в стадии спороношения имеют вид окрашенных налетов.

Созревшие конидии осыпаются; при созревании спорангиоспор спорангии лопаются и споры из них высыпаются. Попав в благоприятные условия, споры прорастают в гифы.

При половом размножении грибов спорообразованию предшествует слияние гаплоидных мужских и женских гамет, в результате чего возникает зигота и наступает диплоидная фаза с полным (парным) набором хромосом. Половой процесс у разных групп грибов протекает различно и имеет свои особенности.

Грибы - широко распространенная в природе группа организмов, насчитывающая около 100 тыс. видов. Они обитают в почве, воде, растительных и животных остатках.

В настоящее время истинные грибы разделяют на 6 классов: хитридиомицеты, оомицеты, зигомицеты, аскомицеты, или сумчатые, базидиомицеты, дейтеромицеты, или несовершенные грибы.

Хитридиомицеты мицелия не образуют, или он в зачаточном состоянии. Клеточная оболочка содержит хитин и не имеет целлюлозы. Размножение бесполое и половое. Преимущественно водные организмы, некоторые виды вызывают болезни сельскохозяйственных растений.

Оомицеты - одноклеточные (низшие) мицелиальные грибы, функцию скелетного вещества оболочки выполняют целлюлоза и глюкан; размножение бесполое. Обитают в водоемах, наземные формы - паразиты высших растений.

Зигомицеты - мицелий хорошо развит, многоядерный, несептированный (низшие грибы); оболочка содержит хитин, иногда глюкан. Размножаются спорангиоспорами, реже конидиями или половым путем. Широко распространены в верхнем слое почвы, развиваются на органических остатках растений. Используются в микробиологической промышленности для получения соевого сыра, спирта из картофеля, антибиотика рамицина и др. Типичными представителями этого класса являются грибы рода мукор (головчатая плесень). У мукора (рис. 5) от одноклеточного мицелия отходят бесцветные спорангиеносцы, на верхушке которых развивается по одному спорангию.

При наличии влаги оболочка зрелого спорангия легко растворяется, освобождая несколько тысяч спорангиоспор, которые затем прорастают. У животных и человека могут вызывать мукоромикозы.

Аскомицеты - сумчатые грибы. Класс высших грибов с разветвленным многоклеточным мицелием. Размножение вегетативное, бесполое при помощи конидий и половое (сумчатая стадия). В результате полового процесса возникают аски, или сумки, в которых после слияния ядер половых клеток (гамет) образуются аскоспоры - обычно 8 в одной аске.

Широко распространены в природе, известно около 30 тыс. видов, обитают в почве, органических субстратах, кормах, пищевых продуктах, вызывая их порчу. Паразитируют на растениях, животных, разрушают целлюлозу. Используются как продуценты антибиотиков, алкалоидов, ростовых веществ (гиббереллинов), ферментов. Имеются токсические виды, они способны вызывать микотоксикозы. Аскомицетами также являются некоторые съедобные грибы - сморчок, трюфель.

Базидиомицеты - высшие грибы с многоклеточным мицелием. Имеют специальные органы размножения - базидии, образующиеся на концах гиф в результате полового процесса. Они напоминают сумку (аск) и гомологичны ей. Сапрофиты и факультативные паразиты хлебных злаков (головня, ржавчина). К базидиомицетам относятся также съедобные и ядовитые шляпочные грибы.

Дейтеромицеты, или несовершенные грибы (*Deuteromycetes, Fungi imperfecti*), класс высших грибов

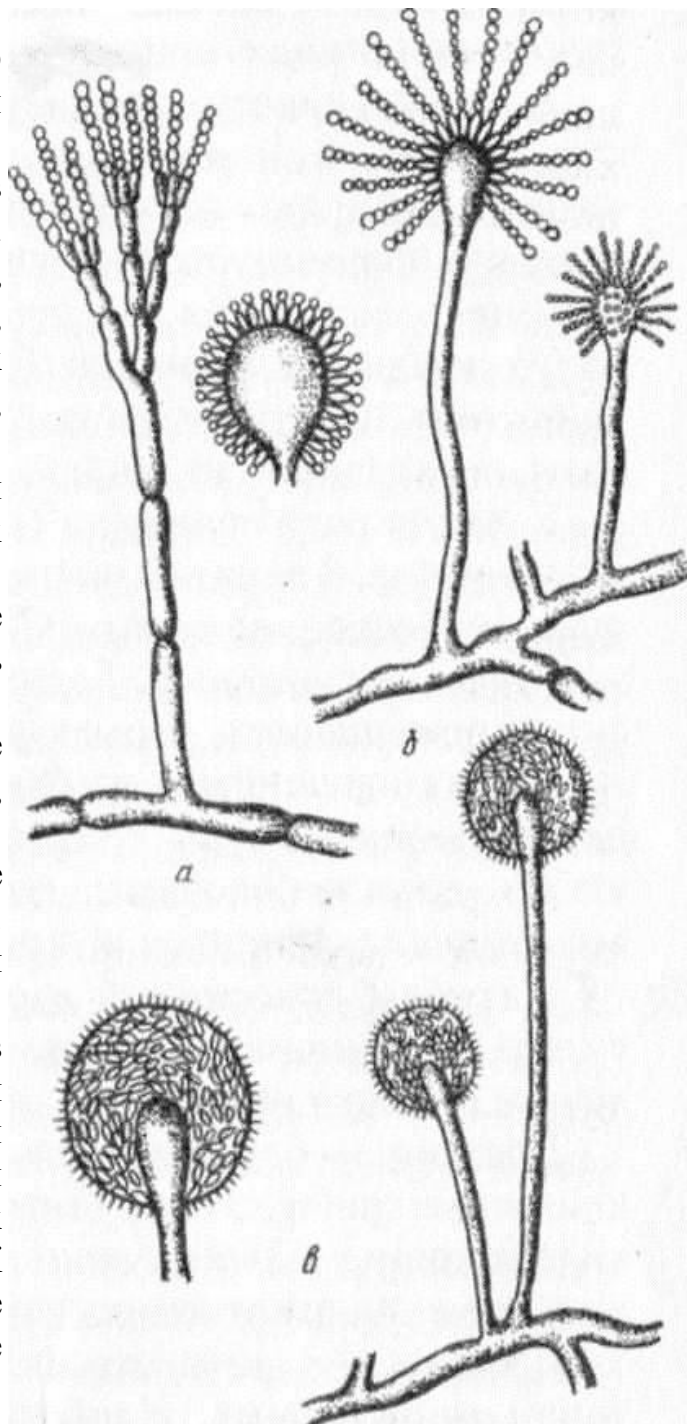


Рис. 4. Морфология плодоношения у грибов: а- пенициллин; б- аспергилл; в- мукоровых

многоклеточным, сильно разветвленным мицелием. Весь жизненный цикл они проходят в гаплоидной фазе. Размножаются вегетативно и бесполовым

путем - конидиями, половые (совершенные) стадии у них не обнаружены. Конидии различаются по форме, окраске и образуются на специализированных ветвях мицелия - конидиеносцах или пикнидах (плотных органах конидиального спороношения).

К этому классу относятся грибы родов аспергилл, пеницилл, стахиботрис, фузариум и др. (см. рис. 4). У аспергилла, или леечной плесени, мицелий септирован, конидиеносцы одноклеточные; на их вершине формируется расширение в виде головки, от которых отходят ответвления - стеригмы - с отшнуровывающимися от них конидиями. Конидии бывают окрашены в различные цвета, чаще черный, располагаются радиально и напоминают струйки воды, выходящей из лейки.

У грибов рода пеницилл (кистевик) мицелий и конидиеносцы многоклеточные. В верхней части конидиеносцы разветвлены в виде кисти руки, их последние сегменты - стеригмы - заканчиваются конидиями. Образуют зеленый, белый и другие пигменты. Обитают в почве, сырых помещениях, кормах, пищевых продуктах.

К несовершенным грибам относятся и дерматофиты - возбудители микроспории, трихофитии и фавуса (парши) животных, а также дрожжеподобные грибы родов *Candida* и *Cryptococcus*, вызывающие кандидоз и криптококкоз.

К грибам относятся и дрожжи - филогенетически гетерогенная группа организмов, часть из которых типичные аскомицеты, другие - базидиомицеты, третьи - дейтеромицеты.

Дрожжи - безмицелиальные, не образующие хлорофилла одноклеточные грибы. Это крупные сферические или палочковидные клетки размером 3-7 мкм, удлиненные формы могут быть 20 мкм и более, их клетки содержат все основные структуры, характерные для грибов.

Дрожжи - гетеротрофы с окислительным или бродильным типом метаболизма. Наиболее распространенным способом вегетативного размножения дрожжей является почкование. Реже дрожжи размножаются делением. При половом размножении после популяции двух клеток и слиянии ядер зигота превращается в аску, диплоидное ядро делится 2-3 раза и образуется 4 или 8 аскоспор, каждая из которых может прорасти в новую клетку.

Дрожжи имеют важное значение в микробиологической промышленности.

В специальной литературе часто встречается термин «плесени» («плесневые грибы»). Это нитчатые, микроскопические грибы разных классов, способные образовывать субстратный и воздушный мицелий, например, мукор, аспергиллы, пенициллы и др.

Систематика бактерий

Проблема происхождения и эволюции микроорганизмов очень сложна. Еще в 1886 г. немецкий биолог Э. Геккел предложил выделить микроорганизмы, у которых отсутствует дифференцировка на органы и

ткани (простейшие, грибы, бактерии), в отдельное царство - *Protista* (протисты, первосущества), включив в него организмы, во многих отношениях занимающие промежуточное положение между растениями и животными.). В дальнейшем с учетом строения клеток протисты были подразделены на две четко разграниченные группы - высшие и низшие. У высших протистов клетки сходны с растительными и животными клетками, это - эукариоты. К ним отнесены микроскопические водоросли (кроме сине-зеленых), микроскопические грибы (плесени и дрожжи). К низшим отнесены протисты, клетки которых по строению существенно отличаются от всех других организмов (бактерии и сине-зеленые водоросли), это - *прокариоты*.

В эукариотных клетках есть вторичные полости. Ядерная мембрана, отграничивающая ДНК от остальной цитоплазмы, формирует вторичную полость. Эукариоты имеют истинное ядро, рибосомы более крупные, геном представлен набором хромосом, которые при митозе удваиваются и распределяются между дочерними клетками.

Прокариоты не имеют окруженного мембраной ядра. Ядерная ДНК в виде замкнутой в кольцо молекулы свободно располагается в цитоплазме. Клеточная стенка (за исключением микоплазм) содержит пептидогликан (муреин), который не встречается у эукариот.

В этой связи было предложено выделить все прокариоты в особое царство - *Procaryotae*. В царство *Eucaryotae* включены все высшие протисты, растения и животные.

Систематика (таксономия) - наука, занимающаяся вопросами классификации, номенклатуры и идентификации микроорганизмов. Задачей классификации является объединение микроорганизмов с общими свойствами в определенные группы (таксоны).

Номенклатура - система наименований, применяемых в определенной области знаний.

Идентификация - отнесение микроорганизмов к определенному таксону (виду) на основании конкретных признаков.

Для того чтобы отнести микроорганизм к той или иной таксономической группе, необходимо определить основные его признаки: морфологию, подвижность, окраску по Граму, наличие капсулы и способность к образованию эндоспор, культурально-биохимические свойства и некоторые другие Признаки. В классификации для группирования родственных организмов используют следующие таксономические категории:

- царство (*regnum*),
- отдел (*divisio*),
- секцию (*section*),
- класс (*classis*),
- порядок (*ordo*),
- семейство (*familia*),
- род (*genus*),
- вид (*species*).

В соответствии с новым кодексом номенклатуры бактерий, введенным с 1 января 1980 г., название микроорганизмам присваивается в соответствии с правилами Международного кодекса номенклатуры бактерий. В микробиологии, как и в биологии, для обозначения видов бактерий принята двойная (бинарная) номенклатура, предложенная еще в XVIII в. К. Линнеем. Первое слово название рода. Обычно это латинское слово, оно пишется с прописной буквы и характеризует какой-либо морфологический или физиологический признак либо фамилию ученого, открывшего этот микроб. Второе слово пишется со строчной буквы. Оно обозначает видовое название микроорганизма и, как правило, представляет собой производное от существительного, дающего описание цвета колонии, источника происхождения микроорганизма, вызываемого им процесса или болезни и некоторых других отличительных признаков. Например, *Escherichia coli* указывает, что микроб открыл Эшерих, *coli* - обитатель кишечника, *Bacillus anthracis* - микроб образует споры, *anthracis* - возбудитель сибирской язвы, *Azotobacter* - микроорганизм, фиксирующий атмосферный азот.

Основной номенклатурной единицей является вид. В. Д. Тимаков (1973) дает следующее определение ему: «Вид - это совокупность микроорганизмов, имеющих единое происхождение и генотип, сходных по морфологическим и биологическим свойствам, обладающих наследственно закрепленной способностью вызывать в среде естественного обитания качественно определенные специфические процессы». Вид подразделяют на подвиды или варианты. При изучении выделенных бактерий часто обнаруживают отклонение от типичных видовых свойств, такую культуру рассматривают как подвид. Имеются также и инфраподвидовые подразделения, которые основаны на отличии особей каким-либо небольшим наследственным признаком: антигенным - серовар, биохимическим - биовар, отношением к фагам - фаговар, патогенностью - патовар и др.

В микробиологии пользуются терминами «штамм» и «клон».

Штамм - культура одного и того же вида, выделенная из разных объектов и отличающаяся незначительными изменениями свойств (например, чувствительностью к антибиотикам, ферментацией углеводов и др.).

Под термином «**культура**» понимают микроорганизмы, выращенные на плотной или жидкой питательной среде в условиях лаборатории.

Клон - это культура, полученная из одной клетки. Культуру микроорганизмов, полученную из особей одного вида, называют чистой культурой. Смешанной культурой называют смесь неоднородных микроорганизмов, выделенных из исследуемого материала (молока, почвы, воды, патматериала).

В микробиологии существует два различных подхода к систематике, обуславливающие два вида классификации. В основе первого лежит идея создания естественной (филогенетической) классификации прокариот, т. е. построения единой системы, объективно отражающей родственные отношения между разными группами и историю их эволюционного развития.

Второй подход к систематике преследует практические цели и служит для идентификации, т. е. установления принадлежности микроорганизма к определенному виду. Это искусственная классификация (традиционная). Современные системы классификации микроорганизмов, по существу, являются искусственными. Этому служат определители, которыми пользуются главным образом при идентификации того или иного микроорганизма. К таким определителям относятся: «Определитель бактерий и актиномицетов» Н. А. Красильникова (1949), «Определитель микробов» Р. А. Циона (1948) и др. К международным определителям бактерий относится «Руководство по систематике бактерий» Д. Х. Берги, девятое издание которого вышло в 1984 г. В этом определителе все прокариотические микроорганизмы объединены в царство *Procaryotae*, которое подразделяется на четыре отдела. Они, в свою очередь, делятся на секции, классы, порядки, семейства, роды, виды.

Отдел I. *Gracilicutes* (*gracilus* - тонкий, стройный, *cutes* - кожа). В отдел внесены грамотрицательные микроорганизмы. В отделе девять секций.

Секция 1. Спирохеты. Эти микроорганизмы объединены в порядок *Spirochaetales*, имеющий два семейства: *Spirochaetaceae* (четыре рода), *Leptospiraceae* (один род).

Секция 2. Спиралевидные и изогнутые аэробы (микроаэрофилы). В секции одно семейство - *Spirillaceae*, в котором шесть родов. Патогенные для человека и животных микроорганизмы имеются в роде *Campylobacter*.

Секция 3. В секцию включены грамотрицательные неподвижные изогнутые бактерии. Имеется одно семейство - *Spirosomonaceae*, в котором три рода. Патогенных среди них нет.

Секция 4. Аэробные грамотрицательные палочки, округлые и кокки. В секции восемь семейств, два из которых имеют патогенные микроорганизмы. Семейство *Pseudomonadaceae* имеет четыре рода, более 25 видов, среди которых имеются патогенные (*Ps. mallei* и др.). Семейство *Neisseriaceae* имеет 16 родов. Род *Neisseria* и *Moraxella* содержат патогенные для человека и животных микроорганизмы.

В эту секцию включены роды *Bordetella*, *Brucella* и *Francisella*, не имеющие семейств. Роды содержат патогенные микроорганизмы для человека и животных.

Секция 5. Грамотрицательные факультативные анаэробы. В секции три семейства: *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae* и *Pasteurellaceae*. Семейство *Enterobacteriaceae* имеет 14 родов (*Escherichia*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Shigella*, *Proteus*, *Yersinia* и др.). Семейство *Vibrionaceae* имеет два рода. В род *Vibrio* включены патогенные микроорганизмы.

Семейство *Pasteurellaceae* имеет три основных рода: *Pasteurella*, *Haemophilus* и *Actinobacillus*. Содержат патогенные виды микроорганизмов.

Секция 6. Строгие анаэробы. Изогнутые грамотрицательные палочки. В секции одно семейство - *Bacteroidaceae*, в котором 13 родов, среди которых имеются патогенные.

Секция 7. В секцию включены диссимилирующие и разлагающие сульфат бактерии. Имеется семь родов, среди которых нет патогенных.

Секция 8. Анаэробные грамотрицательные кокки. В секции одно семейство - *Vellonellaceae*, в котором три рода.

Секция 9. Риккетсии и хламидии. В секции два порядка: *Rickettsiales* и *Chlamydiales*. Порядок *Rickettsiales* имеет три семейства: *Rickettsiaceae*, *Bartonellaceae* и *Anaplasmataceae*. Семейство *Rickettsiaceae* имеет три трибы, в которые внесено восемь родов. Семейство *Bartonellaceae* содержит два рода, а *Anaplasmataceae* - четыре. Порядок *Chlamydiales* имеет одно семейство - *Chlamydiaceae* и один род - *Chlamydia*. Все семейства содержат патогенные микроорганизмы.

Отдел II. Firmicutes (лат. *firmis* - крепкий, *cutes* - кожа). В отдел включены грамположительные кокки, палочки или нити.

Секция 12. Грамположительные кокки. В секции два семейства: *Micrococcaceae* и *Deinococcaceae*. Семейство *Micrococcaceae* имеет четыре рода (*Micrococcus*, *Stomatococcus*, *Planococcus*, *Staphylococcus*). В данную секцию кроме указанных двух семейств включено еще 10 самостоятельных родов (*Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pedicoccus*, *Sarcina* и др.).

Секция 13. В секцию включены спорообразующие грамположительные палочки и кокки. В секции шесть родов: *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporolactobacillus*, *Sporosarcina* и др. Первые два рода имеют патогенные виды.

Секция 14. Неспорообразующие грамположительные палочки. В секции представлено семь родов: *Lactobacillus*, *Listeria*, *Erysipelotrix* и др. Имеются патогенные.

Секция 15. Неспорообразующие внутриклеточные грамположительные палочки. В секции представлен 21 род (*Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Acetobacterium*, *Bifidobacterium*, *Actinomyces* и др.).

Секция 16. Микобактерии. В секции одно семейство - *Mycobacteriaceae*. Семейство имеет один род - *Mycobacterium*, в котором 49 видов (*M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.avium*, *M.paratuberculosis*, *M.lepra* и др.).

Секция 17. Nocardioforms. В секции девять родов: *Nocardia*, *Pheodococcus*, *Pseudonocardia* и др.

Отдел III. Tenericutes. В отделе объединены грамотрицательные прокариоты, не имеющие клеточной стенки, имеют цитоплазматическую мембрану.

В отделе 10-я секция - микоплазмы. Они объединены в класс *Mollicutes* (лат. *molli* - мягкий, *cutes* - покров, кожа). В классе один порядок - *Mycoplasmatales* - и три семейства: *Mycoplasmataceae*, *Acholeplasmataceae*, *Spiroplasmataceae*. В основном патогенные микоплазмы включены в семейство *Mycoplasmataceae*.

Секция 11. Эндосимбионты.

Отдел IV. Mendosicutes. В отдел внесены прокариоты, среди которых нет патогенных бактерий, это метанобразующие, сероокисляющие, галофилы, микоплазмоподобные, термоацидофильные и др.

Контрольные вопросы

1. Предмет и задачи микробиологии.
2. Начальный период развития микробиологии.
3. Развитие микробиологии во второй половине 19 в.
4. Развитие микробиологии в первой половине 20 в.
5. Развитие микробиологии в России.
6. Развитие микробиологии во второй половине 20 в.
7. Какие особенности строения прокариотической клетки?
8. Какие вы знаете морфологические формы бактерий?
9. Что такое протопласты, сферопласты и L-формы бактерий?
10. Каковы особенности строения актиномицет?
11. Каковы морфологические особенности риккетсий и микоплазм?
12. В чем особенности строения микроскопических грибов?
13. Современная классификация грибов.
14. Какие отличия имеют клетки прокариотов от эукариотов?
15. Какие таксономические категории используются при классификации микроорганизмов?
16. Какая номенклатура используется для обозначения видов микроорганизмов?
17. Какое понятие вкладывается в термин «вид» микроорганизмов?
18. Что такое штамм и клон?
19. Что такое чистая культура микроорганизма?
20. Как подразделяется царство *Procaryotae* в определителе бактерий Берги ?

Тема 2. Физиология микроорганизмов. Химический состав, питание, дыхание, рост и размножение микробной клетки

Физиология микроорганизмов – раздел микробиологии, изучающий химический состав, процессы питания, дыхания и размножения микроорганизмов.

Химический состав

Вода. Основная составная часть бактериальной клетки - 75 - 85 %. Соответственно сухое вещество составляет 15 - 25 %. Часть воды находится в свободном состоянии, а часть - в связанном.

Связанная вода является структурным растворителем.

Свободная вода служит дисперсионной средой для коллоидов и растворителем для кристаллических веществ, источником водородных и гидроксильных ионов. Например, гидролитические процессы расщепления белков, углеводов и липидов происходят в результате присоединения к ним воды, а путем отщепления элементов воды могут синтезироваться новые сложные молекулы.

Какие же химические элементы содержатся в микробной клетке? Ведущая роль принадлежит четырем органогенам - кислороду, водороду, углероду и азоту. В процентном отношении к сухому веществу бактерии содержат: углерода - 45 - 55, азота - 8-15, кислорода - 30, водорода - 6-8. Соответственно дрожжи содержат (%): углерода - 49, азота - 12, кислорода - 31, водорода - 6. В микроскопических грибах (%): углерода - 47, азота - 5, кислорода - 40, водорода - 6.

Минеральные вещества. Кроме органогенов в микробных клетках находятся так называемые зольные элементы - минеральные вещества, составляющие от 3 до 10 % сухого вещества микроорганизмов. Среди них преимущественное значение имеет фосфор, который входит в состав нуклеиновых кислот, липидов, фосфолипидов. Сера содержится в аминокислотах, например, в цистине и цистеине. Магний обеспечивает активность ряда ферментов, например, протеазы. Микробы без магния не способны проявлять протеолитические свойства. Железо является необходимым элементом для осуществления процессов дыхания и энергетического обмена. Кальций, натрий, калий, силиций, хлор тоже есть в микробных клетках. Содержатся в них и микроэлементы: молибден, кобальт, бор, марганец, цинк, медь, никель и др. Наличие микроэлементов в микробах обязательно; они стимулируют процессы роста и размножения.

Химические элементы образуют в микробных клетках различные органические вещества: белки, углеводы, липиды, витамины, которые распределяются в сухом веществе.

Белки. Это высокомолекулярные биологические полимерные соединения, образующие при гидролизе аминокислоты. Структурные компоненты вирусов, бактерий, клеток растений и животных.

Роль белков в жизни микроба важна и разнообразна: основной

структурный материал всех клеточных мембран и выполняют различные функции - каталитическую, двигательную, транспортную, защитную, гормональную, запасную и др.

Белки составляют 50-80 % сухого вещества микробов. Различают два основных вида их: протеины и протеиды. Протеины, или простые белки (альбумины, глобулины, гистоны и др.), при гидролизе распадаются на аминокислоты (тирозин, лейцин, триптофан и др.). Кроме того, они могут содержать углеводный или липидный компонент. Протеиды, или сложные белки, - соединения простых белков (протеинов) с небелковыми группами, нуклеиновой кислотой, полисахаридами, жироподобными и другими веществами. Отсюда различают нуклеопротеиды, гликопротеиды, липопротеиды и др.

Нуклеиновые кислоты представляют собой высокомолекулярные биологические полимеры, построенные из моноклеотидов. Особенно характерно для них содержание фосфора (8-10 %) и азота (15-16 %), они также содержат углерод, кислород и водород. Содержание нуклеиновых кислот в бактериальной клетке может быть от 10 до 30 % сухого вещества, что зависит от вида бактерий и питательной среды. В большинстве своем они связаны с белками (нуклеопротеиды) и сложными радикалами клеточных структур бактерии. Нуклеиновые кислоты в микробных клетках существуют в виде рибонуклеиновой (РНК) и дезоксирибонуклеиновой (ДНК) кислот. Считают, что РНК преимущественно содержится в цитоплазме бактерий, в мельчайших ее зернышках - рибосомах, которые осуществляют синтез ферментов. ДНК находится в ядерном веществе бактерий. ДНК является материальным носителем наследственности всех организмов, в том числе микробов. В ее структуре записана (закодирована) генетическая информация биосинтеза белков.

Углеводы. В бактериях их содержится 12-18 % от сухого вещества. Это многоатомные спирты (сорбит, маннит, дульцит); полисахариды (гексозы, пентозы, гликоген, декстрин), моносахариды (глюкоза, глюкуроновая кислота и др.). Углеводы выполняют энергетическую роль в микробной клетке.

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

Липиды играют роль резервных веществ, и в ряде случаев могут быть использованы как исходные компоненты для синтеза белков. С ними связана кислотоустойчивость микобактерий. Они же существенно влияют на проницаемость клеточных мембран, формируют систему пограничных

мембран, выполняющих различные функции по обеспечению метаболизма микробной клетки.

Химический состав спирохет, актиномицетов, микоплазм, риккетсий, микроскопических грибов в основном сходен с бактериями.

Ферменты

Ферменты - глобулярные белки, молекулярная масса которых колеблется от 15 кД до нескольких тысяч. Это простые и сложные белки, например, уреазы, пепсин, трипсин - простые белки, а карбоксипептидаза, амилаза, рибонуклеаза - сложные. Питание и дыхание в микробной клетке происходит с участием ферментов (энзимов), которые являются биологическими катализаторами, т. е. веществами, влияющими на скорость химических реакций, из которых складывается метаболизм микроорганизмов. Незначительное количество катализатора быстро превращает большое количество субстрата, оставаясь при этом в свободном состоянии. Например, одна часть химозина (сычужного фермента) может свернуть до 12 млн частей молока; 1 г амилазы при определенных условиях может превратить в сахар 1 т крахмала.

Ферменты вырабатываются клетками и способны действовать, даже будучи выделенными из нее, что имеет большое практическое значение. Для них характерны термолабильность и высокая специфичность действия, например, фермент лактазы гидролизует лактозу, но не действует на родственные дисахариды (мальтозу, целлобиозу).

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

Принято различать экзо- и эндоферменты.

Экзоферменты не связаны со структурой протоплазмы, легко выделяются в субстрат при жизни микробной клетки (гидролитические ферменты), растворимы в питательной среде и проходят через бактериальные фильтры. Эти ферменты связаны в основном с процессом питания: расщепляют сложные высокомолекулярные вещества (белки, крахмал, клетчатку и др.), т. е. подготавливают питательные вещества к усвоению их микробной клеткой.

Эндоферменты прочно связаны с бактериальной клеткой и действуют только внутриклеточно, осуществляя дальнейшее разложение питательных веществ и превращение их в составные части клетки. К таким ферментам можно отнести, например, дегидрогеназы, оксидазы.

Оптимальная температура для действия ферментов 40-50 °С, для некоторых 58-60 °С; при температуре 100 °С они разрушаются. На активность их влияет и рН среды. У бактерий, растущих при кислых значениях рН (ацидофилы), максимум активности ферментов наблюдается при рН 4,8; у растущих при нейтральном и близком к нейтральному значению рН максимум активности ферментов наблюдается при рН 7,2; у

бактерий, способных расти в широком диапазоне рН, реакция среды заметно не влияет на активность ферментов.

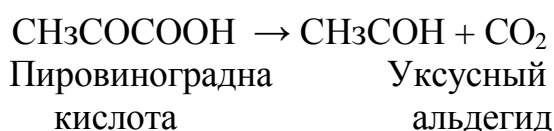
Название фермента связано с веществом, на которое он действует, с изменением окончания на «аза» или с природой катализируемой им химической реакции. На этом же основана и современная классификация их. В настоящее время насчитывается более двух тысяч ферментов. Их разделяют на шесть классов:

1. Оксидоредуктазы - ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции. Игрют большую роль в процессах биологического получения энергии. К ним относятся дегидрогеназы (НАД, НАДФ, ФАД), каталаза, цитохромы (с, с₁, а, аз), ферменты, участвующие в переносе электронов водорода, кислорода и др.

2. Трансферазы - ферменты, катализирующие перенос отдельных радикалов, частей молекул или целых атомных группировок (не водорода) от одних соединений к другим. Например, ацетилтрансферазы переносят остатки уксусной кислоты (СН₃СО), а также молекул жирных кислот; фосфоурансферазы или киназы обуславливают перенос остатков фосфорной кислоты (Н₂РО₃). Известны многие другие трансферазы (аминотрансферазы и т. д.)

3. Гидролазы - ферменты, катализирующие реакции расщепления и синтеза таких сложных соединений, как белки, жиры и углеводы, с участием воды. К этому классу относятся протеолитические ферменты (или пептидгидролазы), действующие на белки или пептиды; гидролазы глюкозидов, осуществляющие каталитическое расщепление углеводов и глюкозидов (β -фрукто-фуранозидаза, α -глюкозидаза, α - и β -амилаза, β -галактозидаза и др.); экстеразы, катализирующие расщепление и синтез сложных эфиров (липазы, фосфатазъ).

4. Л и а з ы - ферменты, катализирующие отщепление от субстратов определенных химических групп с образованием двойных связей или присоединение отдельных групп или радикалов по двойным связям. Так, пируватдекарбоксилаза катализирует отщепление СO₂ от пировиноградной кислоты:

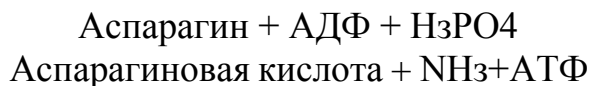


К лиазам относится также фермент альдолаза, расщепляющий шестиуглеродную молекулу фруктозо-1,6-дифосфата на два трех-углеродных соединения. Альдолаза имеет большое значение в процессе обмена веществ.

5. Изомеразы - ферменты, осуществляющие превращение органических соединений в их изомеры. При изомеризации происходит внутримолекулярное перемещение атомов, атомных группировок, различных радикалов и т. п. Изомеризации подвергаются углеводы и их производные, органические кислоты, аминокислоты и т. д. Ферменты этой группы играют

большую роль в ряде процессов метаболизма. К ним относятся триизофосфатизомераза, глюкозофосфатизомераза и др.

б. Лигазы - ферменты, катализирующие синтез сложных органических соединений из простых. Например, аспарагинсинтетаза осуществляет синтез амида аспарагина из аспарагиновой кислоты и аммиака с обязательным участием аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ), дающей энергию для этой реакции:



К группе лигаз относятся также карбоксилазы, катализирующие присоединение CO_2 к различным органическим кислотам. Например, фермент пируваткарбоксилаза катализирует синтез щевелево-уксусной кислоты из пирувиноградной и CO_2 .

По классификации ферментов каждый фермент имеет шифр, включающий 4 цифры, из которых первая указывает на класс, вторая - на подкласс, третья - на подподкласс и четвертая - на порядковый номер фермента в данном подподклассе. Так, шифр 3.5.1.5 принадлежит карбамидамидогидролазе (уреазе), которую относят к третьему главному классу - гидролазам.

Скорости реакций, катализируемых ферментами, различны и зависят от количества и активности ферментов, концентрации субстрата, pH, температуры, присутствия в среде активаторов и ингибиторов.

Активность измеряют в международных единицах (МЕ); 1 МЕ соответствует количеству фермента, превращающему 1 мкМ (микромоль) (мг/М; 10 М) субстрата в 1 мин в стандартных условиях.

Большое число разнообразных ферментов, синтезируемых клетками микроорганизмов, позволяет использовать их в промышленном производстве для приготовления уксусной, молочной, щавелевой, лимонной кислот, молочных продуктов (сыр, ацидофилин, кумыс и пр.), в виноделии, пивоварении, силосовании. По ферментативной специфичности отдельных бактерий в лабораторных условиях можно дифференцировать их виды, разновидности.

Метаболизм

Все реакции жизнеобеспечения, происходящие в микробной клетке и катализируемые ферментами, составляют обмен веществ, или метаболизм. Промежуточные или конечные продукты, образующиеся в соответствующей последовательности ферментативных реакций, в результате которых разрушается или синтезируется ковалентно связанный скелет конкретной биомолекулы, называют метаболитами.

В метаболизме микроорганизмов непрерывно осуществляются два противоположных и вместе с тем единых процесса: анаболизм и катаболизм. Другими словами, обмен конструктивный и энергетический. В первом случае

обмен веществ протекает с поглощением свободной энергии при расходовании сравнительно небольшого объема питательного материала, во втором - идет процесс выделения свободной энергии, на что расходуется огромная масса питательного субстрата.

По типу питания живые существа делятся на две группы: *голозойные* и *голофитные*. Голозойный тип питания характерен для животных (от высших до простейших). Микробы относятся к голофитному типу питания. Они не имеют органов для принятия пищи, и питательные вещества у них проникают через всю поверхность тела.

Различают несколько механизмов питания микробных клеток. Питательные вещества могут поступать из внешней среды в микробную клетку через клеточную стенку, капсулу, слизистые слои и цитоплазматическую мембрану. Через эти же структуры выделяются и продукты обмена, т. е. ненужные и вредные для микроорганизмов вещества. В основе механизма такого питания лежит осмотическое явление, основанное на разнице концентрации питательных веществ в теле микроба и питательном растворе. Таким образом вода и растворенные в ней питательные вещества поступают в микробную клетку. В результате биосинтеза в ней накапливается пластический материал коллоидной структуры (белки, углеводы и др. вещества), обуславливающий рост и размножение микроорганизма.

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

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

В норме у бактериальных клеток всегда наблюдается определенное напряжение цитоплазмы. Это объясняется тем, что коллоиды цитоплазмы благодаря постоянному притоку к клетке воды находятся в набухшем состоянии, в результате чего цитоплазма бывает плотно прижата к оболочке. Такое явление получило название *тургора* бактериальной клетки. Тургор определяет постоянство бактерий. Величина осмотического давления у бактерий при этом не превышает 6×10 Па. Но есть микробы, обитающие в морях и океанах, у которых осмотическое давление достигает порядка 9×10 Па.

Когда бактерии помещают в раствор, содержащий 15-20 % хлорида натрия или сахара (гипертонический раствор), наступает резкое

обезвоживание бактериальной клетки и протоплазматическое содержимое ее отходит от оболочки. Такое явление носит название *плазмолиза*.

Морфологически плазмолиз характеризуется возникновением шарообразных светопреломляющих образований в теле клетки. У различных микроорганизмов плазмолиз проявляется не в одинаковой степени. К нему особенно устойчивы сенная палочка, стафилококки, сарцины; легко подвергаются плазмолизу бактерии из группы пастерелл, эшерихий, сибиреязвенная палочка, холерный вибрион и др.

Противоположный плазмолизу процесс - *плазмолитиз* - наблюдается в том случае, если бактерии поместить в гипотонический раствор хлорида натрия или в дистиллированную воду. Вода проникает при этом в бактериальную клетку, цитоплазматическое вещество ее разбухает до крайних пределов, и клетка приобретает форму шара. Плазмолитиз, так же как и плазмолиз, влечет за собой гибель бактериальной клетки.

Типы питания микробов. Различают углеродное и азотное питание микроорганизмов. По типу углеродного питания микробы принято делить на автотрофы и гетеротрофы.

Автотрофы, или прототрофы, (греч. *autos* - сам, *trophe* - пища) - микроорганизмы, способные воспринимать углерод из угольной кислоты (CO_2) воздуха. К ним относят нитрифицирующие бактерии, железобактерии, серобактерии и др. Автотрофы превращают воспринятую углекислоту в сложные органические соединения путем хемосинтеза, т. е. путем окисления химических соединений (аммиак, нитриты, сероводород и др.). Таким образом, автотрофные микробы обладают способностью создавать органические вещества из неорганических, таких как угольная кислота, аммиак, нитриты, сероводород и др. Поскольку такие микробы не нуждаются в органических соединениях углерода, входящего в состав животных и человека, они не являются болезнетворными. Однако среди автотрофов встречаются микробы, обладающие способностью усваивать углерод из CO_2 воздуха и из органических соединений. Такие микробы определены как *миксотрофы* (миксо - смесь, т. е. смешанный тип питания). Отдельные виды автотрофных микробов питание осуществляют подобно зеленым растениям за счет фотосинтеза. Так, пурпурные серобактерии вырабатывают особый пигмент типа хлорофилла - бактериопурпурин, при помощи которого и происходит использование световой энергии (фотосинтез) для построения органических веществ своего тела из угольной кислоты и неорганических солей.

Гетеротрофы (*heteros* - другой) в противоположность автотрофным микробам получают углерод главным образом из готовых органических соединений. Гетеротрофы - возбудители различного рода брожений, гнилостные микробы, а также все болезнетворные микроорганизмы: возбудители туберкулеза, бруцеллеза, листериоза, сальмонеллеза, гноеродные микроорганизмы - стафилококки, стрептококки, диплококки и ряд других патогенных для животного организма возбудителей.

Однако все физиологическое многообразие микроорганизмов

неукладывается в узкое понятие об аутотрофах и гетеротрофах. В действительности же при изменении условий среды (например, питания) обмен веществ у микробов может меняться. Если микроб поместить в другую, необычную для него, питательную среду, то он начнет вырабатывать адаптивные (приспособительные) ферменты (энзимы). В качестве примера можно указать на азотфиксирующие бактерии (аутотрофы), которые на богатых белковых питательных средах перестают использовать молекулярный азот воздуха и начинают усваивать связанный азот (гетеротрофный тип усвоения азота).

Гетеротрофы включают в себя две подгруппы: метатрофных и паратрофных микроорганизмов. *Метатрофы*, или сапрофиты, живут за счет использования мертвых субстратов. Сапрофиты (*sapros* - гнилой, *phyton* - растение) - гнилостные микробы. *Паратрофы* (греч. *parasitos* - нахлебник) паразиты, живущие на поверхности или внутри организма хозяина и питающиеся за его счет.

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

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

По способу усвоения азотистых веществ микробы делят на четыре группы:

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

В качестве универсального источника азота и углерода в питательных средах для патогенных микробов применяют пептоны. Потребность микроорганизмов в зольных элементах незначительна. Необходимые для их жизни минеральные соли (сера, фосфор и др.) почти всегда имеются в естественной питательной среде. Сера воспринимается бактериями в основном из сульфатов или органических соединений аминокислот (цистин, цистеин). Серобактерии, например, могут сами ассимилировать даже молекулярную серу. В их теле находится до 80 % серы. Фосфор входит в

состав нуклеопротеидов и фосфолипидов бактериальной клетки и играет весьма важную роль в ее биосинтетических процессах. Источником питания фосфором являются различные фосфорнокислые соли, например, тринатрийфосфат (Na_3PO_4).

Жизненно необходимые элементы - калий, магний и железо - микроорганизмы получают из различных солей. Железо входит в состав гемин (особая органическая группа цитоплазмы) и служит катализатором окислительных реакций. Калий - обязательный элемент в питательной среде, но физиологическое значение его еще полностью не выяснено. Роль кальция в жизни бактерий (за исключением бактерий, участвующих в фиксации азота из воздуха), по-видимому, невелика. Магний активирует различные ферменты бактерий, в частности протеазу. Микроэлементы бор, цинк, марганец, кобальт и др. встречаются в бактериях в ничтожных количествах и служат стимуляторами роста микробов.

Факторы роста микробов. В 1901 г. Вильдье в дрожжах нашел особое вещество, названное им «биос» - ростовое вещество. В 1904 г. наш соотечественник Никитинский установил такие же стимуляторы роста в культурах плесневых грибов. В дальнейшем подобные вещества были выявлены у патогенных микроорганизмов и простейших. Одновременно было установлено, что у ряда микробов под воздействием ничтожно малых количеств ростовых веществ увеличивается накопление микробной массы и изменяется обмен веществ. Новейшие данные показали, что по химической структуре и физиологическому действию стимуляторы являются подлинными витаминами или витаминоподобными веществами.

Все изученные бактерии нуждаются в витаминах или ростовых веществах, которые играют главным образом роль катализаторов (ускорителей) биохимических процессов бактериальной клетки. Они же являются структурными единицами при образовании некоторых ферментов. Какие же витамины необходимы микробам? К витаминам, необходимым для развития микробов, относят биотин (витамин Н), витамины группы В: витамин В₁ (тиамин), В₂ (рибофлавин), В₃ (пантотеновая кислота), В₄ (холин), В₅ (никотинамид), В₆ (пиридоксин), В₇ (гемин), - витамин К и др.

Концентрация витаминов в питательной среде выражается в микрограммах (мкг), потребность в них колеблется в пределах 0,05-40 мкг/мл. Избыток витаминов задерживает рост бактерий.

Кроме витаминов, к факторам роста бактерий относятся пуриновые и пиримидиновые основания и их производные (аденин, гуанин, цитозин, тимин, урацил, ксантин и гипоксантин). Например, для гемолитического стрептококка фактором роста является аденин, для золотистого стафилококка - урацил, возбудителя столбняка - аденин или гипоксантин.

Некоторые микроорганизмы в качестве фактора роста используют аминокислоты, синтезирующиеся самой микробной клеткой или находящиеся в среде в готовом виде.

Дыхание

Дыхание микробов - это биологический процесс, сопровождаемый окислением или восстановлением различных, преимущественно органических, соединений с последующим выделением энергии в виде аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ), необходимой микробам для физиологических нужд.

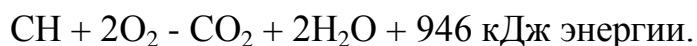
Процесс, в котором атомы или молекулы теряют электроны (e-), называется окислением, а обратный процесс - присоединение электронов - восстановлением.

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

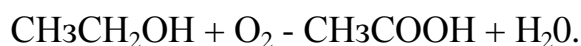
Переносчиками водорода в реакциях биологического окисления и восстановления являются главным образом два пиридиновых нуклеотида (коферменты анаэробных дегидрогеназ) - никотинамидадениндинуклеотид (НАД) и никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ). Отнимая водород от окисляемого субстрата, они переходят в восстановительную форму (НАД•Н₂ и НАДФ•Н₂) и переносят водород на другой акцептор. НАД•Н₂ передает водород главным образом на промежуточные продукты брожения или в дыхательную цепь, а НАДФ•Н₂ участвует преимущественно в реакциях биосинтеза различных веществ, которые входят в состав клетки микроорганизма.

Типы биологического окисления. С биохимической точки зрения окисление биологического субстрата микроорганизмами может быть достигнуто по типу прямого окисления и непрямого окисления, или дегидрогенирования.

Прямое окисление осуществляется с помощью оксидаз путем непосредственного окисления вещества кислородом воздуха или же путем дегидрирования - отнятия от субстрата водорода, точнее, его электрона. Прямое окисление регистрируется у большинства сапрофитных микроорганизмов. Например, *Bact. metanicum*, окисляя метан, получает энергию по следующей схеме:

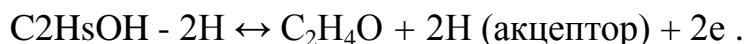


У некоторых микробов, поглощающих кислород, реакции окисления не доходят до получения конечного продукта, т.е. до образования углекислоты. Примером такого неполного окислительного процесса может служить дыхание уксуснокислых бактерий, у которых конечным продуктом окисления этилового спирта является не углекислота, а уксусная кислота:



Непрямое окисление путем дегидрогенирования сопровождается одновременным переносом двух электронов, причем от субстрата

отщепляются два протона (H). При ферментативном отщеплении водорода субстрата при помощи дегидрогеназ освобождаются два электрона (энергия) подобно образованию ацетальдегида из этилового спирта:



Дегидрогеназ у бактерий несколько, они называются по донору водорода (например, алкогольдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа), но большинство их переносит водород на один из двух коферментов - никотинамидадениндинуклеотид (НАД) или никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ⁺). Оба кофермента легко отделяются от одной дегидрогеназы и связываются с другой дегидрогеназой, переносят водород на другой акцептор. НАД•Н (+Н) переносит водород преимущественно на предшественники брожения или в дыхательную цепь; НАДФ Н (+Н⁺) участвует в основном в биосинтезе.

Аэробное дегидрогенирование происходит в присутствии кислорода, и у таких микробов как, например, бациллы, акцептором водорода является кислород, в результате чего в зависимости от набора ферментов образуется вода или перекись водорода. Для этого у аэробных бактерий имеются цитохромоксидаза и система геминных ферментов-цитохромов. Цитохромоксидаза катализирует конечное связывание водорода с атмосферным кислородом вне клетки. Если цитохромоксидаза переносит две пары водородных ионов, образуется вода: $4Fe^{2+} + 4H^+ + O_2 \rightarrow 4Fe^{3+} + H_2O$. Если она связывает с кислородом воздуха только одну пару водородных ионов, в качестве конечного продукта образуется перекись водорода: $2Fe^{2+} + 2H^+ + O_2 \rightarrow 2Fe^{3+} + H_2O_2$. Поскольку перекись водорода токсична для бактерий, она моментально разлагается каталазой или пероксидазой. облигатные анаэробы каталазу не содержат, чем частично можно объяснить токсичность для них кислорода.

Анаэробное дегидрогенирование осуществляется в отсутствие молекулярного кислорода. Акцепторами водорода в данном случае являются другие неорганические элементы, например, соли азотной, серной кислот, углекислоты, которые превращаются при этом в более восстановленные соединения (аммиак, метан, сероводород).

Свойство анаэробов переносить электроны на нитраты, сульфаты и карбонаты обеспечивает в достаточной степени полное окисление органического или неорганического вещества без использования молекулярного кислорода и обуславливает возможность получения ими большего количества энергии, чем при процессе брожения. При анаэробном дыхании выход энергии только на 10 % ниже, чем при аэробном. Микроорганизмы, для которых характерно анаэробное дыхание, имеют набор ферментов цепи переноса электронов, но цитохромоксидаза заменяется нитратредуктазой (в случае использования нитратов) или аденилсульфатредуктазой (в случае использования сульфатов).

Классификация микробов по типу дыхания. В 1861 г. Л. Пастер, изучая

броидильные свойства микроорганизмов, обнаружил, что отдельные микробы способны размножаться без доступа атмосферного кислорода. Бактерии и грибы, использующие кислород из воздуха, получили название облигатных аэробов, а в условиях его отсутствия - анаэробов. У аэробов конечным акцептором электронов является молекулярный кислород, для анаэробов конечным акцептором электронов являются неорганические соединения, такие как нитраты, сульфаты, карбонаты.

По типу дыхания микроорганизмы классифицируют на четыре основные группы.

Облигатные (безусловные) аэробы растут при свободном доступе кислорода, обладают ферментами, позволяющими передать водород от окисляемого субстрата конечному акцептору - кислороду воздуха. К ним относятся уксуснокислые бактерии, возбудители туберкулеза, сибирской язвы и многие другие.

Микроаэрофильные бактерии развиваются при низкой (до 1 %) концентрации кислорода в окружающей атмосфере. Такие условия благоприятны для актиномицетов, лептоспир, бруцелл.

Факультативные анаэробы вегетируют как при доступе кислорода воздуха, так и в отсутствие его. Имеют соответственно два набора ферментов. Это многочисленная группа микроорганизмов, к которой относятся, в частности, энтеробактерии, возбудитель рожи свиней.

Облигатные (безусловные) анаэробы развиваются при полном отсутствии кислорода в окружающей среде. Анаэробные условия необходимы маслянокислым бактериям, возбудителям столбняка, ботулизма, газовой гангрены, эмфизематозного карбункула, некробактериоза.

Окислительно-восстановительный потенциал питательной среды. При изготовлении питательных сред учитывают не только рН среды, но и соотношение веществ, отдающих и принимающих электроны. Величину окислительно-восстановительного потенциала обозначают символом gH_2 - отрицательный логарифм парциального давления газообразного водорода. Он измеряется потенциометром или на универсальном ионметре в mV и обозначается в единицах. Диапазон gH_2 от 0 до 42,6 характеризует все степени насыщения раствора H и O₂. Так, строгие анаэробы растут при низком окислительно-восстановительном потенциале - от 0 до 12 факультативные микроорганизмы - 0 до 20 и аэробы - от 14 до 35. Следовательно он минимальный при насыщении среды водородом и максимальный при насыщении кислородом. Регулируя степень окислительно-восстановительного потенциала, мы создаем благоприятные условия для роста и размножения микроорганизмов.

Методы создания анаэробииоза. Для выделения анаэробных возбудителей инфекционных болезней создаются анаэробные условия культивирования. Для этого существует несколько методов.

1. Физический метод. Он заключается в удалении воздуха из эксикатора или анаэроостата при помощи масляного воздушного насоса. Жидкие среды перед засевом для удаления из них воздуха кипятят, т. е.

проводят так называемое регенерирование среды; для предотвращения контакта жидкой среды с воздухом на ее поверхность наносят слой вазелинового или парафинового масла.

2. Химический метод. Основан на применении поглотителей кислорода, например, пирогаллола с гидроокисью натрия, калия либо гидросульфита натрия с натрия гидрокарбонатом в соотношении 1:1.

3. Биологический метод (метод Фортнера). Основан на выращивании анаэробов в присутствии аэробов (например, «чудесной палочки») в одной чашке Петри. Вначале вырастает аэробная культура, а затем по мере поглощения последней кислорода из чашки начинает развиваться анаэробная культура.

4. Комбинированный метод. Предусматривает использование двух других, скажем, физиологического и химического.

Нередко удается ослабить или полностью нейтрализовать вредное для бактерий действие кислорода прибавлением к среде восстановителей (аскорбиновой кислоты, тиогликолата, цистеина).

Рост и размножение бактерий

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

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

Бактерии размножаются преимущественно простым поперечным делением (вегетативное размножение), которое происходит в различных плоскостях, с образованием многообразных сочетаний клеток (кисть винограда - стафилококки, цепочки - стрептококки, соединения по парам - диплококки, тьюки, пакеты - сарцины и др.). Процесс деления состоит из ряда последовательных этапов. Первый этап начинается формированием в средней части клетки поперечной перегородки (рис. 6), состоящей вначале из цитоплазматической мембраны, которая делит цитоплазму материнской клетки на две дочерние. Параллельно с этим синтезируется клеточная стенка, образующая полноценную перегородку между двумя дочерними. В процессе деления бактерий важным условием является репликация (удвоение) ДНК, которая осуществляется ферментами ДНК-полимеразами. При удвоении ДНК происходит разрыв водородных связей и образование двух спиралей ДНК, каждая из которых находится в дочерних клетках. Далее дочерние односпиральные ДНК восстанавливают водородные связи и вновь образуют двуспиральные ДНК.

Репликация ДНК и деление клеток происходит с определенной скоростью, присущей каждому виду микроба, что зависит от возраста культуры и характера питательной среды. Например, скорость роста

кишечной палочки колеблется от 16 до 20 мин; у микобактерий туберкулеза деление наступает лишь через 18-20 ч; для клетки культуры тканей млекопитающих требуются сутки. Следовательно, бактерии большинства видов размножаются почти в 100 раз быстрее, чем клетки культуры тканей.

Типы деления клеток бактерий.

1. Клеточное деление опережает разделение, что приводит к образованию «многоклеточных» палочек и кокков.

2. Синхронное клеточное деление, при котором разделение и деление нуклеоида сопровождаются образованием одноклеточных организмов.

3. Деление нуклеоида опережает клеточное деление, обуславливая образование многоклеточных бактерий.

Разделение бактерий, в свою очередь, происходит тремя способами:

1) разламывающее разделение, когда две индивидуальные клетки, неоднократно переламываясь в месте сочленения, разрывают цитоплазматический мостик и отталкиваются друг от друга, при этом образуются цепочки (сибиреязвенные бациллы);

2) скользящее разделение, при котором после деления клетки обособляются и одна из них скользит по поверхности другой (отдельные формы эшерихий);

3) секущее разделение, когда одна из разделившихся клеток свободным концом описывают дугу круга, центром которого является точка ее контакта с другой клеткой, образуя римскую пятерку или клинопись (коринебактерии дифтерии, листерии).

Фазы развития бактериальной популяции. Теоретически допускается, что если бактериям создать условия непрерывного притока и прогрессивного увеличения массы свежей питательной среды и оттока продуктов выделения, то размножение будет возрастать логарифмически, а гибель арифметически.

Общую закономерность роста и размножения бактериальной популяции принято показывать графически в виде кривой, которая отражает зависимость логарифма числа живых клеток от времени. Типичная кривая роста (рис. 7) имеет S-образную форму и позволяет различать несколько фаз роста, сменяющих друг друга в определенной последовательности:

1. *Исходная* (стационарная, латентная, или фаза покоя). Представляет собой время от момента посева бактерий на питательную среду до их роста. В этой фазе число живых бактерий не увеличивается, а может даже уменьшаться. Продолжительность исходной фазы 1-2 ч.

2. *Фаза задержки размножения.* В течение этой фазы бактериальные клетки интенсивно растут, но слабо размножаются. Период этой фазы занимает около 2 ч и зависит от ряда условий: возраста культуры (молодые культуры приспособляются быстрее, чем старые); биологических особенностей микробных клеток (для бактерии кишечной группы характерен короткий период приспособления, для микобактерий туберкулеза - длительный); полноценности питательной среды, температуры выращивания, концентрации CO_2 , рН, степени аэрации среды, окислительно-

восстановительного потенциала и др. Нередко обе фазы объединяют термином «лаг-фаза» (англ. lag - отставание, запаздывание).

3. *Логарифмическая фаза.* В этой фазе скорость размножения клеток и увеличение бактериальной популяции максимальны. Период генерации (лат. *generatio* - рождение, воспроизведение), т. е. время, прошедшее между двумя последовательными делениями бактерий, в этой стадии будет постоянным для данного вида, а количество бактерий станет удваиваться в геометрической прогрессии. Это означает, что в конце первой генерации из одной клетки формируются две, в конце второй генерации обе бактерии, разделяясь, образуют четыре, из полученных четырех формируются восемь и т. д. Следовательно, после n генераций количество клеток в культуре будет равно 2^n . Длительность логарифмической фазы составляет 5-6 ч.

4. *Фаза отрицательного ускорения.* Скорость размножения бактерий перестает быть максимальной, число делящихся особей уменьшается, а число погибших увеличивается (длительность около 2 ч). Одна из возможных причин, замедляющих размножение бактерий, - истощение питательной среды, т. е. исчезновение из нее веществ, специфических для данного бактериального вида.

5. *Стационарная фаза максимума.* В ней число новых бактерий почти равно числу отмерших, т. е. наступает равновесие между погибшими клетками и вновь образующимися. Продолжается эта фаза 2 ч.

6. *Фаза ускорения гибели.* Характеризуется прогрессивным превосходством числа погибших клеток над количеством вновь нарождающихся. Длится она около 3 ч.

7. *Фаза логарифмической гибели.* Отмирание клеток происходит с постоянной скоростью (длительность около 5 ч).

8. *Фаза уменьшения скорости отмирания.* Остающиеся в живых клетки переходят в состояние покоя.

Основные принципы культивирования бактерий

В лабораторных условиях микроорганизмы выращивают на питательных средах, которые должны быть стерильными, прозрачными, влажными, содержать определенные питательные вещества (белки, углеводы, витамины, микроэлементы и др.), обладать определенной буферностью, иметь соответствующий рН, окислительно-восстановительный потенциал. Питательные среды классифицируют по консистенции - жидкие, полужидкие, плотные (твердые); происхождению - животного или растительного происхождения и синтетические среды, приготовленные из определенных химически чистых соединений в точно указанных концентрациях; по назначению - общеупотребительные (универсальные), дифференциальные, элективные и среды обогащения, специальные.

Обычные (простые) среды пригодны для культивирования многих видов патогенных и непатогенных бактерий. К ним относятся мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), мясопептонный желатин (МПЖ). Мясопептонный агар готовят из мясопептонного бульона

путем добавления 1-2 % фабричного агара, который придает питательной среде при охлаждении консистенцию плотного студня. Получают агар из некоторых водорослей.

Дифференциальные среды позволяют различать бактерии разных видов и родов по их культуральным и биохимическим свойствам. К ним относятся мясопептонный желатин, среды Гисса, Эндо, кровяной агар, бактоагар Плоскирева (бактоагар Ж) и др.

Элективные (избирательные) среды и среды обогащения, благоприятствующие размножению бактерий определенных видов и подавляющие рост других микробов. К ним относятся яичные среды Петраньяни, Гельберга для выращивания микобактерий туберкулеза, среды Дюба - Смита в модификации А. П. Аликаевой для выращивания возбудителя паратуберкулеза и др.

Специальные среды - наиболее оптимальные для выращивания бактерий, не размножающихся на общепотребительных средах. К ним относятся кровяной агар, сывороточный агар, сывороточный бульон, среда Китта - Тароцци (МППБ), среда Сабуро и др.

На плотных питательных средах микробы образуют различные по форме и величине колонии, которые представляют собой видимые скопления особей одного вида микроорганизмов, образующихся в результате размножения из одной или нескольких клеток.

Колонии характеризуются величиной - крупные (до 4 мм), средние (2-4 мм), мелкие (1-2 мм); формой круглая, эллипсовидная, пузырьковидная, ветвистая (она может изменяться в зависимости от условий питания и других влияний окружающей среды); поверхностью - блестящая, матовая, неровная, морщинистая, складчатая, мозговидная, гладкая, исчерченная; прозрачностью - прозрачные, мутные, опалесцирующие; консистенцией - слизистая, вязкая, крошковатая, мучнистая, рогоподобная; краями - ровные, изрезанные, бахромчатые, неровные, дольчатые, локонообразные, бухтообразные, изъеденные, расплывчатые; профилем или рельефом - плоский, приподнятый, выпуклый, вдавленный, куполообразный; структурой - однородные (гомогенные), зернистые; пигментом - нет, есть, какого цвета; запахом - отсутствует, резкий, что напоминает. Изучение ведут макроскопически (величина, форма, цвет, прозрачность) и микроскопически (строение и края колонии).

У культур, выращенных на жидких питательных средах, изучают поверхностный рост (пристеночное кольцо, пленка, хлопья, их характер); помутнение - слабое, умеренное, сильное, стойкое, проходящее; осадок - плотный, хлопчатый, зернистый, в виде клочка ваты; количество его - обильное, скудное; цвет среды и запах.

Особенности размножения различных микроорганизмов. Для культивирования спирохет простейших применяют питательные среды, содержащие нативные белки (сыворотка, кровь), кусочки свежих органов и тканей (почки кролика, мозговая ткань кур), синтетические питательные среды, состоящие из определенных аминокислот.

Риккетсии (облигатные внутриклеточные паразиты) размножаются в тканях с пониженным метаболизмом. Их культивируют в куриных эмбрионах.

Для культивирования патогенных грибов, как правило, применяют элективные среды слабокислой или кислой реакции (рН 6,8-4,5). Элективность достигается подбором питательных веществ и добавлением к средам антибиотиков или красителей для подавления роста бактериальной флоры. Оптимальная температура культивирования 30-33 °С. Широко используют плотные среды Сабуро, пивное сусло-агар и др. Из жидких сред хорошо зарекомендовали себя сахарный бульон, пивное сусло, среда Чапека - Докса, рН 6-6,8.

Микоплазмы в силу своих структурных особенностей слабо адаптируются на питательных средах. Одни штаммы вызывают помутнение среды, другие - образуют легкую пленку; одни - растут в верхнем слое питательной среды, другие - в придонной части. На плотных питательных средах микоплазмы формируют характерные колонии, напоминающие яичницу-глазунью. При этом в первичных посевах рост начинается на 3-7-е сут, адаптированные же штаммы растут значительно быстрее.

Синтез микробных пигментов, флуоресцирующих и ароматобразующих веществ. Микроорганизмы в процессе жизнедеятельности синтезируют красящие вещества - пигменты, придающие колониям бактериальных культур разнообразный цвет и оттенки, что учитывается при дифференциации микроорганизмов. Различают красные пигменты (актиномицеты, дрожжи, грибы, «чудесная палочка» - *Bact. prodigiosum*), желтые или оранжевые (микобактерий туберкулеза, сарцины, стафилококки), синие (синегнойная палочка - *Pseudomonas aeruginosa*, бактерия синего молока - *Bact. synchyaneum*), фиолетовые (*Chromobacterium violaceum*), черные (некоторые виды грибов, дрожжей, почвенных микробов). Образование пигментов происходит в присутствии кислорода при комнатной температуре и пониженном освещении. Микроорганизмы, развиваясь на пищевых продуктах (молоко, сыр, мясо, рыба, масло, творог), изменяют их цвет. Различают пигменты, растворимые в воде (синегнойная бактерия, бактерии сине-зеленого молока - пиоцианин, синцианин), в спирте (пигменты «чудесной» бактерии, стафилококков и сарцин - красный, золотистый, лимонно-желтый и желтый), не растворимые ни в воде, ни в спирте (черные пигменты дрожжей, грибов, азотобактера), выделяющиеся в окружающую среду (хромонарные), остающиеся в теле микроорганизмов (хромофорные).

Физиологическое значение пигментов в жизнедеятельности микроорганизмов до конца не изучено. Точно установлено, что пигментобразующие микроорганизмы более резистентны к действию физико-химических и биологических факторов.

Свечящиеся микроорганизмы (фотобактерии) вследствие окислительных процессов в бактериальной клетке обладают способностью свечения (люминесценции). Фотобактерии являются строгими аэробами, при прекращении доступа кислорода свечение у них приостанавливается.

Наблюдаемое в природе свечение гнилушек, старых деревьев, мяса, чешуи рыбы, светящиеся термиты, муравьи, пауки, другие предметы и объекты объясняются наличием в них фотобактерий. Среди них встречаются кокки, вибрионы, некоторые грибы и бактерии. Они хорошо развиваются на обычных питательных средах, на рыбных и мясных субстратах при температуре от 15 до 37 °С. Типичным представителем фотобактерий является *Photobacterium phosphoreum*. Патогенных фотобактерий не найдено.

Ароматобразующие микробы обладают способностью вырабатывать летучие ароматические вещества, например, уксусноэтиловый и уксусноамиловый эфиры, которые придают ароматические свойства винам, пиву, молочнокислым продуктам, селю, почве и т. д. Типичным представителем ароматобразующих бактерий является *Leuconostoc cremoris*, который широко используют при выработке молочнокислых продуктов.

Контрольные вопросы

1. Какие минеральные вещества входят в состав микроорганизмов?
2. Что представляют собой ферменты микробных клеток и какое участие они принимают в жизнедеятельности клетки?
3. Назовите гидролитические и окислительно-восстановительные ферменты.
4. Назовите типы питания микробов и раскройте их суть.
5. В чем состоит сущность классификации микробов по типу дыхания?
6. Сформулируйте понятия о факультативных анаэробах, микроаэрофилах, анаэробах, аэробах.
7. Каковы основные принципы культивирования микроорганизмов?
8. Какие методы создания анаэробииа вы знаете?

Тема 3. Влияние физических, химических, биологических факторов на микроорганизмы. Понятие об асептике и антисептике. Стерилизация и дезинфекция. Экология микроорганизмов (распространение в природе, почве, воде, воздухе).

Действие физических факторов

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

Влияние температуры. Об отношении микроорганизмов к температуре обычно судят по способности их расти и размножаться в определенных температурных границах. Для каждого вида бактерий имеется определенная оптимальная температура развития, и в зависимости от пределов этой температуры бактерии могут быть разделены на три физиологические группы: психрофильные (от греч. *psychros* - холодный, *philein* - любить), мезофильные (*mesos* - средний) и термофильные (*termos* - теплый).

Психрофильные микроорганизмы (психрофилы) являются преимущественно обитателями северных морей, почвы, сточных вод (светящиеся бактерии, некоторые железобактерии и др.). Температурные границы психрофилов: температура минимум около 0 °С, оптимум 15-20, максимум 30-35 °С.

Мезофильные бактерии - наиболее обширная группа. Сюда относятся большинство сапрофитов и все патогенные микроорганизмы. Температурный минимум 10 °С, оптимум 30-37, максимум 40-45 °С.

Термофильные бактерии часто и в большом количестве встречаются в природе: почве, воде, теплых минеральных источниках, а также в пищеварительном тракте животных и человека. Температурный минимум 35 °С, оптимум 50-60, максимум 70-75 °С.

Способность некоторых неспорообразующих бактерий горячих источников существовать при температурах от 40 до 93 °С и выше дало основания для выделения этих организмов в новую группу *экстремально-термофильных бактерий*. Возможность существования термофилов при высокой температуре обусловлена особым составом липидных компонентов клеточных мембран, высокой термостабильностью белков и ферментов, термостабильностью клеточных ультраструктур.

Высокие и низкие температуры по-разному влияют на микробы. При низких температурах микробная клетка переходит в состояние анабиоза, в котором она может существовать несколько месяцев. Так, эшерихии остаются жизнеспособными при минус 190 °С до 4 мес, холерный вибрион при минус 45 °С - до 2 мес, возбудитель листериоза при минус 10 °С - до 3 лет.

Низкие температуры приостанавливают гнилостные и бродильные процессы. На этом принципе построено сохранение продуктов в ледниках,

погребах и холодильниках. В микробиологической практике широко применяется длительное хранение культур микробов, иммуноглобулинов, антибиотиков, живых вакцин в высушенном виде из замороженного состояния. Метод получения сухих культур микроорганизмов путем высушивания из замороженного состояния (минус 76 °С) под высоким вакуумом называется лиофилизацией (от греч. *lyo* - растворять, *phileo* - люблю).

При лиофилизации свободная вода и вода, непрочно связанная с гидрофильными веществами клеток, подвергается замораживанию и затем происходит сублимация льда, т. е. переход его из твердого состояния в парообразное, минуя жидкую фазу. После этого остается сухая пористая масса, которая при добавлении к ней воды легко суспензируется. Повторное замораживание и оттаивание вредно действуют на микроорганизмы и может быть одной из причин гибели бактерий при лиофилизации.

Высокая температура, в особенности нагревание паром под давлением, губительно действует на микробов. Чем больше температура выходит за пределы максимума, тем быстрее погибают вегетативные формы микроорганизмов: при 60 °С - через 30 мин, при 70 °С - через 10-15, при 80-100 °С - через 1 мин. В основе бактерицидного действия высоких температур лежит угнетение ферментов: каталазы, оксидаз, дегидраз, - денатурация (свертывание) белков и нарушение осмотического барьера. Споры бактерий более устойчивы к действию высокой температуры.

Применение высокой температуры является самым распространенным, удобным и надежным способом стерилизации - обеспложивания (*sterilis* - бесплодный) - освобождения от микробов разнообразных объектов. Существуют различные способы стерилизации при помощи высокой температуры: прокаливание на огне, кипячение, стерилизация сухим паром в печах Пастера (сухожаровые шкафы), стерилизация паром под давлением в автоклавах, без давления в аппарате Коха, тиндализация (дробная стерилизация при температуре 56-58 °С), пастеризация - метод, предложенный Пастером с целью сохранения питательной ценности молока, вина, различных консервов, которые нагревают до 80 °С 30 мин, а затем быстро охлаждают до 4-8 °С. При пастеризации погибают вегетативные формы микробов, споры же сохраняются, но быстрое охлаждение и хранение продукта при 4-5 °С препятствует их проращению и последующему размножению микробов.

Стерилизации подвергают также перевязочный материал, хирургический инструмент, различные растворы. Система мер, полностью предотвращающих проникновение микроорганизмов в макроорганизм при ранении, хирургических вмешательствах, названа асептикой. Уничтожение микроорганизмов в ранах при помощи химических средств (растворы хлора, йода, перекиси водорода, азотнокислого серебра и др.) называется антисептикой.

Влияние высушивания. Многие виды микроорганизмов надолго сохраняются после высушивания, хотя расти и размножаться в этих условиях

они не могут. В высохшей мокроте больных туберкулезом возбудитель остается вирулентным до 10 мес, споры бацилл сибирской язвы сохраняются до 10 лет, плесневых грибов - 20 лет. Высушивание сопровождается обезвоживанием цитоплазмы и денатурацией белков бактерий.

Дегидратация (обезвоживание) вегетативных форм бактериальных клеток в большинстве случаев вызывает их гибель. Некоторые микроорганизмы, в особенности морские и пресноводные, а также патогенные виды, быстро погибают при высыхании, т. е. они не могут жить без воды или соков животного организма. Споры, конидии, артроспоры и хламидоспоры, все это, в сущности, покоящиеся клетки, специально адаптированные к длительному пребыванию в сухом виде.

В природе микроорганизмы часто оказываются в условиях недостаточной влажности - в сухой почве, на высушенных растениях, а в зимний период микробные клетки теряют часть воды в результате замораживания. Высушивание используют для консервирования кормов (сена, соломы), овощей, фруктов, лекарственных трав.

Влияние на бактерии гидростатического давления. Гидростатическое давление как фактор окружающей среды также влияет на жизнедеятельность микроорганизмов. Чувствительность бактерий к гидростатическому давлению неодинакова. Бактерии, устойчивые к высокому давлению, называют *барофильными* (от греч. *baros* - тяжесть). Они существуют при давлении в $1 \cdot 10^5$ Па (выделены из материала, взятого на дне океанов, с глубины 5 тыс. м); споры бацилл сохраняются при давлении в $2 \cdot 10^6$ Па. Повышенное давление ($10-10^6$ Па) в сочетании с высокой температурой (120°C) используется в автоклавах в целях обезвреживания (стерилизации) материалов, содержащих возбудителей инфекционных болезней.

Большое влияние на рост микроорганизмов оказывает осмотическое давление. Осмотическое давление среды, определяемое концентрацией растворенных в ней веществ, выполняет важную роль в метаболизме микробной клетки. Внутри бактерий осмотическое давление соответствует давлению 10-20 %-ного раствора сахарозы. Если их поместить в среду с более высоким осмотическим давлением, то наступит *плазмолиз* (потеря воды и гибель клетки), а если они будут находиться в среде с низким осмотическим давлением, вода будет поступать внутрь клетки, клеточная стенка которой может разорваться. Это явление названо *плазмолизом*. Явление плазмолиза и плазмолиза используют в промышленности и в быту для консервирования продуктов (огурцы, помидоры, капуста и др.).

Осмотическое давление клетки у грамположительных бактерий достигает $3 \cdot 10^6$ Па, у грамотрицательных - $4 \cdot 10^6 - 8 \cdot 10^6$ Па. Следовательно, в растворах с высоким осмотическим давлением (около $9 \cdot 10^6-10^7$ Па – 15-20 %-ный раствор NaCl) создаются условия, невозможные для роста бактерий и ряда других организмов. Существуют микроорганизмы, которые могут активно размножаться при высоком осмотическом давлении. Это *осмофильные микроорганизмы*, или *галофилы* (любящие соль), их ферменты

активны только при повышенном содержании хлорида натрия; ионы натрия необходимы галофилам для усвоения из окружающей среды питательных веществ. Некоторые галофилы размножаются при высокой (20-30 %-ной) концентрации хлорида натрия (роды *Halobacterium*, *Micrococcus*, *Sarcina*), например, в солончаковых почвах, рассолах для соления рыбы, мяса (обычно они вызывают порчу этих продуктов).

В настоящее время в микробиологии возникло новое направление - *баробиология микроорганизмов*, которая изучает роль гидростатического давления как экологического фактора, оказывающего влияние на распространение и активность микроорганизмов в глубине морей и океанов.

Действие различных видов излучения на микроорганизмы. Различные виды излучений бактерицидно действуют на микробы. Однако степень этого действия зависит от вида лучевой энергии, ее дозы и длительности экспозиции.

Действие видимого света. Видимый, рассеянный свет (длина волн 300-1000 нм) угнетает жизнедеятельность микроорганизмов, правда, слабее, чем прямые солнечные лучи. В связи с этим культивирование микроорганизмов на искусственных питательных средах проводят в темноте, в термостатах или специальных комнатах, где поддерживается оптимальная для размножения микробов температура. Видимый свет положительно влияет только на пигментобразующие бактерии (они используют световую энергию для осуществления фотосинтеза, при этом активно образуют пигмент - микробная культура окрашивается в красный, зеленый и т. д. цвета).

Микроорганизмы, не образующие пигменты, можно искусственно сделать чувствительными к искусственному свету, если окрасить их метиленовой синью эозином и др. Это явление названо фотосенсибилизацией, а действие фотодинамическим.

Прямые солнечные лучи убивают все микроорганизмы, кроме пурпурных и зеленых серобактерий, развитию последних солнечный свет благоприятствует. Свет прямо не разрушает бактериальную клетку, что отмечается при действии химических веществ. Бактерицидное действие света связано с образованием в клетке гидроксильных радикалов и других высокорепреактивных веществ, действующих губительно на микробную клетку. В ряде исследований при облучении микробов отмечена инактивация ферментов.

Микробы-сапрофиты более устойчивы к воздействию света в сравнении с патогенными. Это объясняется тем, что они чаще подвергаются действию прямых солнечных лучей, поэтому являются более адаптированными. Патогенные же микроорганизмы весьма чувствительны к действию света. Так, под действием прямых солнечных лучей культуры пастерелл гибнут через 7-12 мин, а возбудители туберкулеза - через 45-50 мин.

Бактерицидность света усиливают некоторые краски (эозин, метиленовая синь и др.). Гигиеническое значение солнечного света огромно,

он представляет собой один из факторов самоочищения воздуха, рек и верхних слоев почвы.

Действие ультрафиолетовых лучей. Ультрафиолетовые лучи с длиной волн от 400 до 300 нм - химически активны, от 330 до 295 нм - биологически активны, а с длиной волн от 295 до 200 нм - бактерицидно активны. Механизм действия ультрафиолетовых лучей заключается в том, что в цепях ДНК между остатками тимина образуются ковалентные связи, что приводит к частичному или полному подавлению репликации ДНК, а также повреждению рибонуклеиновых кислот (особенно мРНК).

При облучении микробов ультрафиолетовыми лучами с длиной волны 320-400 нм возможна *фотореактивация*, т. е. восстановление жизнеспособности микроорганизмов.

Ультрафиолетовые лучи широко применяют для санации воздуха в животноводческих помещениях, в лабораториях и промышленных цехах (бродильная промышленность, производство антибиотиков), в боксах для обеспечения аспетических условий посевов. Для дезинфекции воздуха применяют лампы низкого давления типа БУВ-15, БУВ-30, БУВ-30 П, БУВ-60 П и ДБ-60. На основе использования ультрафиолетовых и инфракрасных ламп для животноводческой практики выпускают установку ИКУФ-1. Промышленностью изготавливаются также бактерицидные облучатели с одной или двумя лампами БУВ-30 или БУВ-60 П, последние широко применяются в животноводстве и птицеводстве, для дезинфекции воздуха помещений.

Ионизирующая радиация. Рентгеновы лучи - электромагнитное излучение с длиной волны 0,006-10 нм; гамма-лучи (γ) - коротковолновые рентгеновы лучи, бета-частицы (β) или катодные лучи (высокоскоростные электроны), альфа-частицы (α) или высокоскоростные ядра гелия и нейтроны оказывают слабое инактивирующее действие на микроорганизмы. Бактерицидность наиболее сильно действующих γ -лучей слабее, чем УФ-лучей, - гибель бактерий наступает только при облучении ими в высоких дозах - от 44 000 до 280 000 рентген. Бактерии обнаружены в воде атомных реакторов, где величина радиоактивного облучения достигает 2-3 млн рентген. В том случае, если микроорганизмы находятся на расстоянии 3-5 см от источника облучения (кобальтовая пушка - свинцовый шар, внутри которого помещен Co_{60}), гибель их наступает через 5-6 ч, при расстоянии 10 см - через 48 ч.

Механизм действия рентгеновых лучей заключается в поражении ядерных структур, в частности нуклеиновых кислот цитоплазмы. Поражается генетический аппарат микробной клетки, что приводит к летальному исходу или возникновению мутации. Неблагоприятное воздействие ионизирующих излучений усиливается в присутствии кислорода.

Ионизирующую радиацию применяют для уничтожения микробов, на инструментах, в перевязочном материале, биопрепаратах - холодная стерилизация (при этом не снижается их качество, так как не происходит денатурации составных ингредиентов, как при тепловой стерилизации).

Лучи лазера используют в основном для уничтожения пигментобразующих бактерий (синегнойная палочка и др.). Под влиянием этих лучей все биологические объекты претерпевают необратимые изменения (денатурация белка и пр.), поскольку при энергии излучения в 1 Дж и размере светового пучка 1,5 мм в точке фокуса излучения на глубине 100 мкм создается температура 60 °С. Бактерии погибают при следующем режиме: длина волны 694,3 нм, энергия 200 Дж и длительность облучения $1 \cdot 10^6$ с.

Влияние электричества. Электричество малой и высокой частоты убивает микробы. Особенно сильное действие оказывают на них токи ультравысокой частоты. Они приводят в колебание молекулы всех элементов клетки, вследствие чего происходит быстрое и равномерное нагревание всей ее массы и повышение температуры независимо от окружающей среды. Установлено, что длительное воздействие токов высокой частоты приводит к электрофорезу некоторых компонентов среды. Образующиеся при этом соединения инактивирующе действуют на микробную клетку.

Влияние ультразвука. Ультразвук (волны с частотой около 20 000 Гц/с) используется для стерилизации пищевых продуктов и дезинфекции предметов. Механизм бактерицидного действия его заключается в том, что в цитоплазме бактерий, находящихся в жидкой среде (вода, молоко), образуется кавитационная полость, которая заполняется парами жидкости, в пузырьке возникает давление в $1 \cdot 10^6$ Па, что приводит к дезинтеграции цитоплазматических структур. Возможно, что в образующихся кавитационных полостях озвученной среды возникают высокорезактивные гидроксильные радикалы, которые парализуют жизнедеятельность микроба.

Аэроионизация. Используется для оздоровления цехов предприятий, жилых помещений, а также в медицинской и ветеринарной практике. Аэроионы, несущие положительный или отрицательный заряд, возникают в результате искусственной или естественной ионизации воздуха. Наибольшее влияние на бактерии оказывают отрицательно заряженные ионы, они действуют уже в средних концентрациях ($5 \cdot 10^6$ в 1 см воздуха). Аэроионы положительные задерживают рост бактерий лишь в больших концентрациях (10^8). Сила действия ионов зависит от дозы - числа аэроионов на 1 см^3 воздуха, длительности экспозиции, расстояния от источника ионов.

Действие химических веществ

Понятие о химиотаксисе бактерий. *Химиотаксис* - своеобразная ответная реакция бактериальной клетки на проникающее в нее вещество. Различают положительный и отрицательный химиотаксис.

Если в каплю воды, содержащую подвижные бактерии, опустить один конец капилляра, наполненного раствором пептона, через несколько секунд у отверстия капилляра скопится большое количество бактерий. Такое явление названо положительным химиотаксисом. Может быть и обратное явление, когда бактерии уходят от диффундирующего в воду вещества. Такое явление названо отрицательным химиотаксисом.

В ничтожно малых концентрациях (0,007-0,0018 %) положительный химиотаксис вызывают пептон, минеральные соли, особенно фосфорнокислые. Обратное действие (отрицательный химиотаксис) оказывают свободные кислоты, щелочи и спирты. Иногда положительный химиотаксис. Наблюдается не только в отношении к питательным веществам, но и к явно ядовитым. Объясняют это явление тем, что бактерии, попав в зону соответствующей концентрации данного вещества, уже не могут свободно покинуть ее в силу раздражения, вызванного изменением концентрации.

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

При бактерицидном действии химический агент вызывает гибель клеток. Бактерицидное действие химических веществ имеет огромное практическое значение, так как этот факт учитывается при использовании химического вещества в качестве дезинфектанта.

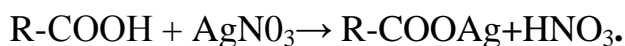
Бактерицидные химические вещества по действию на бактерии можно подразделить на поверхностно-активные вещества, красители, спирты, кислоты, щелочи, фенолы и их производные, соли тяжелых металлов, окислители и группу формальдегида.

Поверхностно-активные вещества изменяют энергетическое соотношение. Бактериальные клетки теряют отрицательный и приобретают положительный заряд, что обуславливает нарушение нормальной функции цитоплазматической мембраны. К таким веществам относят мыла, жирные кислоты, моющие средства, детергенты. Указанные средства повреждают клеточную стенку, но не проникают в клетку.

Красители обладают свойствами задерживать рост бактерий. К красителям с бактерицидными свойствами относят бриллиантовый зеленый (бриллиантгрюн), риванол, трипафлавин, акрифлавин, фуксин, метионин, обладающие сродством к нуклеиновым кислотам и нарушающие процессы клеточного деления.

Фенол, крезол и их производные первоначально повреждают клеточную стенку, а затем и белки клетки. Некоторые вещества этой группы подавляют функцию кофермента (дифосфо-пиримидин нуклеотида), участвующего в дегидрировании глюкозы и молочной кислоты.

Соли тяжелых металлов (свинец, медь, цинк, серебро, ртуть) вызывают коагуляцию белков клетки. При взаимодействии соли тяжелого металла с белком образуются альбуминат металла и свободная кислота:



Ряд металлов (серебро, медь, цинк, олово, свинец и др.) обладают олигодинамическим действием (бактерицидной способностью). Так,

например, посуда из серебра, посеребренные предметы, посеребренный песок при контакте их с водой сообщают ей бактерицидные свойства по отношению ко многим видам бактерий. Механизм олигодинамического действия заключается в том, что положительно заряженные ионы металлов адсорбируются отрицательно заряженной поверхностью бактерий и изменяют проницаемость их цитоплазматической мембраны, что приводит к гибели бактерий.

Окислители действуют на сульфгидрильные группы активных белков. К окислителям относятся хлор, поражающий дегидразы, гидролазы, амилазы, протеазы бактерий, хлорная известь, хлорамин, употребляемые в целях дезинфекции. Хорошим окислителем является йод в виде йодного раствора, который не только окисляет активные группы белков цитоплазмы бактерий, но и вызывает их денатурацию. Окисляющим свойством обладают перманганат калия, перекись водорода и другие вещества.

Спирты. Спирт в 70 %-ной концентрации обладает бактерицидной активностью в отношении белков микробной клетки, которые свертываются и выпадают на поверхность микроба и уменьшают проникновение спирта в глуболежащие слои бактерий. Бактерицидность спиртов зависит от их молекулярной массы в порядке ее возрастания: метиловый - этиловый - пропиловый - бутиловый - амиловый и т. д.

Кислоты и основания. Бактерицидное действие кислот и оснований прежде всего связано с изменением рН питательной среды.

Кислоты в концентрированных растворах коагулируют белки микробной клетки, изменяют концентрацию Н-ионов в растворах и их окисляющее действие. На практике применяются как средства уничтожения микробов на объектах окружающей среды (карболовая, серная, соляная, уксусная), для создания определенной зоны рН в микробиологических средах (НС1); при изготовлении и консервировании пищевых продуктов (уксусная, лимонная), так как позволяют создать реакцию среды (кислотность), неблагоприятную для развития гнилостных микроорганизмов.

Бактерицидность щелочей зависит от диссоциации и концентрации гидроксильных ОН-ионов. Наиболее часто в ветеринарной практике применяют NaOH (гидроокись натрия) и KOH (гидроокись калия), гашеную известь (кальция гидроокись), натрия карбонат (Na_2CO_3), натрия гидрокарбонат (сода). Бактерицидное действие проявляется при сравнительно невысокой концентрации щелочей: гибель вегетативных форм микроорганизмов наступает под влиянием 2-3 %-ного и спор бацилл – 4-5 %-ного растворов. Щелочи гидролизуют коллоидные системы, вследствие чего происходит гибель микробной клетки.

Формальдегид употребляют в виде 40 %-ного раствора (так называемый формалин). Его противомикробное действие объясняется тем, что формальдегид присоединяется к аминогруппам белков и вызывает их денатурацию.

Химические вещества (хлор, карболовая, серная кислоты, гидроокись натрия, фенолы, формальдегид) широко используют для дезинфекции и химической стерилизации.

Дезинфекция - уничтожение только патогенных микробов во внешней среде, а не всех микробов вообще, которые находятся на объекте. Оценка качества проведенной дезинфекции проводится бактериологическим методом. В качестве тест-микробов берут кишечную палочку (*E. coli*) как наиболее резистентного представителя неспорообразующих микробов или золотистый стафилококк (*Staph. aureus*) как наиболее резистентный среди кокковых микроорганизмов.

Действие биологических факторов

Действие биологических факторов проявляется прежде всего в антагонизме микробов, когда продукты жизнедеятельности одних микробов обуславливают гибель других. Антагонистические свойства наиболее выражены у актиномицетов, у споровых бацилл (*Bac. brevis*, *Bac. subtilis*, *Bac. mycoides*) и других микроорганизмов.

Антибиотики (от греч. *anti* - против, *bios* - жизнь). Представляют собой разновидность химиотерапевтических препаратов. Это химические вещества, выделяемые некоторыми микроорганизмами и подавляющие рост и развитие тех или иных микробов. Начало учения об антибиотиках было положено в 1929 г., когда английский ученый А. Флеминг доказал, что фильтрат бульонной культуры плесневого гриба *Penicillium notatum* обладает антибактериальными свойствами в отношении стафилококков и некоторых других грамположительных микроорганизмов. Однако извлечь пенициллин из культуральной жидкости плесневого гриба удалось лишь в 1940 г. группе английских химиков: Э. Чейн, Г. Флори и Э. Эбрахем. В СССР пенициллин был получен З. В. Ермольевой в 1942 г.

Открытие пенициллина послужило толчком для широких поисков антибиотических веществ. В настоящее время известно более 2000 антибиотических веществ, выделенных из различных источников.

По происхождению антибиотики можно разделить на четыре группы.

1. Антибиотики, выделенные из грибов. Грибы и актиномицеты являются наиболее активными продуцентами антибиотиков. Так, *Penicillium notatum* (А. Флеминг, 1929) и *Penicillium crustosum* (З. В. Ермольева, 1942) выделяют антибиотическое вещество - пенициллин, *Acinomycetes streptomycini* - стрептомицин, *Streptomyces aureofaciens* - биомицин (хлортетрациклин), *Streptomyces rimosus* - окситетрациклин (террамицин), *Streptomyces noursei* - нистатин.

2. Антибиотики, выделенные из бактерий. Группа антибиотиков бактериального происхождения менее обширна и имеет меньшее практическое значение, так как эффективность их значительно ниже, чем антибиотиков грибного и актиномицетного происхождения. Продуценты антибиотиков - разнообразные бактерии. В большинстве своем это сапрофиты, обитающие в почве и обладающие ярко выраженной

биохимической активностью. К ним относятся грамицидин, колицин, пиоционин, субтилиин, полимиксин и др. Большинство этих антибиотиков токсичны при парентеральном введении, поэтому применяются местно.

3. Антибиотики животного происхождения. Некоторые вещества, выделяемые животными тканями, способны избирательно поражать отдельные виды микробов. К ним относится эритрин, выделяемый из эритроцитов различных животных, экомлин, полученный из тканей рыб, лизоцим - полисахарид, полученный из яичного белка. Клетками некоторых тканей продуцируется интерферон, угнетающий жизнедеятельность многих возбудителей вирусных инфекций.

4: Антибиотики растительного происхождения и я. Фитонциды - ядовитые вещества, выделяемые растениями (лук, чеснок, хрен, горчица, алоэ, крапива, можжевельник, почки березы, листья черемухи и др.). Фитонциды открыты Б. Н. Токиным в 1928 г. Некоторые исследователи рассматривают их как антибиотики растительного происхождения. Это летучие вещества, обладающие антибактериальными свойствами в отношении многих микроорганизмов: сарцин, стафилококков, стрептококков, кишечной палочки, протей и др.

Часть фитонцидов выделены в чистом виде: *аллицин* получен из чеснока (*Allium sativum*), подавляет рост грамположительных и грамотрицательных бактерий; *рафанин* добыт из семян редиски (*Raphanus sativus*), действует на грамположительные и грамотрицательные бактерии в разведении 1:100; *иманин* получен из пронзеннолистного зверобоя (*Hypericum perforatum*), применяют при лечении гнойных процессов и тяжелых ожогов.

Единицы измерения противомикробной активности антибиотиков. Противомикробная активность антибиотиков измеряется тем наименьшим количеством препарата, которое оказывает антимикробное действие, и выражается в единицах действия (ЕД). В настоящее время единицы действия антибиотиков выражают в микрограммах сухого вещества. Так, за единицу пенициллина принимают 0,6 мкг чистой кристаллической соли, за единицу стрептомицина - 1 мкг чистого сухого препарата и т. д.

Методы определения активности антибиотиков основаны на подавлении роста чувствительного тест-микроба (золотистого стафилококка № 209 для пенициллина, *Bac. subtilis*, *E. coli* для стрептомицина) на чашках с плотными питательными средами (метод дисков) либо на жидких питательных средах (метод серийных разведений).

Характерным свойством антибиотиков является избирательность их действия на микробную клетку. В отличие от химических ядов (сулема, фенол, щелочи, кислоты, формалин и т. п.), действующих на любую живую цитоплазму, антибиотики поражают лишь клетки микроорганизмов. Каждый антибиотик обладает определенным антимикробным спектром действия: существуют антибиотики, действующие на немногие виды микроорганизмов (пенициллин, грамицидин), и антибиотики, имеющие широкий спектр антимикробного действия (левомицин, тетрациклин и др.).

По механизму действия на микробов антибиотики делятся на *бактерицидные*, убивающие бактерий (пенициллин, стрептомицин, грамицидин), и *бактериостатические*, задерживающие рост микробов (все прочие антибиотики).

По действию антибиотиков на микроорганизмы их можно разделить на две группы: нарушающие синтез клеточной стенки и ее мембран; нарушающие синтез ДНК, РНК и белка. Например, пенициллин, подавляет синтез полимеров, входящих в состав клеточной стенки, изменяет обмен белков и нуклеопротеидов, стрептомицин и другие антибиотики этого класса нарушают проницаемость клеточных мембран. Вступая в контакт с ДНК и РНК, они нарушают считывание генетического кода в процессе синтеза белка.

Устойчивость микробов к антибиотикам. Антибиотик наносит лишь первое повреждение возбудителю заболевания. Окончательная ликвидация инфекционного процесса осуществляется микроорганизмом, мобилизующим защитные силы на борьбу с возбудителем болезни.

Прежде чем применять тот или иной антибиотик, врач должен хорошо изучить его свойства, знать, при каких заболеваниях он используется. В противном случае могут возникнуть тяжелые последствия - токсикозы, раздражение желудочно-кишечного тракта, угнетение функции кроветворных органов и т. п. Не следует слишком увлекаться антибиотикотерапией, так как неумеренный прием этих веществ может вызвать развитие суперинфекций - заболеваний, связанных с нарушением нормальных взаимоотношений между обитателями животного организма. В таких случаях угнетается не только возбудитель какой-либо инфекции, но и нормальная микрофлора организма. Зато начинает усиленно размножаться нечувствительная к антибиотику микрофлора, вызывая дисбактериоз, кандидозы, колиты и др. Ко многим антибиотикам развивается аллергия.

Целый ряд микробов под влиянием антибиотиков, особенно при неправильном их применении, утрачивают чувствительность к тому или иному антибиотику и образуют антибиотикорезистентные формы. У таких микробов изменяются ферментативные свойства и антигенная структура, что приводит к усилению вирулентности (например, стафилококки). В таких случаях применение антибиотиков с лечебной целью становится бессмысленным.

С целью предотвращения возникновения резистентных микробов при лечении необходимо комбинировать антибиотики или использовать их в сочетании с другими химическими средствами (рис. 8).

Бактериофаги. Бактериофагами называют вирусы бактерий. Явление бактериофаги изучали Н. Ф. Гамалея (1898), Ф. Творт (1915), Ф. д'Эрелль (1917). В результате агент, разрушающий бактерии, был назван бактериофагом (от греч. *phagos* - пожирающий).

Бактериофаг способен инфицировать бактериальную клетку, репродуцироваться в ней, образуя многочисленное потомство, и вызывать ее

лизис, сопровождающийся выходом фаговых частиц в среду обитания бактерий.

Бактериофаги широко распространены в почве, воде, экскрементах больных и здоровых животных, человека и обнаружены более чем у 100 видов бактерий (С. Я. Гайдамович, 1982).

Хозяевами бактериофагов являются эшерихии и сальмонеллы, стафилококки и стрептококки, микобактерии, листерии, коринебактерии и другие микроорганизмы.

Основные свойства и механизм действия на бактериальную клетку. Наиболее детально изучена структура фагов *E. coli*. Фаг состоит из головки и отростка - это основные части его. Белковая оболочка головки называется капсидом, морфологические субъединицы капсида получили название капсомеров. Капсид содержит молекулу ДНК или РНК. Различают четыре основных класса капсидов ДНК-содержащих фагов: спиральные икосаэдрические, сложные без оболочки, сложные с оболочкой (рис. 9). Размеры фагов колеблются от 20 до 200 нм. Средний размер головки 60-100 нм, длина отростка 100-200 нм. В химическом отношении фаги представлены нуклеиновыми кислотами и небольшим количеством белков, в состав которых входят полиамины: спермин и путресцин, кислоторастворимый полипептид, содержащий аспарагиновую и глутаминовую кислоты, лизин и кислотонерастворимый белок.

Антигенная структура фагов представлена биополимерами (белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты), которые способны при введении в организм или в культуре лимфоидных клеток вызывать образование антител. Содержат не менее четырех антигенов.

Иммунологическая активность фага обусловлена специфическими белками, не имеющими ничего общего с белками поражаемого микроба. Получены иммунные антифаговые сыворотки, с помощью которых в реакции нейтрализации определяют соответствующие фаги.

Взаимодействие фага с бактериальной клеткой определяется:

- 1) наличием рецепторов, на которых может фиксироваться фаг;
- 2) наличием в клеточной оболочке и цитоплазме ферментов, способствующих проникновению нуклеиновой кислоты, вещества, из которого строятся гены;
- 3) наличием в клетке ферментов, материалов и энергетических ресурсов, обеспечивающих синтез компонентов фага и формирование частиц фага (вирионов). В зависимости от этого процесс взаимодействия фага с клеткой протекает по типу продуктивной инфекции, или лизогении. В зависимости от этого различают вирулентные и умеренные фаги.

Вирулентные фаги при проникновении в клетку бактерий размножаются в ней и вызывают лизис;

умеренные фаги не вызывают лизиса, а остаются в состоянии лизогении.

По степени специфичности фаги разделяют на три группы:

- **полифаги** - лизируют родственные бактерии,

- **монофаги** - бактерии одного вида,
- **фаговары** - только определенные варианты данного вида бактерий.

Процесс взаимодействия фага с клеткой состоит из последовательной смены отдельных стадий.

Первая стадия - адсорбция фага и закрепление его на бактериальной клетке, клеточной стенке, в которой имеются специфические рецепторные участки (белковые и липидные). Фаг узнает их концевыми нитями своих отростков и прочно прикрепляется.

Вторая стадия - проникновение. После адсорбции ДНК-фага через дистальный конец отростка продвигается сквозь рыхлые слои клеточной стенки, которые разрушаются под действием фагового лизоцима.

Третья стадия - биосинтез фаговой нуклеиновой кислоты РНК и белков капсида, которые участвуют в биосинтезе фаговой ДНК. Латентный (скрытый) период продолжается в пределах 15 мин.

Четвертая стадия - морфогенез фага. Этот процесс заключается в заполнении фаговой нуклеиновой кислоты пустотелых фаговых капсид и формированием зрелых вирионов (частиц фага).

Пятая стадия - выход вирусных (фаговых) частиц из клетки. Он происходит путем лизиса зараженных бактерий, за счет фагового лизоцима, накапливающегося в процессе репродукции фага. Количество зрелых вирионов у разных клеток различно - от единиц до нескольких тысяч. Вирионы высвобождаются и вновь внедряются в еще не зараженные бактерии. Процесс вновь повторяется. Схема развития вирулентного фага в восприимчивой бактериальной клетке показана на рисунке 10.

При контакте умеренного бактериофага с микробной клеткой последняя не лизируется и становится носителем бактериофага. Это явление получило название **лизогении**, а бактериальные культуры, обладающие этим свойством, называются **лизогенными**. Различают монолизогенность и полилизогенность.

Бактериальная культура, образующая один вид фага, является **монолизогенной**. Бактериальная культура, образующая несколько видов фагов, называется **полилизогенной**. Фаг, способный лизогенировать клетку-хозяина, называется **умеренным**. При лизогении бактериофаг находится в состоянии **профага**, при котором бактериальная клетка не погибает. Профаг представляет собой геном вируса, ассоциированный с бактериальной хромосомой. Профаг в отличие от генома вирулентного фага воспроизводится как часть бактериальной ДНК и синхронно с ней реплицируется.

Носительство умеренных фагов в форме профагов имеет широкое распространение у сальмонелл (В.- Я. Ганюшкин, 1988).

Изменение свойств бактериальной культуры под влиянием фага получило название конверсии. Данный феномен заключается в приобретении лизогенными бактериями способности продуцировать токсины, изменять морфологию бактерий или антигенные свойства их. Наиболее изучена

фаговая конверсия при образовании соматических антигенов у штаммов *Salmonella*, принадлежащих к группе E (В. Я. Ганюшкин, 1988).

Методы выделения и титрования фагов. Для выделения фагов обычно используют испражнения животных, гной ран, сточные воды, молоко, старые культуры и другие субстраты. Суспензии фильтруют через мелкопористые фильтры. Затем фильтрат вносят в соответствующие молодые культуры бактерий. При наличии фага в испытуемом материале бактерии растворяются, жидкость просветляется, а на поверхности агара на месте нанесения фильтратов образуются «стерильные пятна».

Бактериофаг проверяют на чистоту, специфичность, а также определяют его титр. **Титром бактериофага** называется то его наибольшее разведение, которое способно вызывать растворение соответствующих бактерий.

Применение бактериофага. В связи с высоким специфическим действием бактериофаги нашли широкое и разнообразное применение в ветеринарной практике. Их применяют для терапии и профилактики целого ряда инфекционных болезней (гнойные и анаэробные инфекции, сальмонеллез и колибактериоз молодняка сельскохозяйственных животных, пуллороз цыплят и др.).

В микробиологической практике бактериофаги используют для дифференциации бактериальных культур (сибиреязвенных, стафилококковых, рожистых, сальмонеллезных, колибактериозных и др.).

С помощью фага возможна также индикация патогенных бактерий во внешней среде (вода, выделения животных, пищевые продукты и другие субстраты) с помощью реакции нарастания титра фага.

Биологическая промышленность выпускает в жидкой форме колигертнерфаг против сальмонеллеза и колибактериоза телят, сибиреязвенные бактериофаги, фаг-гамму, фаг ВИЭВ и др.

Стерилизация, дезинфекция и антисептика

Для уничтожения микробов (бактерий, вирусов, грибов и простейших) на различных предметах и в материалах, используемых в медицине, в пищевой промышленности и в быту, применяют два способа: стерилизацию и дезинфекцию.

Стерилизация (от лат. *sterilis* - бесплодный) предполагает полную инактивацию микробов в объектах, подвергающихся обработке.

Существует **три основных метода** стерилизации:

1. тепловой,
2. лучевой,
3. химической.

Тепловая стерилизация основана на чувствительности микробов к высокой температуре. При 60 °С и наличии воды происходит денатурация белка, деградация нуклеиновых кислот, липидов, вследствие чего вегетативные формы микробов погибают. Споры, содержащие очень

большое количество воды в связанном состоянии и обладающие плотными оболочками, инактивируются при 160-170 °С.

Для тепловой стерилизации применяют, в основном, сухой жар и пар под давлением.

Стерилизацию **сухим жаром** осуществляют в воздушных стерилизаторах (прежнее название - «сухожаровые шкафы или печи Пастера»). **Воздушный стерилизатор** представляет собой металлический плотно закрывающийся шкаф, нагревающийся с помощью электричества и снабженный термометром. Обеззараживание материала в нем производят, как правило, при 160 °С в течение 120 мин. Однако возможны и другие режимы: 200 °С - 30 мин, 180 °С - 40 мин.

Стерилизуют сухим жаром лабораторную посуду и другие изделия из стекла, инструменты, силиконовую резину, т. е. объекты, которые не теряют своих качеств при высокой температуре.

Большая часть стерилизуемых предметов не выдерживает подобной обработки, и поэтому их обеззараживают в паровых стерилизаторах.

Обработка паром под давлением в паровых стерилизаторах (старое название - «автоклавы») является наиболее универсальным методом стерилизации.

Паровой стерилизатор (существует множество его модификаций) - металлический цилиндр с прочными стенками, герметически закрывающийся, состоящий из водопаровой и стерилизующей камер. Аппарат снабжен манометром, термометром и другими контрольно-измерительными приборами. В автоклаве создается повышенное давление, что приводит к увеличению температуры кипения. Поскольку кроме высокой температуры на микробы оказывает воздействие и пар, споры погибают уже при 120 °С. Наиболее распространенный режим работы парового стерилизатора: 2 атм - 121 °С - 15-20 мин. Время стерилизации уменьшается при повышении атмосферного давления, а следовательно, и температуры кипения (136 °С - 5 мин). Микробы погибают за несколько секунд, но обработку материала производят в течение большего времени, так как, во-первых, высокая температура должна быть и внутри стерилизуемого материала и, во-вторых, существует так называемое поле безопасности (рассчитанное на небольшую неисправность автоклава).

Стерилизуют в автоклаве большую часть предметов: перевязочный материал, белье, коррозионно-устойчивые металлические инструменты, питательные среды, растворы, инфекционный материал и т. д.

Эффективность стерилизации в паровом стерилизаторе зависит от правильного выбора упаковки, соблюдения правил загрузки для свободного прохождения пара (например, перевязочный материал укладывают в камеру параллельно движению пара), плотности загрузки камеры и других факторов.

Одной из разновидностей тепловой стерилизации является **дробная стерилизация**, которую применяют для обработки материалов, не выдерживающих температуру выше 100 °С, например, для стерилизации питательных сред с углеводами, желатина. Их нагревают в водяной бане при

80 °C в течение 30-60 мин, в результате чего вегетативные формы погибают. Процедуру повторяют три дня подряд, в промежутках между манипуляциями питательные среды выдерживают в термостате, что способствует прорастанию спор. Иногда эту процедуру производят в автоклаве при давлении 0,5 атм.

В настоящее время применяют **еще один метод тепловой стерилизации**, предназначенный специально для молока - **ультравысоко-температурный (УВТ)**: молоко обрабатывают в течение нескольких секунд при 130-150 °C.

Тепловая стерилизация - наиболее надежный, экологически безопасный, дешевый и хорошо контролируемый метод. Однако его невозможно применять тогда, когда предметы повреждаются от высокой температуры. В этих случаях прибегают к другим методам.

Химическая стерилизация предполагает использование токсичных газов: оксида этилена, смеси ОБ (смеси оксида этилена и бромистого метила в весовом соотношении 1:2,5) и формальдегида. Эти вещества являются алкилирующими агентами, их способность в присутствии воды инактивировать активные группы в ферментах, других белках, ДНК и РНК приводит к гибели микроорганизмов.

Стерилизация газами осуществляется в присутствии пара при температуре от 18 до 80 °C в специальных камерах. В больницах используют формальдегид, в промышленных условиях - оксид этилена и смесь ОБ.

Перед химической стерилизацией все изделия, подлежащие обработке, должны быть высушены.

Этот вид стерилизации небезопасен для персонала, для окружающей среды и для пациентов, пользующихся простерилизованными предметами (большинство стерилизующих агентов остается на предметах).

Однако существуют объекты, которые могут быть повреждены нагреванием, например, оптические приборы, радио- и электронная аппаратура, предметы из нетермостойких полимеров, питательные среды с белком и т. п., для которых пригодна только химическая стерилизация. Например, космические корабли и спутники, укомплектованные точной аппаратурой, для их деконтаминации обезвреживают газовой смесью (оксид этилена и бромистого метила).

В последнее время в связи с широким распространением в медицинской практике изделий из термолабильных материалов, снабженных оптическими устройствами, например эндоскопов, стали применять **обезвреживание с помощью химических растворов**. После очистки и дезинфекции прибор помещают на определенное время (от 45 до 60 мин) в стерилизующий раствор, затем прибор должен быть отмыт стерильной водой. Для стерилизации и отмытки используют стерильные емкости с крышками. Простерилизованное и' отмытое от стерилизующего раствора изделие высушивают стерильными салфетками и помещают в стерильную емкость. Все манипуляции проводят в асептических условиях и в стерильных перчатках. Хранят эти изделия не более 3 суток.

Лучевая стерилизация осуществляется либо с помощью гамма-излучения, либо с помощью ускоренных электронов.

Источником гамма-излучения, получаемого в специальных гамма-установках, являются радиоактивные изотопы, например ^{60}Co , ^{137}Cs . Для получения электронного излучения применяют ускорители электронов (с высоким уровнем энергии - 5-10 MeV).

Гибель микробов под действием гамма-лучей и ускоренных электронов происходит прежде всего в результате повреждения нуклеиновых кислот. Причем микробы более устойчивы к облучению, чем многоклеточные организмы.

Лучевая стерилизация является альтернативой газовой стерилизации в промышленных условиях, и применяют ее также в тех случаях, когда стерилизуемые предметы не выдерживают высокой температуры. Лучевая стерилизация позволяет обрабатывать сразу большое количество предметов (например, одноразовых шприцев, систем для переливания крови). Благодаря возможности широкомасштабной стерилизации, применение этого метода вполне оправданно, несмотря на его экологическую опасность и неэкономичность.

Еще одним способом стерилизации является **фильтрование**. Фильтрование с помощью различных фильтров (керамических, асбестовых, стеклянных), а в особенности мембранных ультрафильтров из коллоидных растворов нитроцеллюлозы и других веществ позволяет освободить жидкости (сыворотку крови, лекарства) от бактерий, грибов, простейших и даже вирусов. Для ускорения процесса фильтрации обычно создают повышенное давление в емкости с фильтруемой жидкостью или пониженное давление в емкости с фильтратом.

В настоящее время все более широкое применение находят **современные методы стерилизации**, созданные на основе новых технологий, с использованием плазмы, озона.

Микробиологический контроль объектов, подвергшихся стерилизации, в повседневной практике не производится. Его заменяет косвенный контроль - контроль работы стерилизаторов, который осуществляется несколькими способами. **Во-первых**, персонал должен строго соблюдать и документировать установленный режим стерилизации, который обеспечивает гибель микробов. **Во-вторых**, косвенно о поддержании определенной температуры можно судить по изменению окраски химических индикаторов (либо индикаторных бумажек, либо порошков, жидкостей - бензойной кислоты, мочевины, запаянных в ампулы), которые помещают на поверхности и в глубине стерилизуемого объекта. **В-третьих**, должен регулярно проводиться технический контроль аппаратуры соответствующей службой. **В-четвертых**, три раза в году осуществляют биологический контроль, помещая внутрь стерилизуемых предметов биотесты, приготовленные из термоустойчивых бацилл *Bac. stearothermophilus* ВКМ-718.

Для проведения **микробиологического контроля** производят посев кусочков материала, смывов с предметов, подвергшихся стерилизации, на среды, позволяющие обнаружить аэробные и анаэробные бактерии, грибы (сахарный бульон, тиогликолевую среду, среду Сабуро). Отсутствие роста после 14 дней инкубации в термостате свидетельствует о стерильности предмета. Более тщательный контроль стерильности осуществляют в промышленных условиях, отбирая случайным методом некоторое количество образцов.

После процедуры стерилизации должна сохраняться стерильность, которую поддерживают с помощью упаковки: полимерной пленки, бумаги, фольги, биксов, металлических пеналов и др.

Существует общий стандарт для всех видов стерилизации, принятый Европейской Фармакопеей в 1983 г.: после завершения стерилизации на лечебном материале может оставаться некоторое количество жизнеспособных микроорганизмов - 1 из 10^6 .

Дезинфекция (от франц. приставки *des*, обозначающей удаление, уничтожение инфекционного начала) - процедура, предусматривающая обработку загрязненного микробами предмета с целью их уничтожения до такой степени, чтобы они не смогли вызвать инфекцию при использовании данного предмета. Как правило, при дезинфекции погибает большая часть микробов (в том числе все патогенные), однако споры и некоторые резистентные вирусы могут остаться в жизнеспособном состоянии.

Лучший способ обеззараживания считается стерилизация. Однако, если отсутствует возможность подвергнуть предмет стерилизации, проводится дезинфекция. Например, нельзя простерилизовать бокс, в котором ведутся работы с заразным материалом, операционный стол, руки хирурга или оптиковолоконные микроскопы.

После дезинфекции, в отличие от стерилизации, нет необходимости защищать продезинфицированный материал от попадания микробов извне. До стерилизации предмет необходимо тщательно отчистить от грязи, крови, химических веществ (в том числе и лекарств) и вымыть, чтобы сократить количество микробов на нем. Дезинфекция нередко выполняется перед процедурой чистки для обеспечения безопасности медперсонала.

Различают **три основных метода дезинфекции**:

1. тепловой,
2. химический,
3. УФ-облучение.

Выбор того или иного метода также зависит от дезинфицируемого материала.

Тепловая дезинфекция. Очень эффективным является действие горячей воды и насыщенного пара. Рекомендуются следующее время воздействия: при 80°C - 10 мин, при 85°C - 3 мин, при 90°C - 1 мин.

При этом режиме погибают все вегетативные формы бактерий и большинство вирусов. Температура 100 °С в течение 5 мин убивает все вегетативные формы бактерий и все вирусы.

При добавлении в воду 2 % натрия гидрокарбоната (NaHCO₃) погибают и споры. Кроме того, добавление соды имеет дополнительные преимущества: сода растворяет белки и жиры, которые могут находиться на поверхности предмета, предупреждает коррозию инструментов и оседание на них кальция. Подобным образом можно обрабатывать инструменты, иглы, шприцы и т. д.

Более удобным является применение **автоматических моечных машин**, в которых предметы сначала промываются в холодной воде, затем - в теплой с детергентом, далее - в чистой и, наконец, дезинфицируются в дистиллированной воде при 90 °С.

Обычные процессы стирки белья, приготовление пищи и кипячение питьевой воды являются примером использования дезинфекции в быту.

Для дезинфекции применяют также сухое тепло, например, прокаливание.

Тепловая дезинфекция - это единственный метод, который не вызывает загрязнения окружающей среды; кроме того, он является наиболее эффективным и дешевым.

Разновидностью тепловой дезинфекции является пастеризация - метод, созданный Л. Пастером и применяемый для обработки в основном молока, а также соков, вина и пива. При используемом обычно режиме - 60-70 °С в течение 20-30 мин - погибает большинство вегетативных форм бактерий (особенно важно уничтожение бруцелл и *Mycobacterium bovis*, которые могут находиться в молоке), но сохраняется часть энтерококков, молочнокислых бактерий и споры. Поэтому пастеризованное молоко помещают на холод для предотвращения и прорастания спор и размножения бактерий.

Химическая дезинфекция проводится с помощью различных дезинфицирующих веществ. Дезинфектанты действуют, например, растворяя липиды клеточных оболочек (детергенты) или разрушая белки и нуклеиновые кислоты (денатуранты, оксиданты). Активность каждого из дезинфектантов неодинакова для различных микроорганизмов и зависит от температуры, рН и прочих условий.

В качестве контрольных микроорганизмов для изучения действия дезинфектантов используют *S. typhi* и *S. aureus*.

Обеззараживанию с помощью данного метода подлежат, например, поверхность операционного стола, стены процедурного кабинета, кожа, некоторые инструменты - все то, что невозможно обработать теплом. Еще одним примером химической дезинфекции является хлорирование воды.

Использование большинства дезинфицирующих веществ опасно для медперсонала, они загрязняют окружающую среду, многие из них дорогостоящи.

Ультрафиолетовое облучение (лучи с длиной волны 200-400 нм) производится с помощью специальных бактерицидных ламп (настенных, потолочных, передвижных и др.) для обеззараживания воздуха, различных поверхностей в операционных, перевязочных, микробиологических лабораториях, предприятиях пищевой промышленности и т. д. Действие ультрафиолетовых лучей приводит к разрушению ДНК микробов в результате образования тиминового димеров.

Очень незначительна роль **механической дезинфекции**: проветривания, вентиляции, обработки пылесосом и т. п.

Различают **профилактическую дезинфекцию** в эпидемическом очаге, которая осуществляется с целью предупреждения распространения различных болезней. При возникновении эпидемического очага проводят **текущую** (во время вспышки) и **заключительную** (после ее окончания) **дезинфекцию**; подобные процедуры проводятся как в медицинских учреждениях, так и за их пределами.

Асептика и антисептика

Для профилактики внутрибольничных, и в особенности хирургических, инфекций применяют асептику и антисептику.

Асептика, основоположником которой является Д. Листер (1867), - это комплекс мер, направленных на предупреждение попадания возбудителя инфекции в рану, органы больного при операциях, лечебных и диагностических процедурах. Методы асептики применяют для

борьбы с экзогенной инфекцией, источниками которой являются больные и бактерионосители.

Асептика включает:

1. стерилизацию и сохранение стерильности инструментов, перевязочного материала, операционного белья, перчаток и всего, что приходит в соприкосновение с раной; дезинфекцию рук хирурга, операционного поля, аппаратуры, операционной и других помещений, применение специальной одежды, масок.

2. К мерам асептики относится также планировка операционных (этаж, боксирование, вентиляция, кондиционирование воздуха и т. п.).

Методы асептики находят также применение в микробиологических производствах, на предприятиях пищевой промышленности.

Антисептика - совокупность мер, направленных на уничтожение микробов в ране, патологическом очаге или организме в целом, на предупреждение или ликвидацию воспалительного процесса.

ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Микроорганизмы распространены повсюду. Они заселяют почву, воду, воздух, растения, организмы животных и людей- *экологические среды обитания микробов.*

Выделяют свободноживущие и паразитические микроорганизмы. Всюду, где есть хоть какие-то источники энергии, углерода, азота, кислорода и водорода (кирпичиков всего живого), обязательно встречаются микроорганизмы, различающиеся по своим физиологическим потребностям и занимающих свои *экологические ниши*. Титаническая роль микроорганизмов в круговороте веществ в природе имеет исключительное значение для поддержания *динамического равновесия биосферы*.

Микроорганизмы в экологических нишах сосуществуют в виде сложных ассоциаций- *биоценозов* с различными типами взаимоотношений, в конечном счете обеспечивающих сосуществование многочисленных видов прокариот и различных царств жизни.

Все типы взаимоотношений микроорганизмов объединяются понятием *симбиоз*. Он может быть *антагонистическим* и *синэргическим*.

Роль микроорганизмов в круговороте веществ в природе.

Под круговоротом веществ в природе понимают циклы превращения химических элементов, из которых построены живые существа, происходящие вследствие разнообразия и гибкости метаболизма микроорганизмов.

Наибольшее значение для всего живого имеет обмен (кругооборот) углерода, кислорода, водорода, азота, серы, фосфора и железа. Этапы кругооборота различных химических элементов осуществляется микроорганизмами разных групп. Непрерывное существование каждой группы зависит от химических превращений элементов, осуществляемых другими группами микроорганизмов. Жизнь на Земле непрерывна, поскольку все основные элементы жизни подвергаются циклическим превращениям, в значительной степени определяемых микроорганизмами.

Микрофлора почвы

В почве живут и развиваются самые разнообразные микроорганизмы: амёбы, инфузории, грибы, водоросли, актиномицеты и бактерии. Взаимоотношение микроорганизмов со средой их обитания изучает специальная наука - *экология* (греч. *oikos* - жилище, *logos* - понятие, учение).

Из структурных частей почвы для микробиологии особый интерес представляет ее органическое вещество - гумус, состоящий из остатков животных и растительных организмов и обитающих в почве микробов. Поверхностный слой почвы беднее микробами, так как на них вредно воздействуют факторы внешней среды: высушивание, ультрафиолетовые лучи, солнечный свет, повышенная температура и др. Наибольшее количество микроорганизмов находится на глубине 5-15 см, меньше на глубине 20-30 и еще меньше на глубине 30-40 см. Почвы, богатые бактериями, биологически более активны. Между плодородием почвы и содержанием в ней микроорганизмов имеется определенная зависимость. Подсчеты показали, что на каждый гектар малоплодородной почвы приходится 2,5-3 т микробной массы, высокоплодородной - до 16 т. Число микроорганизмов в 1 г почвы может колебаться от 1-3» 10⁶ до 20-25«10⁹.

Наиболее богаты микрофлорой возделываемые (культурные) почвы; бедны песчаные, горные и почвы, лишенные растительности; содержание их в почве увеличивается с севера на юг. Цвет и запах почвы зависят также от состава микроорганизмов. Запах почве придают определенные виды актиномицетов. К типичным почвенным бактериям относятся *Bac. subtilis*, *Bac. mycoides*, *Bac. mesentericus*, *Bac. megatherium*, *Cl. tetani*, *Cl. perf ringens*, *Cl. oedomaticus*, *Cl. histolyticus*, *Cl. botulinum*, *Cl. chauvoei*, а также термофильные, пигментные, непигментные и другие микроорганизмы, составляющие иногда 80-90 % всей микрофлоры почвы.

В ряде случаев почва представляет резервуар для некоторых патогенных микробов, попадающих с выделениями больных животных или трупами. Длительность выживаемости в почве патогенных бактерий зависит от их биологических свойств и условий среды обитания. Наиболее длительно живут спорообразующие микробы - возбудители столбняка, злокачественного отека, ботулизма; споры бацилл сибирской язвы могут сохраняться на протяжении десятилетий. При благоприятных условиях микробы в почве могут не только выживать, но и долго (недели, месяцы и даже годы) сохранять вирулентные свойства.

Для общей оценки санитарного состояния почвы основное значение имеет наличие *E. coli*, так как сроки выживания кишечной палочки приблизительно равны срокам выживания других патогенных представителей. С этой же целью проводят индикацию *Str. faecalis*, *Cl. perfringens*, *Bact. termophilus*.

Микрофлора воды

Изучением водных сообществ занимается гидробиология. Возрастающий дефицит пресной воды на Земле заставляет обратить серьезное внимание на процессы формирования воды в водоеме и переработку водными микроорганизмами поступающих в водоем загрязнений. Вода - естественная среда обитания микробов, основная масса которых поступает из почвы, воздуха с оседающей пылью, с отбросами, стоками, мочой и т. д. Особенно много микроорганизмов в открытых водоемах и реках, нередко встречаются они в илистых отложениях океанов, морей, болот, минеральных водах. Их находят как в поверхностных слоях, так и на глубине до 10 тыс. м.

Качественный состав обитающих в воде микроорганизмов зависит в основном от самой воды, поступления в нее сточных и промышленных отходов. К постоянно живущим в воде микроорганизмам относятся *Azotobacter*, *Nitrobacter*, *Micrococcus roseus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bact. aquatilis*, *Proteus vulgaris*, *Spirillum* и др. Кроме сапрофитов в воде могут быть возбудители инфекционных болезней животных и человека.

Определить конкретного возбудителя сложно, поэтому санитарную оценку воды дают по наличию в ней кишечной палочки (*E. coli*). Кроме того, определяют бродильный титр, микробное число, коли-титр и коли-индекс

воды, титр фекального стрептококка (*Str. faecalis*), который является постоянным обитателем кишечника человека и животных.

Для бактериологического исследования отбирают 400-500 мл воды в стерильную бутылку, которую наполняют на 1 л объема и закрывают стерильной пробкой. Из открытых водоемов пробы воды берут на глубине 10-15 см от поверхности, а из мелких - на уровне 10-15 см от дна. Из водопровода предварительно в течение 10 мин спускают воду, обжигают кран, а затем берут пробу. Пробы воды доставляют в лабораторию не позднее чем через 3 ч после взятия.

Бродильный титр - наименьший объем воды, при посеве которой на глюкозную среду обнаруживается газообразование.

Общее микробное число устанавливают по количеству микроорганизмов, содержащихся в 1 мл воды. Водопроводная вода считается хорошей, если общее число микробов в 1 мл равно 100, сомнительной - 100-150, загрязненной - 500 микробов и более. В воде колодцев и открытых водоемов в 1 мл не должно быть более 1 тыс. микробов.

Степень биологического загрязнения воды оценивают по коли-титру и коли-индексу.

Коли-титром называется наименьший объем воды в миллилитрах или сухого вещества в граммах, в котором обнаруживается хотя бы одна *E.coli*. Бродильный титр соответствует коли-титру в том случае, если сбраживание глюкозы вызывает сама *E.coli*, а не другие микроорганизмы.

Коли-индексом называется число кишечных палочек, обнаруженных в 1 л воды.

По существующим нормативам вода считается качественной, если коли-индекс ее не более 3, а коли-титр не менее 300. Вода шахтных колодцев должна иметь коли-индекс не более 10, а коли-титр не менее 100. Для перевода коли-титра в коли-индекс 1000 делят на показатель коли-титра, а для перевода коли-индекса в коли-титр 1000 делят на число, выражающее коли-индекс.

Микрофлора воздуха

Микрофлора воздуха зависит от микрофлоры почвы и воды, откуда они вместе с пылью и капельками влаги увлекаются в атмосферу. Воздух является неблагоприятной средой для размножения микроорганизмов. Отсутствие питательных веществ, солнечные лучи и высушивание обуславливают быструю гибель микроорганизмов в воздухе. Вследствие этого микрофлора воздуха менее обильна, чем микрофлора почвы и воды.

Состав микробов воздуха весьма разнообразен. В воздухе часто встречаются пигментные сапрофитные бактерии (микрококки, сарцины), споровые (сенная, картофельная и др.), палочки, актиномицеты, плесневые, дрожжевые грибы и др. Наряду с сапрофитами в воздухе встречаются условно-патогенные микроорганизмы, споры грибов из родов *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*.

В животноводческих помещениях аэрозоли возникают при кашле, отфыркивании, быстром перемещении животных, во время раздачи, особенно грубых кормов, а также при чиханье кашле, разговоре обслуживающего персонала. Доказано, что в 1 м³ воздуха животноводческих помещений содержится до 2 млн, иногда более микробных тел, в том числе и патогенных. Степень обсемененности воздуха микроорганизмами зависит от вентиляции, скученности животных, характера помещений и способа содержания животных, величины фронта кормления и других факторов. В плохо вентилируемых помещениях число микробов в 1 м воздуха в 5-6 раз выше, чем в хорошо вентилируемых.

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

Санитарное состояние воздуха оценивается по **микробному числу** - количеству микроорганизмов, обнаруженных в 1 м атмосферного воздуха, а в помещениях для животных (коровниках, свинарниках, птичниках, крольчатниках), мясо- и птицекомбинатов - по микробному числу и наличию в них санитарно-показательных микробов: *Staph. aureus*, *Str. haemoliticus*, *E. coli*.

Бактериологическое исследование воздуха осуществляется с использованием седиментационных, аспирационно-фильтрационных (сорбционных) методов, основанных на осаждении микроорганизмов из воздуха на поверхности твердых питательных сред или задержке их в жидкой среде путем сифонирования и барботаж. Наиболее простым, но менее точным является метод самопроизвольного осаждения микроорганизмов из воздуха на чашки Петри с мясо-пептонным агаром (метод Р. Коха, 1881). Бактериологические чашки с МПА оставляют открытыми в разных точках помещения на 5-10 мин, затем их закрывают и переносят в термостат с температурой 37-38 °С на 48 ч для получения колоний. Принято считать, что на площадь 100 см агара оседает за 5 мин приблизительно столько микробов, сколько их содержится в 10 л воздуха.

Для более точного исследования микробов воздуха применяют специальные аппараты: бактериоуловитель Речменского, аппараты Кротова, Киктенко и др. Метод Кротова основан на использовании ударного действия воздушной струи на питательную среду в чашках Петри. С этой целью используют специальный прибор, состоящий из трех частей: прибора для отбора воздуха, микроманометра и электрической части. Сущность действия его заключается в том, что при работе электромотора вращается диск с поставленной на него чашкой Петри; центробежный вентилятор засасывает через клиновидную щель в крышке исследуемый воздух, который ударяется в поверхность МПА, оставляя на нем микроорганизмы. За 1 мин через прибор может засасываться от 25 до 50 л воздуха.

Бактериоуловитель Речменского состоит из стеклянного цилиндра с резервуаром, содержащим стерильную жидкость (физиологический раствор, бульон и др.). При просасывании воздуха через прибор происходит подсосывание воздуха с образованием аэрозоля. Капли жидкости оседают на внутренних стенках прибора и вновь стекают в резервуар (приемник). Обсемененную таким образом жидкость высевают на обычные или элективные питательные среды и производят подсчет выросших колоний в определенном объеме исследуемого воздуха.

При необходимости идентифицировать микробы или вирусы используют специальные методы бактериологического и вирусологического исследований. Разрабатываются и внедряются в практику ускоренные методы обнаружения микробов в воздухе с помощью мембранных фильтров, каскадных импакторов, фильтров Петрянова «Микрофил» и др.

Допустимые санитарно-бактериологические показатели для воздуха животноводческих помещений не должны превышать 500-1000 бактерий в 1 м.

Микрофлора кормов

Эпифитная микрофлора. Микрофлору, находящуюся на поверхности растений, называют эпифитной (поверхностной). Как правило, эта травяная палочка *Bact. herbicola*, занимающая около 40 % всей эпифитной микрофлоры, молочнокислые стрептококки и палочки, сенная и картофельная бациллы, флюоресцирующие бактерии, протей, сарцины, актиномицеты, плесени, дрожжи и др.

Эпифитная микрофлора представлена главным образом безвредными сапрофитами, однако при скашивании растений они могут интенсивно размножаться, вызывая гнилостные и бродильные процессы, приводящие к порче и разложению корма. Для предотвращения этих процессов растительные корма консервируют. Наиболее эффективным способом консервирования скошенной травы, зерна и других кормов является сушка. Сено сушат в прокосах, валках, копнах, на вешалах с помощью принудительной вентиляции атмосферным или подогретым воздухом. При этом, однако, следует иметь в виду, что пересушивание зеленой массы приводит к потере питательных веществ, особенно протеина и каротина. При увлажнении высушенного корма в нем вновь возникают микробиологические процессы, приводящие к повышению температуры, т. е. происходит термогенез (самонагревание) за счет деятельности вначале мезофильной, а затем термофильной микрофлоры. При умеренном развитии самонагревания солома, например, становится самопрелой и лучше поедается скотом. Явление микробного термогенеза в районах с влажным климатом используют для приготовления так называемого бурого сена.

Силосование (заквашивание) кормов. Это лучший способ консервирования зеленого корма, при котором растительную массу укладывают в силосные ямы, траншеи, башни и другие сооружения. Для

понимания сущности процессов, происходящих при силосовании, необходимо детально знать биохимию и микробиологию его.

Существует два способа силосования: холодный и горячий. При холодном способе, имеющем наибольшее распространение, в созревающем силосе происходит умеренное повышение температуры - до 25-30 °С. Растительная масса в этом случае укладывается в траншею одновременно, утрамбовывается и изолируется слоем земли.

При горячем способе силосная траншея заполняется по частям, без утрамбовки, с перерывами в 1-2 дня. При таком силосовании обеспечивается аэробизм, более интенсивно идут микробиологические и ферментативные процессы, в результате которых температура корма повышается до 45-50 °С. Затем укладывают второй слой толщиной до 1,5 м, третий, и так до полного заполнения траншеи. Горячий способ силосования применяется реже, поскольку разогревание растительной массы приводит к потере питательных веществ. Его целесообразно использовать для силосования грубостебельчатых кормов из малоценных трав, а также соломы.

В процессе созревания зеленой массы при холодном силосовании различают три последовательные фазы:

- первая фаза (развития смешанной микрофлоры) связана с бурным размножением эпифитной микрофлоры, кишечной палочки, псевдомонасы, дрожжей, молочнокислых и гнилостных бактерий. Длительность первой фазы – 1-3 дня. В это время силос разогревается и подкисляется, создаются анаэробные условия, в результате чего большая часть смешанной микрофлоры погибает;

- вторая фаза характеризуется вначале бурным размножением молочнокислых стрептококков, а затем молочнокислых палочек, продуцирующих молочную кислоту, которая подавляет размножение гнилостных и маслянокислых микроорганизмов, кроме спорообразующих. Длительность второй фазы от 2 нед до 3 мес;

- третья фаза (конечная) связана с постепенным отмиранием в созревающем силосе возбудителей молочнокислого брожения (*Str. lactis*, *Str. plantarum*, *Str. thermophilus*), концентрация молочной кислоты достигает 60 % и более, рН силосной массы снижается до 4,2-4,5. Кроме молочной кислоты в силосе накапливаются уксусная и даже масляная кислоты. Концентрация уксусной кислоты не должна превышать 40-60 % всех органических кислот, масляной кислоты должно быть не более 0,2 %.

При несоблюдении технологии приготовления силоса и его хранения он может заплесневеть, прогоркнуть и переокиснуть. Для профилактики пороков силоса микробного происхождения используют бактериальные закваски молочнокислых бактерий (*Lactobacillus plantarum*, *Str. lactis diastaticus*), пропионово-кислых и других бактерий. Кроме того, используют буферные кислотные смеси, содержащие разные минеральные кислоты, а также препараты, содержащие формиат кальция, метабисульфит, пиросульфит натрия, сульфаминовую, бензойную, муравьиную кислоты и другие вещества.

Дрожжевание кормов. Для обогащения кормов белком и витаминами используют кормовые или пивные дрожжи. Дрожжевание производят заквасочным или опарным методом. (Технология их дана в специальной литературе.)

Сенаж. Изложенные выше сведения относятся к консервированию кормов, имеющих нормальную влажность (около 75 %). Если влажность консервируемой массы значительно ниже (50-65 %), то происходит хорошая ферментация даже при дефиците углеводов и получается корм высокого качества - сенаж. При этом рН корма может быть довольно высоким - около 5, так как гнилостные бактерии обладают меньшим осмотическим давлением, чем молочнокислые. При подсушивании корма в нем приостанавливаются гнилостные процессы, но продолжают действовать возбудители молочнокислого брожения. На этом основано приготовление сенажа, когда несколько подсушенную массу закладывают для консервирования, как при холодном силосовании.

Исследованиями авторов было показано, что в клевере, влажность которого составляла 50 % и ниже, развиваются микробиологические процессы. Они протекают тем слабее, чем суше корм. Доминирующей микрофлорой в консервируемом корме очень быстро становятся молочнокислые бактерии. Эта группа довольно специфичных микроорганизмов близка к *Lactobacillus plantarum*, но отличается способностью расти в условиях значительно более сухой среды и сбраживать крахмал. Их развитие в корме приводит к накоплению в нем некоторого количества молочной и уксусной кислот.

По типу сенажирования хорошо сохраняются предназначенные на корм измельченные початки кукурузы с влажностью 26-50 % (оптимум 30-40 %). В последнее время рекомендуют обрабатывать недосушенное сено (влажностью около 35 %) жидким аммиаком, который действует как консервант. При введении аммиака в корме создается щелочная реакция, блокирующая микробиологические и ферментативные процессы. Обработанный аммиаком корм должен быть покрыт каким-либо изоляционным материалом (Е. Н. Мишустин, В. Т. Емцев, 1987).

Микрофлора навоза

Навоз - ценное удобрение, повышающее плодородие почв и улучшающее их структуру. Однако он содержит значительное количество органических соединений и служит хорошей средой для развития сапрофитных и даже патогенных микробов, поэтому свежий навоз для удобрения не применяют.

В настоящее время применяют два способа хранения навоза: аэробно-анаэробный и анаэробный. При первом способе навоз рыхло укладывают в штабель, что способствует интенсивному размножению в нем термогенных микробов, создающих высокую температуру. При этом происходит санирование навоза, т. е. в нем гибнут патогенные микробы и гельминты, что обеспечивает благополучие хозяйств в отношении инфекционных болезней

сельскохозяйственных животных. При анаэробном способе хранения навоз укладывают плотно, утрамбовывают. Это предотвращает поступление в штабель воздуха, необходимого для развития термофилов. При таком хранении патогенные микроорганизмы и гельминты не погибают и навоз на длительный срок остается резервуаром болезнетворных микроорганизмов, если он получен от больных животных. Следовательно, в ветеринарно-санитарном отношении этот способ не заслуживает внимания, в практике нужно использовать аэробно-анаэробный метод, обеспечивающий биотермическое обеззараживание навоза.

Микрофлора организма животных

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

Микрофлора кожи. Постоянные обитатели кожи - стафилококки, стрептококки, сарцины, актиномицеты, микрококки, вызывающие нагноительные процессы: фурункулы, гнойники, флегмоны

Из палочковидных форм обнаруживают кишечную, синегнойную, псевдодифтерийную. Также на кожу попадают микробы из группы аэробов и анаэробов. Количество микробов на коже зависит от условий содержания животных: при плохом уходе на 1 см поверхности кожи может находиться до 1-2 млрд микробных тел.

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

Из патогенных микробов на коже вымени часто встречаются возбудители маститов (*Str. agalactiae*, *Str. uberis*, *Staph. aureus*) и колимаститов (*Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Corynebacterium pyogenes*, *Bac. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* и др.). Особое значение имеет *Str. agalactiae*, который вызывает 70-80 % всех бактериальных маститов, Микрофлора конъюнктивы. На конъюнктиве находят сравнительно небольшое количество микробов. Как правило, это стафилококки, стрептококки, сарцины, реже встречаются микоплазмы, микрококки, актиномицеты, дрожжевые и плесневые грибы.

Микрофлора дыхательных путей. У новорожденных животных в дыхательных путях микроорганизмов нет. При дыхании на слизистые оболочки верхних дыхательных путей оседают из воздуха различные бактерии, актиномицеты, плесневые и дрожжевые грибы, микоплазмы и др. Постоянными обитателями слизистых оболочек носоглотки, зева в основном являются кокковые формы бактерий - стрептококки, стафилококки, микрококки.

Микрофлора пищеварительного канала. Она наиболее обильна. У новорожденных животных желудочно-кишечный тракт не содержит микробов. Через несколько часов организм животного заселяется микрофлорой, которая в процессе жизни может видоизменяться, но в основном остается стабильной до конца жизни животного. Микрофлору пищеварительного канала принято делить на факультативную, которая может меняться в зависимости от корма, условий содержания и эксплуатации, и облигатную, т. е. постоянную, приспособившуюся к условиям среды желудочно-кишечного тракта. К постоянной микрофлоре относятся молочнокислые стрептококки (*Sir. lactis*), молочнокислые палочки (*Bact. acidophilum*), кишечная палочка (*E. coli*).

Микрофлора полости рта. Она наиболее обильна и разнообразна. В ротовой полости обнаружено более 100 видов микроорганизмов. К постоянным обитателям ротовой полости относятся диплококки, стафилококки, сарцины, микрококки, дифтероиды, анаэробы и аэробы, целлюлозоразрушающие бактерии, спирохеты, грибы, дрожжи и др.

Разнообразие микроорганизмов зависит от вида животных, типа кормов и способов их применения. Например, при кормлении молоком преобладают молочнокислые микробы и микрофлора молока. При кормлении грубыми кормами травоядных животных количество микробов в ротовой полости невелико, при даче им сочных кормов оно возрастает в 10 раз.

Микрофлора желудка. Она относительно бедна как по количественному, так и по качественному составу. Объясняется это бактерицидным действием кислого желудочного сока. В содержимом желудка выживают споровые типа *Bac. subtilis*, кислотоустойчивые микобактерии (*M. bovis*, *M. avium*), а также некоторые представители сарцины (*Sarcina ventriculi*), молочнокислые бактерии, актиномицеты, энтерококки и др.

При понижении кислотности, а также при заболевании желудка в его содержимом находят богатую микрофлору гнилостных бактерий, дрожжей, грибов, плесеней и других микроорганизмов.

В желудке свиньи главные представители микрофлоры - молочнокислые бактерии, различные кокки, сбраживающие углеводы, актиномицеты, дрожжи, спорообразующие аэробы; обнаруживаются *Cl. perfringens*. Микрофлора желудка лошади более многочисленна и разнообразна: ближе к привратнику она бедна, в преддверии желудка

микробы концентрируются в большом количестве; на дне желудка много молочнокислых бактерий, нет гнилостных.

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

В рубце жвачных происходят сложные микробиологические и биохимические процессы, связанные с расщеплением питательных веществ. Особый интерес представляют целлюлозоразрушающие микробы: *Ruminococcus flavefaciens*, *R. albus*, *Bact. succinogenes*, *Cl. cellobioparum*, *Cl. cellolyticum* и др. Эти микроорганизмы переваривают клетчатку с помощью фермента целлюлозы до глюкозы, которая легко усваивается организмом животных. Пектиновые вещества расщепляют *Bac. macerans*, *Bac. asterosporus*, *Amylobacter*, *Granulobacter pectinovorum*. Стрептококки (*Str. bovis*, *Str. faecalis* и др.) сбраживают крахмал, глюкозу с образованием молочной кислоты. Пропионово-кислые бактерии (*Propionipcctinovorum*, *Veillonella*, *Peptostreptococcus elsdonii*, *Butyribacterium*, *E. coli* и др.) сбраживают лактаты с образованием пропионовой кислоты, частично масляной и уксуснокислой, продуцируют витамины группы В. Микробы, заселяющие рубец, расщепляют белки, нитраты, мочевины синтезируют все витамины, за исключением А, Е, D.

Микрофлора тонкого кишечника. Она наиболее бедна. В двенадцатиперстной и тощей кишках ослабляется деятельность целлюлозных микроорганизмов. Здесь чаще всего обитают устойчивые к желчи энтерококки, ацидофильные, споровые микробы (*Bac. retiformis*, *Cl. perfringens*), актиномицеты, *E. coli* и др. Количественный и качественный состав микрофлоры тонких кишок зависит от вида животных и характера их кормления.

Микрофлора толстых кишок. Она наиболее богата. Постоянные обитатели - энтерококки, стафилококки, стрептококки, целлюлозные бактерии, актиномицеты, ацидофилы, термофилы, споровые формы, дрожжи, плесени, гнилостные бактерии. Обилие микроорганизмов в толстых кишках объясняется наличием в них больших объемов переваренной пищи. Установлено, что треть сухого вещества фекальных масс человека состоит из микробов. Микробиологические процессы в толстых кишках не приостанавливаются, ряд продуктов деятельности микробов усваивается макроорганизмом. У разных видов животных, в том числе птиц, пчел, микрофлора толстых кишок представлена разнообразными ассоциациями микробов, которая может быть как постоянной, так и непостоянной.

У здоровых животных наряду с нормальной микрофлорой в ряде случаев обнаруживают патогенные микроорганизмы - возбудители столбняка, инфекционного аборта кобыл, сибирской язвы, рожи свиней, пастереллеза, сальмонеллеза, анаэробных и других инфекций.

Микрофлора мочеполовых органов. На слизистой оболочке половых органов обнаруживают стафилококки, стрептококки, микрококки, дифтероиды, кислотоустойчивые микобактерии (*Myc. smegmae*) и др. Основной обитатель слизистой оболочки влагалища - *Bact. vaginale vulgare*, обладающая резко выраженным антагонизмом к другим микроорганизмам. При физиологическом состоянии мочеполовых путей микрофлора обнаруживается только в их наружных частях.

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

Таким образом, поверхность тела животных, их открытые и закрытые полости постоянно содержат разнообразную микрофлору, в основном безвредную, но иногда и патогенную. При нормальных условиях в организме поддерживается определенный полезный микробиоценоз. При снижении резистентности макроорганизма условно-патогенные микроорганизмы, быстро развиваясь, вызывают заболевания (пневмонии, энтериты и др.).

Контрольные вопросы

1. Что такое стерилизация, асептика, антисептика, дезинфекция, пастеризация?
2. В чем состоит механизм действия физических, химических и антибиотических веществ на бактерии?
3. Расскажите о принципах микробиологической оценки дезинфекционной эффективности химических соединений.
4. В чем суть феномена бактериофагов?
5. Какова схема основных этапов взаимодействия фага с бактериальной клеткой?
6. Расскажите о микроорганизмах и их экологии.
7. Назовите основную микрофлору почвы.
8. Какая микрофлора обнаруживается в воде?
9. Какая микрофлора обнаруживается в воздухе?
10. Назовите методы исследования микрофлоры воды и воздуха.
11. Что такое коли-титр и коли-индекс?
12. Навоз и способы его хранения.
13. Какова основная микрофлора кожи и дыхательных путей?
14. Какую микрофлору рубца вы знаете и какова ее роль в пищеварении?
15. Назовите микрофлору толстого кишечника.

Тема 4. Бактериологическое исследование мяса. Санитарно-микробиологическое исследование мяса и мясных продуктов

Мясо - пищевой продукт, богатый различными питательными веществами. Для многих микроорганизмов мясо может являться хорошей средой обитания. Мясо может обсеменяться микроорганизмами эндогенно и экзогенно.

Состав микрофлоры доброкачественного мяса разнообразен. Преимущественно это аэробные и факультативно-анаэробные, бесспорные грамотрицательные палочковидные бактерии родов *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, а также энтеробактерии, коринеформные бактерии, стафилококки, микрококки, молочнокислые стрептококки. В меньших количествах можно обнаружить аэробные и анаэробные спорообразующие «почвенные» микроорганизмы, дрожжи, споры плесневых грибов.

Большинство этих микроорганизмов являются потенциальными возбудителями порчи мяса, способны при благоприятных условиях активно размножаться и расщеплять белки, углеводы и жиры мышечной ткани. Вместе с другой микрофлорой на поверхность, а затем и в глубину мяса могут проникнуть и патогенные микроорганизмы, например сальмонеллы, золотистый стафилококк, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*.

Пищевые продукты постоянно и достаточно интенсивно обсеменены различными микроорганизмами. Изучение этой микрофлоры проводится в разных странах в течение многих десятилетий. Проведенные исследования позволили выявить ряд закономерностей в обсеменении продуктов питания, формировании микрофлоры в условиях различных технологических процессов переработки пищи, ее роли в биологической и пищевой ценности продуктов, а также этиологическую роль тех или иных продуктов питания в передаче инфекционных заболеваний и пищевых токсикоинфекций человека.

Принято дифференцировать микрофлору, обсеменяющую продукты питания, на специфическую и неспецифическую. К первой относят микроорганизмы, искусственно вносимые в продукт для придания ему определенных свойств. Такая микрофлора в виде заквасок вносится в пищевые продукты при приготовлении всех молочнокислых продуктов, хлеба, К специфической относится микрофлора, формирующаяся в отдельных продуктах на определенных этапах технологии их получения - квашение капусты и других овощей, приготовление колбасных изделий, пива, вина и т.д. Являясь обязательным технологическим звеном получения указанных продуктов, микроорганизмы обеспечивают определенные органолептические свойства этих продуктов и по ряду параметров их

химический состав. Формируемая в процессе созревания этих продуктов микрофлора обеспечивает определенные сроки и условия хранения продуктов питания. Таким образом, специфическая микрофлора оказывает положительное влияние на пищевые продукты.

К неспецифическим относятся микроорганизмы, прижизненно обсеменяющие органы и ткани животных в случае заболевания или нарушения барьерных функций кишечника при травмах, голодании, перегревании или переохлаждении организма животных. При несоблюдении санитарных условий получения продуктов питания на разных этапах заготовки и хранения также возможно вторичное загрязнение их микроорганизмами.

Неспецифическая микрофлора может быть представлена микробами-сапрофитами, микробами, вызывающими порчу пищевых продуктов, потенциально патогенными и патогенными микроорганизмами.

Сапрофитные микроорганизмы, попадающие в продукты питания, в ряде случаев могут способствовать развитию определенных биохимических процессов, закономерных для данного пищевого продукта, обуславливающих его определенные свойства. В этом случае их можно рассматривать как специфичную для данного пищевого продукта микрофлору. Проявляя антагонистические свойства по отношению к другим микроорганизмам, микробы-сапрофиты часто обеспечивают сохранность и эпидемиологическую безопасность пищевых продуктов.

Микроорганизмы, вызывающие порчу пищевых продуктов, чаще всего обладают выраженной протеолитической активностью. Их попадание в продукты нежелательно, так как они снижают их биологическую и пищевую ценность, а в некоторых случаях делают невозможным использование продуктов в питании. Микроорганизмы способствуют накоплению токсических компонентов, которые могут привести к пищевому отравлению. Среди потенциально патогенных микроорганизмов следует, прежде всего, указать на возбудителей пищевых токсикоинфекций человека. Это большая группа бактерий, прежде всего энтеробактерии, которые после своего отмирания образуют токсические вещества.

Вторая группа микроорганизмов вызывающая пищевые отравления людей относится к группе токсикозов. Микробные пищевые токсикозы, связанные с накоплением в пищевых продуктах бактериальных токсинов и токсинов микроскопических грибов, и отравление человека может происходить при отсутствии микроорганизма, продуцирующего токсин.

В пищевых продуктах могут размножаться различные виды вышеперечисленных микроорганизмов, приводя к пищевому отравлению смешанной этиологии.

Наконец, при определенных условиях продукты питания могут быть контаминированы патогенными микроорганизмами, вызывающими, бруцеллез и сибирскую язву, листериоз, лептоспироз, кампилобактериоз, дизентерию, холеру. Продуктами питания могут передаваться некоторые риккетсиозы (Ку-лихорадка) и вирусные заболевания (ящур, полиомиелит) и другие инфекции.

Микрофлора мяса. Эндогенное, экзогенное обсеменение

Мясо и мясопродукты постоянно находятся под пристальным вниманием исследователей, занимающихся микробиологией пищевых продуктов. По классификации ФАО предложено разделить микроорганизмы, контаминирующие мясо на различных стадиях технологического процесса, на четыре группы: патогенные, условно-патогенные, санитарно-показательные и сапрофиты. Через мясо человеку могут передаваться возбудители инфекционных заболеваний (ящур, туберкулеза, Ку-лихорадки, туляремии, лептоспироза, листериоза, бактериальных токсикоинфекций и интоксикаций, микотоксикозов, энтеровирусных заболеваний). К числу санитарно-показательных микроорганизмов относят кишечную палочку, стрептококки. Сапрофитная микрофлора мяса включает около 30 типов различных бактерий. Все исследователи признают, что мясо животных может быть обсеменено двумя путями. В живом организме всегда находятся микроорганизмы, которые при определенных условиях могут проникать в кровь и в мускулатуру. Этот путь называется эндогенным, то есть происходящим при жизни животного. Посмертное обсеменение туши, связанное с попаданием микроорганизмов из окружающей среды, называют экзогенным. Исследования мяса животных, убитых в нестерильных условиях, свидетельствуют о том, что в большинстве случаев оно обсеменено микроорганизмами. Одни авторы считают, что большая часть глубоких тканей и внутренних органов здоровых животных содержит значительное количество микроорганизмов (10 клеток²/г и более), другие утверждают, что глубокие ткани стерильны, третьи говорят о наличии единичных микробных клеток только в печени, селезенке в лимфатических узлах. Однако в любом случае контаминация мяса идёт двумя путями.

Прижизненное (эндогенное) обсеменение. Проникновение и нахождение микроорганизмов во внутренних органах и тканях еще до убоя животных наблюдается у больных инфекционными болезнями. Возбудитель

болезни проникает в восприимчивый организм, подавляет его защитные силы, размножается, а затем распространяется по организму. Распространение возбудителя по органам и тканям зависит от вида инфекции, ее течения и состояния организма больного животного. Так, при септических заболеваниях (сибирская язва, рожа свиней и др.) возбудитель сначала размножается в определенных тканях, а затем проникает в кровь и разносится по всем органам и в мышцы. При туберкулезе возбудитель чаще всего локализуется в одном или нескольких органах (легкие, вымя и др.), при лептоспирозе - преимущественно в почках и печени, при листериозе - главным образом, в головном мозге и печени и т. д.

У здоровых животных прижизненное эндогенное обсеменение органов и тканей микроорганизмами происходит при ослаблении естественной сопротивляемости (резистентности) организма под влиянием различных неблагоприятных (стрессовых) факторов: утомления, голодания, переохлаждения или перегревания, травм и пр. При нормальном состоянии защитных сил животных стенка кишечника представляет собой почти непреодолимое препятствие для микроорганизмов. В результате снижения сопротивляемости организма создаются благоприятные условия для проникновения микроорганизмов из кишечника через лимфатические и кровеносные сосуды в органы и ткани, в том числе в мышцы. При этом могут проникать не только сапрофиты - постоянные обитатели кишечного тракта животных, но и некоторые патогенные бактерии, например, сальмонеллы, носителями которых нередко являются сельскохозяйственные животные.

Изучены механизмы прижизненного обсеменения тела животного. Мясо, полученное в условиях мясокомбината и боен, чаще всего обсеменено постоянными обитателями желудочно-кишечного тракта животного, что связано с понижением общей сопротивляемости организма. На животное могут воздействовать разнообразные неблагоприятные факторы: стрессовое состояние, связанное с изменением привычной обстановки, состояние голода и жажды, переохлаждение или перегревание, утомление во время перегона на большие расстояния. Мясо, полученное от ослабленных, истощенных и переутомленных животных, будет всегда обсеменено микроорганизмами.

Наиболее часто эндогенное обсеменение тканей животных микроорганизмами происходит при утомлении, т. е. состоянии перенапряжения (стресса), возникающего при транспортировании или перегоне животных на мясокомбинаты. Внутренние органы и ткани животных, убитых сразу же после транспортирования по железной дороге, содержат в 3-4 раза больше микроорганизмов, чем органы и ткани животных неутомленных, получивших предубойный отдых.

Степень эндогенного обсеменения органов и тканей микроорганизмами зависит от стадии утомления животных. У животных, убиваемых в состоянии резкого утомления, микроорганизмы содержатся почти во всех органах и тканях. Например, в продуктах убоя от сильно утомленного крупного рогатого скота почти всегда обнаруживают микроорганизмы в печени, селезенке, почках, легких, соматических и других лимфоузлах и довольно часто (до 30-40 % случаев) в мышцах.

У крупного рогатого скота, имеющего незначительную степень утомления, микроорганизмы обычно выделяют только из печени и портального лимфоузла, мезентериальных лимфоузлов (в 30-50 %) и легких (до 20 % случаев). У свиней, убиваемых в степени незначительного утомления, микроорганизмы обнаруживают главным образом в печени (в 30 % случаев), паховых и подчелюстных лимфоузлах (в 20 %), почках и селезенке (в 16-17 % случаев).

Степень утомления, а, следовательно, и проникновения в ткани микроорганизмов из желудочно-кишечного тракта зависит от продолжительности и условий транспортирования животных. При доставке животных автотранспортом на небольшие расстояния эндогенное обсеменение мышц и органов микроорганизмами незначительно. После длительного транспортирования железнодорожным или водным транспортом в органах и тканях животных почти всегда содержатся в большом количестве микроорганизмы, проникшие из желудочно-кишечного тракта.

При транспортировании в жаркое время года, особенно в плохо вентилируемых, нагретых солнцем вагонах, у животных отмечается более высокая степень обсеменения тканей микроорганизмами, чем при транспортировании в прохладное время года.

Для приведения в нормальное физиологическое состояние здоровых, но утомленных в пути животных им предоставляется на мясокомбинатах предубойный отдых. Восстановление естественных защитных сил и постепенное освобождение органов и тканей утомленных животных от проникших в них из желудочно-кишечного тракта микробов в значительной степени зависит от правильной организации предубойного отдыха (уход, условия содержания, кормления, поения). У животных, находящихся перед убоем летом в незащищенных от солнца помещениях или зимой длительное время на холоде (что приводит к переохлаждению организма), микроорганизмы, как правило, содержатся во всех внутренних органах, в лимфоузлах и мышцах. Если животных перед убоем содержат в нормальных температурных условиях, то микроорганизмы обнаруживают главным образом в печени и портальном лимфоузле, иногда в других внутренних

органах. Мышечная ткань и соматические лимфоузлы таких животных часто оказываются стерильными. У свиней, подвергшихся перед убоем перегреву, бактерицидные свойства лимфы выражены слабо или совсем отсутствуют. Органолептические признаки порчи мяса, полученного от животных, перегретых или переохлажденных перед убоем, появляются на 1,5-2 сут. раньше, чем мяса животных, содержащихся перед убоем в нормальных условиях.

Кормление животных незадолго до убоя приводит к некоторому эндогенному обсеменению органов и тканей микроорганизмами из кишечного тракта. Так, при микробиологическом исследовании продуктов убоя животных, убитых через 4-6 ч после кормления, во всех случаях установлено наличие микроорганизмов в печени, почках, селезенке. Кроме того, у половины исследованных туш микроорганизмы обнаружены в крови, мышцах и костном мозге.

Существует определенная зависимость между предубойным физиологическим состоянием организма животных, содержанием в их мышечной ткани гликогена и посмертным накоплением молочной кислоты (снижением рН) в процессе созревания мяса. В мышечной ткани здоровых, упитанных животных содержится значительное количество гликогена и при созревании мяса происходит интенсивное накопление молочной кислоты, что и обуславливает показания рН в 5,8-6,2.

У животных больных, плохо упитанных, утомленных, т. е. убитых в состоянии резкого снижения резистентности организма, кроме прижизненного эндогенного микробного обсеменения органов и тканей наблюдается уменьшение количества гликогена в мышцах почти вдвое по сравнению с нормой. При созревании мяса таких животных посмертные окислительные процессы (т. е. накопление молочной кислоты) замедлены по сравнению с процессами, протекающими в мясе здоровых и отдохнувших животных, рН колеблется в пределах 6,3-6,9. Поскольку мясо, полученное от животных с пониженной сопротивляемостью организма, имеет после созревания более высокий рН, развитие гнилостных бактерий в нем подавляется слабо. В процессе хранения такое мясо быстрее портится.

При голодании менее суток наблюдается незначительное обсеменение органов и тканей крупного рогатого скота микроорганизмами из желудочно-кишечного тракта. Начиная с 48 ч, оно возрастает. После недельного голодания обсемененность мышц и внутренних органов кишечной палочкой достигает 100% исследованных проб.

Целый ряд работ посвящен изучению состава микрофлоры желудочно-кишечного тракта животных. В желудочно-кишечном тракте животных

находится большое количество микроорганизмов, попадающих туда, прежде всего, с кормом. Их количество достигает 10^8 микробов в 1 г содержимого рубца. В кислой среде желудка часть микрофлоры гибнет, но могут оставаться жизнеспособные бактерии, дрожжи и плесневые грибы. В тонком кишечнике наблюдается дальнейшее снижение уровня микроорганизмов до 10^4 кл/г содержимого. В толстом кишечнике в связи с процессами обмена происходит активация деятельности микрофлоры и ее увеличение до 10^8 кл/г содержимого. Здесь обитают микроорганизмы, относящиеся к грамотрицательным, палочковидным бактериям, грамположительные энтерококки, клостридии, дрожжи и плесневые грибы. Состав и соотношение микрофлоры зависят от состава кормов, отдела желудочно-кишечного тракта, времени года и возраста животного.

Кроме того, обсеменение мяса при жизни животного может быть связано с другими органами, содержащими микроорганизмы. К ним относятся верхние дыхательные пути и вымя. Чаше всего это кокковая микрофлора, реже там находят бациллы, дрожжи и плесневые грибы. Обитателями желудочно-кишечного тракта могут быть потенциально патогенные и патогенные микроорганизмы. Кишечник животных является местом обитания клостридий и установлена возможность прижизненного обсеменения органов и тканей ослабленных и больных животных.

В литературе имеется много исследований, посвященных изучению микробного обсеменения мяса животных с различными клиническими заболеваниями и клинически здоровых животных. Одни авторы называют очень высокий процент обсеменения мяса животных вынужденного убоя (от 48 до 70%) , другие приводят более низкие значения. Обсеменение микроорганизмами органов и тканей наблюдается при травмах животного. В мышечной ткани, расположенной в нескольких сантиметрах от места травмы, снижается количество гликогена, что приводит к более интенсивному размножению микроорганизмов, чаще всего стафилококков, бактерий группы кишечных палочек и других. Так, частота обнаружения клостридий в мышцах крупного рогатого скота с травматическими повреждениями, по данным целого ряда исследователей, составила 8,5%, в лимфоузлах - 15,5%, в печени - 19%; соответственно 3,9, 4,2 и 8,5% - в органах клинически здоровых животных. При обследовании свиней были получены аналогичные результаты. Из мышц больных животных процент выделения составил 12,2%, из лимфоузлов - 16,9%, из печени - 22,4%; соответственно 5,1; 6,4 и 9,9% - из органов клинически здоровых животных.

Не вызывая заболевания у животного, в кишечнике могут длительное время находиться сальмонеллы. При снижении защитных сил животного они

проникают в мезентериальные лимфатические узлы, затем в кровь и, распространяясь по организму, обуславливают вторичный сальмонеллез. Такое бактерионосительство широко распространено среди животных и птиц.

В связи с болезнью или травмой из кишечника или места повреждения может происходить инфицирование тела животного патогенными микроорганизмами (сальмонеллы, золотистый стафилококк, возбудители туберкулеза, ящура, бруцеллеза), кроме того, в кровь проникают обитатели кишечника. Определенное значение для эндогенного инфицирования мяса имеет агональная инвазия микроорганизмов. Некоторые авторы объединяют ее с посмертным эндогенным обсеменением органов и тканей, которое начинается сразу после обескровливания, то есть клинической смерти животных. В этот период через слизистые оболочки носоглотки и кишечника микроорганизмы могут проникать в окружающие ткани.

Экзогенное обсеменение мяса связано с этапами разделки туши, последующей транспортировкой, условиями хранения, технологией получения мясопродуктов и санитарным состоянием предприятия. Детальнее этот вопрос рассматривается в следующей лекции, но коротко остановимся и здесь. При убойе животных и последующих операциях разделки туш происходит экзогенная контаминация мясных туш и органов микроорганизмами, попадающими из внешней среды, и эндогенное обсеменение внутренних тканей и органов микроорганизмами из желудочно-кишечного тракта. Источниками послеубойного микробного обсеменения продуктов убоя могут служить кожный покров животных, содержимое желудочно-кишечного тракта, воздух, оборудование, транспортные средства, инструменты, руки, одежда и обувь работников, имеющих контакт с мясом, вода, используемая для зачистки туш, и т. д.

При экзогенной контаминации попадание микроорганизмов в мышечную ткань и органы возможно во время убоя животных. При обескровливании в течение нескольких минут сердце животных продолжает работать и вытекающая из перерезанных шейных артерий кровь частично засасывается вновь через вены, находящиеся под отрицательным давлением. При этом в кровяное русло могут попадать и разноситься по всем тканям микроорганизмы с инструментов, шерстного покрова, а при несоблюдении правил перевязки пищевода - из содержимого желудка.

В процессе выполнения технологических операций разделки мясных туш экзогенное обсеменение мяса микроорганизмами происходит в основном при съемке шкур, извлечении внутренних органов и зачистке.

Съемка шкур существенно влияет на санитарное состояние вырабатываемого мяса. Во время съемки шкур возможно экзогенное обсеменение микроорганизмами поверхности мясных туш.

В 1 г (или на 1 см) волосяного покрова крупного рогатого скота содержится до 700 млн., а в отдельных случаях - даже миллиарды микроорганизмов. Значительное количество микробов имеется также на кожном покрове свиней. Так, на 1 см поверхности кожи свиней обнаруживали в области спины 58 млн. микроорганизмов, а в области живота - до 44 млн. С поверхности кожного покрова свиней были выделены сальмонеллы (в 26,6% случаев), кишечная палочка (60%), различные кокковые бактерии (58%), бактерии рода протейс (55%), споровые гнилостные бактерии (100% случаев). Наибольшая степень микробного загрязнения кожного покрова животных - осенью и весной.

Во время съемки шкур значительное загрязнение обнажаемой поверхности мясных туш микроорганизмами происходит вследствие попадания на нее пыли и грязи, стряхиваемой со шкур в момент их отрыва. При этом степень микробной контаминации поверхности туш во многом зависит от способа съемки. В настоящее время на предприятиях мясной промышленности используют несколько установок для механической съемки шкур с туш крупного рогатого скота. Кроме того, шкуры снимают с помощью лебедки. В этом случае происходит интенсивное микробное обсеменение большой поверхности туш (в области бедренной части, боковой, грудной стенки, спинной части). Это объясняется тем, что в момент отрыва шкура находится в вертикальном положении над тушей, вследствие чего микроорганизмы со шкуры беспрепятственно попадают на тушу. Механическая съемка шкур на подвесных путях способствует улучшению санитарного состояния мясных туш. Однако не все используемые в настоящее время установки для механической съемки шкур в одинаковой степени отвечают санитарным требованиям. Иногда микроорганизмы содержатся даже в области спины. Количество микроорганизмов на 1 см² поверхности туш составляет более 600 тыс.

Обсеменение поверхности мясных туш микроорганизмами при съемке шкур происходит также с рук рабочих и используемых ими инструментов. В процессе удаления шкуры в окружающую среду попадает большое количество грязи, поэтому последующими источниками загрязнения становятся воздух, полы, оборудование и инструменты на разделочных линиях, работающий персонал. Микробная контаминация одной руки рабочих составила от $2,6 \times 10^7$ до $2,1 \times 10^8$ клеток, из них энтеробактерии составляли до 10^5 клеток, а споровые формы в зависимости от стадии

разделки туши - до $3,4 \times 10^6$ клеток. Микробное обсеменение одного ножа после снятия шкуры достигало до 10^7 , содержание энтерококков - 10^3 , а споровых форм до $8,6 \times 10^4$ клеток.

Для уменьшения микробного загрязнения рук и инструментов необходимо проводить их систематическую санитарную обработку.

В процессе разделки источником загрязнения поверхности мясных туш микроорганизмами может служить воздух цеха убоя скота и разделки туш мясокомбинатов. Исследования санитарно-гигиенического состояния воздуха этих цехов показали, что по сравнению с другими участками цеха наибольшее содержание микроорганизмов наблюдается возле устройств съёмки шкур, а также около бокса на месте подвешивания оглушенных животных на конвейер и на линии обескровливания. Так, вблизи от установки для механической съёмки шкур с туш крупного рогатого скота содержится во много раз больше микроорганизмов (стафилококки, бактерии группы кишечных палочек и др.), чем у отдаленных от этого участка мест цеха. В 1 см^3 воздуха на расстоянии 5-6 м от установки для съёмки шкур обнаружено около 25 тыс. микробных клеток.

Изучение состава микроорганизмов, выделенных из воздуха помещения, показало, что микрофлора воздуха в цехе убоя скота и разделки туш представлена различными споровыми аэробными и анаэробными гнилостными бактериями, грамотрицательными не споровыми палочками, плесневыми грибами, актиномицетами, дрожжами, различными видами кокковых бактерий, т. е. микроорганизмами, которые присутствуют на кожном покрове животных.

Все это говорит о том, что кожный покров животных является источником значительного микробного загрязнения воздушной среды цехов мясокомбинатов. В целях улучшения санитарно-гигиенического состояния воздушной среды необходимо проводить ежедневную профилактическую дезинфекцию воздуха производственных помещений. Кроме того, для улучшения санитарного состояния кожного покрова животных следует осуществлять их санитарную обработку перед убоем. В настоящее время применяют различные методы санитарной обработки кожного покрова животных: мойку под душем с применением или без применения механических приспособлений, обеззараживание кожного покрова различными химическими препаратами. Санитарная обработка кожного покрова животных приводит к значительному уменьшению микробного загрязнения, а, следовательно, способствует улучшению санитарного состояния вырабатываемого мяса. Например, после мойки под душем и обработки раствором химического препарата кожного покрова крупного

рогатого скота содержание микроорганизмов на 1 см² поверхности уменьшается с 2-20 млн. перед мойкой до 25-245 тыс. микробных клеток, т. е. примерно в 24-80 раз. Простая мойка кожного покрова свиней уменьшает микробное загрязнение в 10-15 раз, а обработка с применением механических щеток и воды - в 40-50 раз.

При обработке свиней без съёмки шкуры после обескровливания проводят шпарку или опалку. В процессе этих технологических операций, особенно при опалке, количество микроорганизмов на поверхности туш свиней резко уменьшается. Степень микробного загрязнения поверхности туш после шпарки во многом зависит от содержания микроорганизмов в воде шпарильных чанов. Кроме загрязнения микробами поверхности туш вода шпарильных чанов может быть источником обсеменения внутренних органов (легких) и даже мышечной ткани. Вода попадает в тушу через раневые отверстия. По мере прохождения туш вода в шпарильных чанах постепенно обсеменяется микробами. Если перед началом работы в 1 мл воды содержится всего несколько десятков микробных клеток, то после шпарки 250 туш свиней количество микроорганизмов возрастает до 26-27 тыс., причем преобладают споры бактерий, устойчивые к высоким температурам.

Улучшению санитарного состояния поверхности туш свиней в процессе их шпарки способствует применение прогрессивных методов технологии, в частности обработка туши паровоздушной смесью в установках непрерывного действия. По сравнению с общепринятым методом шпарки в чанах при обработке туш в агрегате непрерывного действия микробная контаминация поверхности туш уменьшается больше (в 250-300 раз вместо 90-100 раз при обработке в шпарильном чане). Следующим этапом разделки туши является эвентрация, или нутровка, внутренних органов из грудной и брюшной полостей. Имеет значение время проведения этого этапа после обескровливания животного. По данным С.Я. Любашенко, при проведении эвентрации внутренних органов через 10-15 мин после обескровливания животного в лимфатических узлах здоровых свиней содержится в среднем 20 тыс. бактерий, а если эвентрация производится спустя 1 ч и позже, количество микроорганизмов достигает 300 тыс. в 1 г.

Особенно опасны технологические погрешности при выполнении этой операции (несвоевременная перевязка пищевода, нарушение целостности желудочно-кишечного тракта), так как это приводит к массивному обсеменению поверхности туш, достигающему миллиона и более микробных тел на 1 см² поверхности. Если во время извлечения внутренних органов из брюшной и грудной полостей туш животных будут сделаны проколы ножом мышечных частей туш, то при хранении таких туш на месте прокола

отмечается интенсивное размножение микроорганизмов, и указанные туши быстрее подвергаются порче.

После извлечения внутренних органов для придания туше требуемого товарного вида и надлежащего санитарного состояния проводят ее зачистку: сухую (без применения воды) или мокрую (влажную).

При сухой зачистке срезают остатки внутренних органов, побитости, небольшие участки, загрязненные кровью или содержимым желудочно-кишечного тракта, зачищают бахрому и т. д. В процессе охлаждения и последующего хранения мясных туш, подвергавшихся сухой зачистке, подсыхают фасции и выступающая после снятия шкуры серозная жидкость. Поверхностные слои мышечной ткани обезвоживаются и уплотняются, что способствует образованию хорошо выраженной корочки подсыхания. Происходит фиксация микробов на поверхности туши. В пленках подсохших коллоидов создаются неблагоприятные условия для размножения микробов.

Мокрая зачистка заключается в обмывании туш струёй теплой воды или в обработке фонтанирующими щетками. При мокрой зачистке значительная часть загрязнений удаляется. Но слабый напор и невысокая температура воды (не выше 50°C) не столько способствуют удалению микроорганизмов, сколько приводят к их перераспределению с загрязненных на незагрязненные участки поверхности туш. В результате мойки туш, особенно при использовании травяных или капроновых щеток, рыхлая подкожная клетчатка еще более разрыхляется, и в нее проникают микроорганизмы. Кроме того, при мойке происходит значительное увлажнение поверхности туш. Вследствие этого замедляется образование корочки подсыхания, что способствует проникновению микроорганизмов в ткань.

Вода, применяемая для мойки туш в процессе их разделки, может служить причиной дополнительного микробного обсеменения поверхности мясных туш. Поэтому на мясоперерабатывающих предприятиях следует использовать воду, отвечающую санитарным требованиям, предъявляемым к питьевой воде.

Таким образом, мокрая зачистка имеет ряд недостатков и может отрицательно влиять на санитарное состояние вырабатываемого мяса. В настоящее время, учитывая уровень используемой техники, а также санитарно-гигиеническое состояние кожного покрова животных, поступающих на убой, нельзя полностью отказаться от мокрой зачистки. Однако необходимо строго соблюдать технологические инструкции по убою скота, которыми предусмотрена мойка только загрязненных участков туши.

При незначительном загрязнении туш следует ограничиваться сухой зачисткой.

В процессе обработки туши на поверхности свежего мяса можно обнаружить микроорганизмы почти всех родов. По данным некоторых авторов обсемененность мяса на конечном этапе разделки на бойне бактериями группы кишечных палочек может достигать 10^9 кл/г продукта.

После туалета туши направляют в камеры для созревания. При температуре 0-4°C в течение 48-72 ч в мясе протекают ферментативные процессы, обуславливающие кулинарные качества продукта. На мясных тушах образуется сухая пленка, препятствующая размножению микробов на поверхности. Под действием ферментов в тканях происходит гликолиз, накопление кислот и снижение рН мяса, что является нежелательным для жизнедеятельности микроорганизмов. Следует помнить, что мясо может быть обсеменено полезной и вредной микрофлорой, и, используя полезную микрофлору, можно улучшать качество мяса.

Мясо животных и птицы, получаемое на мясокомбинатах, содержит микроорганизмы, которые попадают в него в результате микробного обсеменения тканей животных после их убоя. Микроорганизмы, находящиеся в мясе, могут размножаться, поскольку этот продукт является хорошей питательной средой для их развития. В целях сохранения качества мясо подвергают холодильному хранению, посолу, переработке на колбасные и консервные изделия, сушке и другим видам обработки. При этом изменяется состав микрофлоры мяса. Нарушение условий хранения, а, следовательно, размножение определенных групп микроорганизмов приводят к возникновению различных пороков мяса.

Санитарно-микробиологическое исследование мяса и мясных продуктов

Одним из важнейших условий защиты мяса от обсеменения микробами является строгое выполнение всех требований ветеринарного надзора за животными в предубойном периоде и соблюдение санитарно-гигиенического режима в процессе приготовления мясопродуктов.

Мясо здорового животного обычно стерильно, так как в физиологических условиях стенка кишечника непроницаема для микроорганизмов. Утомление, длительное голодание и болезни животных, предназначенных к убою, способствуют нарушению физиологических барьеров и проникновению микроорганизмов из кишечного тракта через кровеносную и лимфатическую системы в органы и ткани животных. При горизонтальном обескровливании животных микроорганизмы могут проникать в венозную систему и распространяться по тканям.

Мясо является хорошим питательным субстратом для многих микроорганизмов, в котором они находят все необходимые для себя вещества - источники углерода и азота, витамины, минеральные соли. Помимо прижизненного инфицирования мускулы могут обсеменяться микробами после убоя животного: при первичной обработке и разделке туш (особенно если повреждается кишечник), с инструментов, с рук и одежды рабочих, а также при транспортировании, хранении, разрубе в магазинах и т. д. Поэтому даже свежеработанное мясо не является стерильным, и в нем (преимущественно на поверхности) содержится то или иное количество микроорганизмов.

Обсемененность свежеработанного охлажденного мяса микроорганизмами может быть различной в зависимости от степени созревания мяса, температурно-влажностного режима охлаждения, санитарно-гигиенических условий выработки и др. На 1 см² поверхности насчитывают тысячи, десятки и сотни тысяч клеток. Состав микрофлоры разнообразен. Преимущественно это аэробные и факультативно-анаэробные, бесспорные, грамотрицательные палочковидные бактерии родов *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, бактерии группы кишечной палочки и протей, коринеформные бактерии, молочнокислые микрококки. В меньших количествах обнаруживают аэробные и анаэробные спорообразующие бактерии, дрожжи, споры плесеней. Среди этих микроорганизмов немало возможных возбудителей порчи мяса, способных активно воздействовать на белки, жир и другие вещества, входящие в его состав.

Таблица 11 - Оценка степени свежести сырого мяса

| Степень свежести мяса | Показатели бактериоскопической пробы (в поле зрения микроскопа) |
|-----------------------|--|
| Свежее | Микроорганизмы не обнаруживаются или имеются лишь единичные (до 10 клеток) кокки и палочки. Следов распада мышечной ткани нет |
| Сомнительной свежести | Обнаруживаются не более 30 кокков или палочек, а также следы распада мышечной ткани: ядра мышечных волокон в состоянии распада, исчерченность волокон слабо различима |
| Несвежее | Обнаруживается свыше 30 кокков или палочек. Наблюдается значительный распад мышечной ткани: почти полное исчезновение ядер и полное исчезновение исчерченности мышечных волокон |

Мясо может быть инфицировано и токсигенными бактериями, например *Clostridium perfringens*, сальмонеллами, *Bacillus cereus*, энтерококками. Сальмонеллы нередко вызывают кишечные заболевания у рогатого скота, после чего животные длительно являются ба-

циллоносителями. Проникновение сальмонелл в мышцы возможно при жизни животного. При значительном размножении этих бактерий мясо может послужить причиной отравлений.

Мясные субпродукты (мозги, почки, сердце и др.) обычно более обсеменены микробами, чем мясо, и поэтому быстрее портятся. При благоприятных условиях микроорганизмы размножаются на поверхности мяса и постепенно проникают в его толщу. Проникновение бактерий в глубину мяса свидетельствует о снижении его качества. На этом основано (ГОСТ 23392-78) бактериоскопическое исследование мяса, позволяющее быстро установить степень его свежести. При этом определяют количество бактерий и степень распада мышечной ткани путем микроскопирования окрашенных по Граму мазков-отпечатков (табл. 11).

В зависимости от конкретной ситуации показания могут быть расширены. Мясо, забракованное по органолептическим показаниям, микробиологическому исследованию, как правило, не подвергают, если не возникает необходимости выявления и идентификации патогенной микрофлоры (бактерий семейства кишечных, возбудителей сибирской язвы, пастереллеза, клостридиозов и другого).

Показания к бактериологическому исследованию мяса

Пробы для проведения микробиологического исследования направляют в ветеринарную лабораторию в следующих случаях:

1. во всех случаях вынужденного убоя животных независимо от причин убоя и принадлежности животных;
2. в случаях, когда нутровка (удаление кишечника из туши) была проведена позднее, чем через 2 часа после убоя, либо если в процессе нутровки был поврежден кишечник;
3. при обнаружении в тканях и органах патологоанатомических изменений, характерных для сепсиса;
4. при обнаружении в тканях и органах патологоанатомических изменений, характерных для остропротекающих инфекционных болезней;
5. при обнаружении в органах и тканях патологоанатомических изменений, при наличии которых возможно присутствие в мясе патогенных микроорганизмов (отеки, кровоизлияния, изменения в лимфатических узлах, жировое перерождение печени, наличие гнойных очагов и т.д.);
6. при проведении ветеринарно-санитарной экспертизы продуктов убоя, полученных от животных, больных инфекционными и инвазионными болезнями, при которых возбудитель неустойчив к воздействию высоких

температур (рожа, классическая чума свиней, ящур, листериоз и др.) на предмет выявления сальмонелл;

7. если во время исследования мяса и других продуктов убоя на доброкачественность при микроскопии мазков-отпечатков обнаруживают микроорганизмы, которые по своим морфологическим признакам напоминают возбудителей инфекционных болезней;

8. по официальному требованию правоохранительных органов и органов здравоохранения.

Ветеринарный врач имеет право направлять пробы для проведения микробиологического исследования также в следующих случаях:

- 1) при проведении послеубойной экспертизы мяса;
- 2) при исследовании мяса на свежесть;
- 3) при проведении входного контроля мяса.

Цель микробиологического исследования мяса

1. Санитарно-микробиологическое исследование для определения соответствия микробиологических показателей мяса требованиям нормативных документов при производственном контроле.

2. Выявление возбудителей особо опасных болезней, общих для человека и животных разных видов (сибирская язва, лептоспироз, туберкулез и др.).

3. Выявление возбудителей инфекционных болезней, свойственных животным одного вида.

4. Выявление возбудителей острых кишечных инфекций, пищевых токсикоинфекций и токсикозов.

5. Определение обсемененности мяса сапрофитной микрофлорой и установление свежести мяса.

Если мясо рассматривают как патологический материал, обсеменённый конкретными возбудителями инфекционных болезней животных и человека, микробиологическое исследование проводят согласно действующим нормативным документам (ГОСТ, Методические указания, инструкции и т.п.), регламентирующим методику бактериологического исследования с целью выявления и идентификации конкретного микроорганизма.

При производственном санитарно-микробиологическом контроле мяса и мясных продуктов, они, как и другие пищевые продукты, подвергаются комплексу исследований, которые направлены на установление соответствия пищевого продукта существующему для него стандарту, определение доброкачественности, отсутствия вредных и ядовитых веществ, степени бактериальной обсеменённости и наличия условно-патогенных и патогенных микроорганизмов.

Отбор проб для бактериологического исследования мяса

Микробиологическое исследование мяса убойного скота проводят в соответствии с ГОСТ 21237-75 «Мясо. Методы бактериологического анализа», мяса птицы - по ГОСТ 7702-74, а кроликов - по ГОСТ 20235-74

Для бактериологического исследования направляют от туши:

- **часть мышцы сгибателя или разгибателя** передней и задней конечности туши длиной не менее 8 см или кусок другой мышцы размером не менее 8 х 6 х 6 см, то есть 2 куска мышечной ткани с фасциями весом около 200 г каждый;
- **не менее двух лимфатических узлов** из передней и задней части туши вместе с окружающей их соединительной и жировой тканью;
- **долю печени** с печеночным лимфатическим узлом или желчным пузырем, освобожденным от желчи, **почку и селезенку**.
- **ткани и органы, в которых обнаружены патологоанатомические изменения** и могут находиться возбудители бактериальных болезней.
- Для бактериологического исследования на листериоз направляют, кроме того, также головной мозг, для исследования на пастереллёз - легкие.
- Для бактериологического исследования на возбудителя сибирской язвы направляют лимфатический узел пораженного органа или лимфатический узел, собирающий лимфу с места локализации подозрительного фокуса, отёчную ткань, ухо, перевязанное лигатурой, а у свиней, кроме того, подчелюстной лимфатический узел.
- При исследовании полутуш или четвертин туш берут кусок мышцы 8 х 6 х 6 см, лимфатические узлы и трубчатую кость.

При исследовании соленого мяса, находящегося в бочечной таре, берут образцы мяса и имеющиеся лимфатические узлы сверху, из середины и со дна бочки, а также, при наличии, трубчатую кость и 200 г рассола.

При отправке материала для бактериологического исследования в теплое время года на дальние расстояния пробы допускается консервировать 30%-ным водным раствором глицерина, приготовленным на стерильной воде или стерильным вазелиновым маслом. При этом консервирующая жидкость должна в 4-5 раз превышать объем консервируемого материала.

Если берут часть печени, почки, селезенки, то поверхность разреза прижигают раскаленным шпателем или обрабатывают спиртом и обжигают над пламенем горелки до образования струпа.

Пробы берут стерильными инструментами. Каждую пробу в отдельности упаковывают в стерильную пергаментную бумагу или полиэтиленовую плёнку и подписывают простым карандашом. Упакованные

таким образом пробы помещают в герметичный контейнер, опечатывают или пломбируют и отправляют в ветеринарную лабораторию с нарочным.

В сопроводительном документе указывают:

- 1) наименование продукта с указанием вида мяса, от которого взят образец, и его количество;
- 2) наименование предприятия или хозяйства, где отобран образец и его адрес;
- 3) номера образцов;
- 4) причину направления образцов на исследование;
- 5) кратко - клинические признаки и патологоанатомические изменения, предполагаемый диагноз;
- 6) просьбу: исключить наличие предполагаемых возбудителей инфекционных болезней (желательно не более трех);
- 7) дату взятия образцов и подпись лица, направившего их на исследование.

Упакованную пробу и сопроводительную записку вместе с нарочным направляют в микробиологический отдел ветеринарной лаборатории

Бактериоскопическое исследование мяса

Каждый представленный к исследованию образец (мышцы, лимфатические узлы, паренхиматозные органы) перед исследованием освобождают от видимой жировой и соединительной ткани, погружают на 2-3 мин в спирт и два раза обжигают с поверхности. Затем стерильными ножницами из глубины различных мест каждого образца вырезают кусочки размером не менее 2,0 x 1,5 x 2,0 см; лимфатические узлы разрезают пополам. Срезы прикладывают к предварительно профламбированному предметному стеклу.

Из проб мышечной ткани, паренхиматозных органов (печени, почек, селезенки) и лимфатических узлов туши или из пораженных участков органа или ткани готовят 2-10 мазков-отпечатков в зависимости от характера патологических изменений и предполагаемого диагноза.

Препараты высушивают на воздухе, фиксируют над пламенем горелки и окрашивают одновременно по Граму и на капсулу (2% раствором сафранина по Ольту или формализованным генцианвиолетом по Ребигеру). В условиях производства удобно также окрашивать мазки водно-спиртовым раствором метиленовой сини. При этом нет возможности изучить тинкториальные свойства микроорганизмов, однако можно определить количество микроорганизмов в мазке, их форму, величину, взаимное расположение, наличие спор и капсул, особенности внутренней структуры.

Окраска мазков по Граму

На фиксированный мазок помещают полоску фильтровальной бумаги и наливают раствор карболового генцианвиолета. Выдерживают 1-2 мин, после чего снимают бумажку, сливают краску, мазок промывают водой и наливают на него раствор Люголя. Через 1-2 мин раствор сливают и наносят йодированный этиловый спирт на 1-2 мин или 96° этиловый спирт на 30 сек. Затем мазок промывают водой и дополнительно окрашивают свежеприготовленным фуксином Пфейфера или 2% водным раствором сафранина 1-2 мин. После окраски мазок промывают водой и просушивают фильтровальной бумагой.

Окраска мазков по Ольту (на капсулу)

Фиксированные мазки окрашивают 2% водным раствором сафранина в течение 1-3 мин при подогревании до паров и быстро смывают краску водой. Раствор сафранина готовят перед употреблением: сафранин растворяют в кипящей воде и фильтруют через бумажный фильтр.

Окраска мазков по Ребигеру (на капсулу)

Мазки окрашивают и фиксируют одновременно. Готовят раствор: 15-20 г генцианвиолета растворяют в 100 см³ 40%-го формалина. Раствор оставляют на 8-10 ч при температуре 20 °С, фильтруют, после чего он готов к употреблению. Окрашивают нефиксированные мазки в течение 15-20 с, быстро промывают водой и высушивают фильтровальной бумагой.

Окраска мазков водно-спиртовым раствором метиленового синего

В 100 см³ 96° этилового спирта растворяют 8-9 г метиленового синего. Раствор фильтруют и хранят в ёмкостях с притёртой пробкой.

Перед исследованием мяса к 30 см³ дистиллированной воды добавляют 1 см³ насыщенного спиртового раствора метиленового синего. При окраске предметные стекла с мазками помещают в ёмкость с раствором на 10-15 сек, затем быстро промывают водой и высушивают фильтровальной бумагой.

При бактериоскопии мазков в одном препарате исследуют 25 полей зрения. Прежде всего, обращают внимание на возможное наличие возбудителя сибирской язвы. Также оценивают количество микроорганизмов в мазке, их морфологические особенности, наличие спор и капсул, состояние ткани, из которой приготовлен мазок.

Органолептическое и микроскопическое исследование мяса на свежесть

Определение свежести мяса проводится в сомнительных, спорных случаях оценки доброкачественности, то есть при первых признаках порчи.

При этом свежесть мяса устанавливают по результатам комплекса исследований - органолептических, биохимических и микроскопических.

Отбор проб для определения свежести мяса имеет некоторые особенности. От каждой туши или полутуши сомнительной свежести берут для исследования 3 образца массой не менее 200 г каждый, целым куском из мышц 4-5 шейных позвонков, лопатки и бедра. Кроме мышечной ткани в образцах должны быть сухожилия и жир. Для исследования важно также, чтобы во взятых образцах имелось мясо из поверхностных слоёв туши (с корочкой подсыхания) и из глубоких слоёв (от кости).

При исследовании мяса на свежесть каждую отобранную пробу анализируют отдельно. Органолептические исследования проводят при естественном освещении. Заключение о свежести мяса или субпродуктов делают по результатам исследования, учитывая такие показатели, как внешний вид и поверхность туши, мышцы на разрезе, консистенция, запах, состояние жира, состояние сухожилий. Проводят также пробную варку мяса для определения запаха, вкуса и прозрачности бульона.

У свежего мяса корочка подсыхания бледно-розовая или бледно-красная, мышцы на разрезе слегка влажные, не оставляющие влажного пятна на фильтровальной бумаге; цвет, свойственный данному виду мяса; на разрезе мясо плотное, упругое, образующаяся при надавливании пальцем ямка быстро выравнивается. Запах свежего мяса специфический для каждого вида животных, жир не должен иметь запаха осаливания или прогоркания, мясной сок прозрачный. Сухожилия упругие, плотные, поверхность суставов гладкая, блестящая. У размороженного мяса сухожилия мягкие, рыхлые, окрашены в ярко-красный цвет.

У мяса сомнительной свежести поверхность местами увлажнена, слегка липкая, потемневшая, иногда может быть покрыта плесенью. Мышцы на разрезе влажные, оставляют влажное пятно на фильтровальной бумаге, слегка липкие, темно-красного цвета. У размороженного мяса с поверхности разреза стекает слегка мутноватый мясной сок. На разрезе мясо менее плотное и упругое. Образующаяся при надавливании ямка выравнивается медленно, в течение 1 мин. Запах слегка кисловатый или с оттенком затхлости. Жир сероватого оттенка, слегка липнет к пальцам, может иметь лёгкий запах осаливания. Сухожилия менее плотные, матово-белого цвета, суставная поверхность слегка покрыта слизью.

У несвежего мяса поверхность сильно подсохшая, покрыта серовато-коричневой слизью или плесенью. Мышцы влажные, оставляют влажное пятно на фильтровальной бумаге, липкие, красно-коричневые. У размороженного мяса с поверхности стекает мутный мясной сок. На разрезе

мясо дряблое. Образующаяся при надавливании пальцем ямка не выравнивается, жир мягкий, а у размороженного мяса - рыхлый, осалившийся. Запах кислый, или затхлый, или слабо гнилостный. Жир серовато-матового оттенка, при раздавливании мажется. Сухожилия размягчены, сероватого цвета, суставные поверхности покрыты слизью.

Степень свежести мяса устанавливают также, проводя пробу варки и оценивая прозрачность и аромат бульона.

Мясо и субпродукты, отнесенные к продуктам сомнительной свежести хотя бы по одному органолептическому признаку, подвергают микроскопическому и биохимическому исследованиям (см. курс ветеринарно-санитарной экспертизы продуктов животноводства).

Микроскопическое исследование мяса на свежесть также имеет некоторые особенности. Мазки-отпечатки для микроскопии необходимо приготовить из поверхностного слоя и из глубокого слоя пробы.

Для приготовления мазка-отпечатка из поверхностного слоя стерильными ножницами или скальпелем, придерживая пинцетом, надо вырезать кусочек мяса 2-3 г и приложить его внутренней срезанной стороной к предварительно профламбированной поверхности предметного стекла.

Для приготовления мазков-отпечатков из глубоких слоёв поверхность пробы мяса необходимо вначале простерилизовать: обработать спиртом и обжечь на пламени. Затем стерильным инструментом вырезают из глубины небольшие кусочки мяса размером 2 x 1,5 x 2,5 см и готовят препараты на предметных стёклах так, как это описано выше.

При микроскопическом исследовании мазков-отпечатков из глубоких слоёв мяса определение степени свежести проводят, учитывая следующие показатели (Таблица 12):

Таблица 12 - Определение свежести мяса при микроскопическом исследовании

| Степень свежести мяса | Результаты микроскопического исследования |
|-----------------------|---|
| Свежее | В поле зрения микроорганизмы не обнаружены или найдены лишь единичные кокки и палочки (до 10 микробных клеток). Следов распада мышечной ткани нет (плохая окрашиваемость фона препарата) |
| Сомнительной свежести | В поле зрения обнаружено от 11 до 30 кокков и палочек. Имеются следы распада мышечной ткани: ядра мышечных волокон в состоянии распада, исчерченность волокон слабо различима |
| Несвежее | В поле зрения обнаружено более 30 кокков и палочек. Преобладают микроорганизмы палочковидной формы. Распад мышечной ткани значительный: почти полное отсутствие ядер и полное исчезновение исчерченности мышечных волокон |

При расхождении результатов органолептического и биохимического или микроскопического анализов проводят повторное биохимическое исследование на вновь отобранных образцах. Результаты повторного анализа считают окончательными.

Первичный посев на питательные среды при бактериологическом исследовании мяса

При периодическом производственном контроле мяса и мясных продуктов определяют соответствие микробиологических показателей нормативам СанПиН. Регламентирование СанПиН по показателям микробиологического качества и безопасности пищевого сырья и продуктов питания, в том числе мяса и мясопродуктов, для большинства групп микроорганизмов осуществляют по альтернативному принципу, то есть нормируют массу продукта, в которой не допускается содержание БГКП, большинства условно-патогенных микроорганизмов, а также патогенных микроорганизмов, в том числе сальмонелл. В других случаях норматив отражает допустимое количество КОЕ в 1г (см³) продукта. Для того чтобы узнать конкретную массу пробы, которую надо использовать для первичного посева в питательную среду, следует обратиться к соответствующим показателям СанПиН.

Санитарно-гигиенические требования микробиологической безопасности мяса закреплены в соответствующих разделах СанПиН.

Таблица 13 – Гигиенические требования микробиологической безопасности мяса (Из Приложения 1 к СанПиН 2.3.2.1078-01,

утвержденным Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 14 ноября 2001 г. N 36)

| Индекс, группа продуктов | КМАФАнМ, КОЕ/г, не более | Масса продукта (г), в которой не допускается | | Дрожжи, КОЕ/г, не более | Плесени, КОЕ/г, не более | Примечание |
|---|--------------------------|--|--------------------------------|-------------------------|--------------------------|---|
| | | БГКП (колиформы) | Патогенные, в т.ч. сальмонеллы | | | |
| Мясо (все виды убойных животных): | | | | | | отбор проб из глубоких слоев |
| - парное в тушах, полутушах, четвертинах, отрубях | 10 | 1,0 | 25 | | | <i>L. monocytogenes</i> в 25 г не допускаются |
| - подмороженное мясо в тушах, полутушах, четвертинах, отрубях | 1×10^3 | 0,1 | 25 | | | то же |
| (в ред. Постановления Главного государственного санитарного врача РФ от 23.05.2008 N 30) | | | | | | |
| - мясо охлажденное в тушах, полутушах, четвертинах, отрубях | 1×10^3 | 0,1 | 25 | | | <i>L. monocytogenes</i> в 25 г не допускаются. Для продукции со сроком годности более 7 суток бактерии рода <i>Proteus</i> в 0,1 г не допускаются. Для производства продуктов детского, диетического (лечебного и профилактического) питания бактерии рода <i>Proteus</i> в 1,0 г не допускаются. |
| (в ред. Постановления Главного государственного санитарного воача РФ от 23.05.2008 N 301) | | | | | | |
| Мясо замороженное убойных животных: | | | | | | |

| | | | | | | |
|---|-----------------|--------|----|--|---------|---|
| - в тушах, полу- тушах, четвер- тинах, отрубях | 1×10^3 | 0,01 | 25 | | | <i>L. monocytogenes</i> в 25 г не допуска- ются |
| - блоки из мяса на кости, бескостного, жило- ванного | 5×10^5 | 0,001 | 25 | | | то же |
| - мясная масса после дообвалки костей убойных животных | 5×10^6 | 0,0001 | 25 | | | то же; пробо- подготовка без фламбирования поверхности |
| 1.1.1.3. Полу- фабрикаты мясные бескостные (охлажденные, подморожен- ные, заморо- женные), в том числе марино- ванные: | | | | | | |
| - крупнокусковы е | 5×10^5 | 0,001 | 25 | | | <i>L. monocytogenes</i> в 25 г не допускаются |
| - мелкокусковые | 1×10^6 | 0,001 | 25 | | | то же |
| 1.1.1.4. Полу- фабрикаты мясные рубленые (охлажденные, замороженные): | | | | | | |
| - формованные, в т.ч. панированные | 5×10^6 | 0,0001 | 25 | | 500 <*> | <i>L. monocytogenes</i> в 25 г не допускаются; <*> для полуфабрикатов панированных со сроком годности более 1 месяца |
| - фарш говяжий, свиной, из мяса других убойных жи- вотных | 5×10^6 | 0,0001 | 25 | | | <i>L. monocytogenes</i> в 25 г не допускаются |

Например, согласно *СанПиН 2.3.2.1078-01 (с изменениями СанПиН 2.3.2.1280-03)*, мясо охлажденное и подмороженное в тушах, полутушах,

четвертинах и отрубях должно содержать не более 1000 КОЕ/г МАФАнМ (т.е. не более 1000 микробных клеток в 1 г продукта из глубоких слоев. Недопустимо присутствие БГКП в 0,1 г, сальмонелл и листерий - в 25 г мяса. Следовательно, для первичного посева с целью определения КМАФАнМ следует использовать 1 г такого мяса, для определения БГКП использовать разведения продукта, соответствующие 0,1 г, для выявления сальмонелл и листерий - производить первичный посев из 25 г мяса.

Во всех других случаях бактериологического исследования мяса используют методику, изложенную в действующих ГОСТ 21237-75, мяса птицы - в ГОСТ 7702-74, мяса кроликов - в ГОСТ 20235-74.

Согласно методике, *изложенной в ГОСТ 21237-75*, вырезанные стерильными ножницами из глубины профламбированных проб кусочки мясной ткани, паренхиматозных органов и лимфатических узлов (см. выше) измельчают. Для этого составляют две пробы по 15 г каждая. Одна проба состоит из кусочков мышц и лимфатических узлов, а вторая - из кусочков паренхиматозных органов (печени, почек и селезенки). Каждую пробу в отдельности помещают в стерильный стакан (колбу) гомогенизатора для приготовления взвеси. В каждый стакан добавляют также по 15 см³ изотонического раствора NaCl, количество которого должно быть равно массе каждой пробы. Пробы гомогенизируют в электрическом гомогенизаторе. Вначале измельчают материал с замедленной частотой оборотов, затем с большей частотой. Время гомогенизации - не более 2,5 мин. 1 см³ приготовленной взвеси будет содержать 0,5 г продукта.

Полученную взвесь отстаивают 10 мин. Затем из верхней части надосадочной жидкости пастеровской пипеткой или бактериологической петлей вносят в чашки Петри с плотными питательными средами одну-две капли и тщательно втирают материал в поверхность среды.

При отсутствии гомогенизатора допускается *посев кусочками пробы* размером не менее 2,0 x 1,5 x 2,0 см отпечатком, путем нанесения отпечатков разными сторонами пробы на поверхность питательной среды в чашках Петри с предварительно подсушенными средами. Необходимо также произвести посев на элективные среды из лимфатического узла печени или соскоба с внутренней стенки желчного пузыря.

Посевы в среду обогащения при отсутствии гомогенизатора производят *измельченными кусочками проб*. В первый флакон или колбу с 50 см³ среды обогащения вносят измельченную пробу из мышц и лимфатических узлов массой 10 г, а во второй - пробу из паренхиматозных органов такой же массы.

При необходимости определения КМАФАнМ производят посев 1 см^3 приготовленной взвеси и 1 см^3 разведения этой взвеси 1:10 в изотоническом растворе NaCl глубинным способом в расплавленный и остуженный мясо-пептонный агар в чашках Петри.

Для выявления энтеробактерий для первичного посева используют элективные среды для энтеробактерий - Эндо, Левина, Плоскирева, бриллиантовый зеленый агар, ВСА-агар, XLD-агар, см. ГОСТ Р 52814-2007 (ИСО 6579:2002). Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*. Низкоселективные и высокоселективные среды используют в зависимости от предполагаемой загрязненности посевного материала посторонней микрофлорой.

Для выявления возбудителей зооантропонозов производят посев на поверхность МПА в чашках или используют специальные среды особого приготовления.

Одновременно с посевом на плотные среды производят посев материала в неселективную жидкую среду обогащения (**фосфатно-буферная среда**), а затем (через 18-24 ч) в **одну из селективных жидких сред обогащения** для накопления сальмонелл (селенитовый бульон, среду Раппопорта-Вассилиадиса с соей (RVS-бульон), Мюллер-Кауффман тетраэтилатный бульон, среду Киллиана и др., см. ГОСТ Р 52814-2007 (ИСО 6579:2002)). Для этого, как правило, 25 г измельченной массы из мышечной ткани и лимфатических узлов вносят в один флакон (колбу), а 25 г измельченной массы из паренхиматозных органов - в другой. В каждый флакон наливают по 225 см^3 первичной среды обогащения.

Следует учитывать, что согласно ГОСТ Р 52814-2007 при исследовании пищевых продуктов, подвергавшихся тепловой обработке

(колбаса, ветчина) предусмотрен первичный посев в неселективную жидкую среду - забуференную пептонную воду. Если же на содержание сальмонелл исследуют пищевой продукт или сырьё, не подвергнутое тепловой обработке, то посев сразу производят в одну из селективных сред обогащения.

В некоторых случаях по **ГОСТ 21237-75** можно производить первичный посев по 20 см^3 суспензии исследуемого продукта сразу в селективные жидкие среды обогащения, без использования фосфатно-буферной среды.

При исследовании мяса на свежесть дополнительно делают посев **для обнаружения роста *Proteus* по Шукевичу** в конденсационную воду скошенного мясопептонного агара.

Посевы инкубируют при температуре $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 24-48 ч.

Выявление бактерий вида *Listeria monocytogenes*

Выявление бактерий вида *Listeria monocytogenes* в настоящее время проводят согласно ГОСТ Р 51921-2002 Продукты пищевые. Метод выявления и определения бактерий *Listeria monocytogenes*.

Исследование мяса на присутствие анаэробов проводят только в том случае, когда есть подозрение на наличие анаэробных инфекций (эмкар, злокачественный отёк и т.д.). Материалом для исследования на присутствие возбудителей эмкара и злокачественного отёка являются кусочки пораженных мышц, отёчные ткани, лимфатические узлы, паренхиматозные органы. При подозрении на ботулизм исследуют содержимое желудка, толстого отдела кишечника, селезёнку, печень. Для посева берут 3-5 см³ приготовленной взвеси. Вносят в 4 пробирки со средой Китта-Тароцци, предварительно прогретой в кипящей водяной бане в течение 20-30 мин, а затем охлажденной до 50 °С. Две пробирки с посевами прогревают при 80 °С в течение 20 мин для выявления спор анаэробов.

Через 18-24 часа инкубирования при 37°С проводят учёт первичных посевов.

На практике при бактериологическом исследовании мяса обращают также внимание на рост на МПА мелких, прозрачных росинчатых колоний. Такие колонии образуют, как правило, три группы микроорганизмов: **возбудители рожи свиней, пастереллы и некоторые кокки**. Мазки из таких колоний окрашивают по Граму. При микроскопии выявляют либо кокки (грамположительные или грамотрицательные), либо грамположительные тонкие палочки (возбудители рожи свиней), либо грамотрицательные коккобактерии (пастереллы). В редких случаях наблюдается рост в виде росинчатых колоний ещё одной формы бактерий - грамположительных крупных палочек, легко отличимых от тонких, слегка изогнутых палочек возбудителей рожи свиней. Для росинчатых колоний возможен учет еще одного дифференцирующего признака: на среде Эндо возбудитель рожи свиней растёт, а пастереллы и кокки не растут. Дальнейшее исследование этих колоний проводят с использованием методов, предусмотренных ГОСТ.

Особенности санитарно-микробиологического исследования мяса птицы

На птицеводческих предприятиях тушки кур, цыплят, индеек, индюшат, уток, утят, гусей, цесарок, цесарят, перепелов, а также их потроха (печень, мышечный желудок, сердце), фасованное мясо, бескостное мясо (кусковое и механической обвалки сепарированием) от здоровой птицы

подвергают микробиологическому контролю после выработки или перед отгрузкой не реже двух раз в месяц, в также по показаниям производства и требованию ветсанслужбы.

Тушки птицы (с потрохами и внутренними органами) с признаками заболеваний, в сомнительных случаях для установления диагноза по патологоанатомической картине направляют в ветеринарные бактериологические лаборатории.

Для анализа мяса здоровой птицы от партии отбирают не менее трех тушек. Оценку результатов исследования проводят по каждой тушке в отдельности. Отбор проб от каждой тушки проводят одним из трех методов:

- методом вырезания кусочков мышц и других тканей из различных участков тушек;
- методом смыва со всей поверхности тушки смывной стерильной жидкостью;
- методом смыва с поверхности тушки тампоном.

Метод вырезания кусочков тканей (мышц) используют для выявления сальмонелл, а также для определения других микробиологических показателей тушки.

Масса отобранной пробы должна составлять не менее 100 г. Пробу измельчают, после чего 25 г продукта используют для исследования на сальмонеллы, а 10 г продукта служат исходным материалом для приготовления серии десятикратных разведений в исследованиях на другие предусмотренные микробиологические показатели (ОМЧ и др.).

Метод смыва со всей поверхности потрошеной тушки смывной стерильной жидкостью (водой), как и метод смыва тампоном, используют для оценки санитарного состояния производства. В смывах определяют микробиологические показатели: ОМЧ, споры клостридий и бацилл, а также другие микроорганизмы по показаниям производства. Оценку тушек птицы на наличие сальмонелл по анализу смывов не производят.

Отбор проб методом смыва со всей тушки проводят следующим образом. Тушку массой не более 0,5 кг помещают в новый пакет из полимерного материала, разрешенного Минздравом для контакта с пищевыми продуктами.

В пакет с тушкой наливают стерильную водопроводную воду в количестве, равном массе тушки, встряхивают содержимое пакета в течение 2 мин. Полученная смывная жидкость служит исходным материалом, из которого готовят серию десятикратных разведений. Расчет количества микроорганизмов проводят на 1 см³ смывной жидкости.

Отбор проб методом смыва стерильным тампоном применим к потрошеным тушкам любой массы. В связи со сложной конфигурацией поверхности тушки птицы применяют фламбированный проволочный металлический трафарет малой площадью (4 см^2).

С тушек птицы малых размеров, например, перепелов, смыв берут от разных участков тушки, при этом общая площадь смывной поверхности должна составлять 10 см^2 . Смыв осуществляют с разных участков тушки одним и тем же стерильным увлажненным тампоном.

Использованный тампон помещают пробирку с 10 см^3 стерильной жидкости (водопроводной воды, физраствора, пептонной воды), после чего жидкость тщательно перемешивают.

С тушек крупной птицы (кур, цыплят-бройлеров и др.) общая площадь смывной поверхности должна составлять 100 см^2 . При этом смыв осуществляют 2-5 тампонами и все их помещают в колбу с 100 см^3 стерильной жидкости (воды и др.- см. выше). Колбу с тампонами встряхивают в течение 2 мин. Смывная жидкость служит исходным материалом для серии десятикратных разведений. Расчет количества микроорганизмов проводят на 1 см^2 поверхности тушки. Отбор проб методами смывов допускается в помещении производственных цехов. Тушки, подвергнутые смывам, допускается использовать для пищевых целей. Для обнаружения сальмонелл на потрошенных и полупотрошенных тушках используют метод смыва тампоном со всей поверхности тушки. При этом с тушек массой до 3-х кг используют один стерильный тампон, увлажненный предварительно средой обогащения для сальмонелл (забуференной пептонной водой). После взятия смыва тампон помещают в пробирку с 10 см^3 пептонной воды.

С тушек массой более 3-х кг для смывов по всей поверхности используют несколько тампонов (число тампонов зависит от размера тушки); после взятия смыва все тампоны помещают в одну колбу со средой обогащения (пептонной водой) из расчета 10 см^3 среды на один тампон. Далее исследования проводят по принятой схеме.

Отбор проб потрохов и бескостного кускового мяса проводят следующим образом. От партии продукта каждого наименования отбирают из разных мест точечные пробы (10-50 г), помещают в стерильную посуду, составляют в ней общую пробу массой не менее 150 г. Измельчают с соблюдением правил асептики, тщательно перемешивают и отбирают навеску 25 г для посева на сальмонеллы и 10 г для приготовления серии десятикратных разведений. Для получения 1 разведения к 10 г мясной массы добавляют 90 см^3 стерильной воды или физраствора, или пептонной воды.

Для мышечных желудков и кускового мяса для определения микробиологических показателей, кроме выделения сальмонелл, допускается отбор проб методом смыва в полимерном пакете. При этом общую пробу одного наименования продукта массой не менее 150 г помещают в новый пакет, взвешивают, добавляют стерильную смывную жидкость в количестве, равном массе пробы. Встряхивают в течение 2 мин. 1 см³ смывной жидкости используют для серии последовательных десятикратных разведений.

Расчет количества микроорганизмов проводят для 1 г продукта или на 1 см³ смывной жидкости по массе, равной массе пробы продукта.

Полуфабрикаты из мяса птицы подвергают микробиологическому контролю после выработки или перед отгрузкой не реже 2 раз в месяц, а также по требованию ветслужбы.

От партии кусковых и рубленых одного наименования полуфабрикатов отбирают не менее трех образцов. Из них готовят общую среднюю пробу массой не менее 50 г. Для этого в стерильную посуду отбирают равные массы от каждого образца, кусочки мякотных тканей из разных участков полуфабрикатов, измельчают при соблюдении правил асептики. Из подготовленной средней пробы 25 г продукта используют для посева для выделения сальмонелл, а 10 г продукта - для серии последовательных десятикратных разведений.

Для кусковых полуфабрикатов допускается отбор проб от каждого образца методом смыва в новом полимерном пакете. Оценку результатов проводят по каждому образцу в отдельности. Каждый образец кускового полуфабриката помещают в отдельный пакет, взвешивают. В пакет с образцом наливают стерильную воду в количестве, равном массе исследуемого полуфабриката. Встряхивают в течение 2 мин. Смывную жидкость в количестве 1 см³ используют для приготовления серии десятикратных разведений. Образцы, подвергнутые смыву, пригодны для пищевых целей.

Микробиологические показатели исследуемых образцов должны соответствовать критериям, представленным в таблице 2

Таблица 14 - . Гигиенические требования микробиологической безопасности мяса птицы (Из Приложения 1 к СанПиН 2.3.2.1078-01, утвержденным Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 14 ноября 2001 г. N 36)

| Индекс, группа продуктов | КМАФАнМ, КОЕ/г, не более | Масса продукта (г), в которой не допускается | | Примечание |
|--|--------------------------|--|-------------------------------------|---|
| | | БГКП (колиформы) | Патогенные, в том числе сальмонеллы | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1.1.9.1. Тушки и мясо птицы | | | | Отбор проб из глубоких слоев мышц |
| - охлажденное | 1×10^4 | | 25 | <i>L. monocytogenes</i> в 25 г не допускаются |
| - замороженное | 1×10^5 | | 25 | <i>L. monocytogenes</i> в 25 г не допускаются |
| - фасованное охлажденное, подмороженное, замороженное | 5×10^6 | | 25 | тоже |
| 1.1.9.2. Полуфабрикаты из мяса птицы натуральные: | | | | |
| - мясокостные, бескостные без панировки | 1×10^5 | | 25 | <i>L. monocytogenes</i> в 25 г не допускаются |
| - мясокостные, бескостные в панировке, со специями, с соусом, маринованные | 1×10^6 | | 25 | то же |
| 1.1.9.5. Кожа птицы | 1×10^6 | | 25 | то же |
| 1.1.10.1. Субпродукты, полуфабрикаты из субпродуктов ПТИЦЫ | 1×10^6 | | 25 | <i>L. monocytogenes</i> в 25 г не допускаются |

Контрольные вопросы:

1. Экзогенное и эндогенное обсеменение мяса.
2. Санитарно-микробиологическое исследование мяса.
3. Характеристика СПМ мяса и мясных продуктов.
4. Правила отбора и хранения проб мяса и мясопродуктов для микробиологических исследований.
5. Санитарно-микробиологическое исследование мяса птицы.
6. Санитарно-микробиологическое исследование мяса сельскохозяйственных животных.

Тема 4.1. МИКРОФЛОРА МЯСА ПРИ ОХЛАЖДЕНИИ И ЗАМОРАЖИВАНИИ

Мясо и мясопродукты являются хорошей питательной средой для развития микроорганизмов. Поэтому в целях сохранения качества мяса и мясопродуктов их подвергают посолу, холодильному хранению и другим видам консервирования. На холодильниках и мясокомбинатах мясо и мясопродукты хранят при низких температурах в охлажденном и замороженном виде.

В процессе холодильного хранения в зависимости от температурных режимов хранения охлажденного и мороженого мяса происходят неодинаковые изменения количественного и группового состава микрофлоры, размножение которой может вызвать порчу продукта.

Микрофлора охлажденного мяса. Микрофлора мяса, поступающего на хранение в камеры охлаждения, разнообразна по составу и обычно представлена мезофилами, термофилами и психрофилами, т. е. микроорганизмами, имеющими неодинаковые температурные пределы роста.

К концу охлаждения в глубоких слоях мяса температура должна достигать 0-4°C. Следовательно, на охлажденном мясе в процессе хранения могут развиваться только те микроорганизмы, которые имеют наиболее низкие температурные пределы роста и размножения, т. е. психрофильные.

Термофильные и большинство мезофильных микроорганизмов, которые не развиваются при температурах, близких к 0°C, после охлаждения мяса полностью приостанавливают свою жизнедеятельность, переходя в анабиоз. В процессе последующего хранения продукта эти микроорганизмы постепенно отмирают и, следовательно, их количество уменьшается. Но некоторые патогенные и токсигенные бактерии из группы мезофилов (сальмонеллы, токсигенные стафилококки и др.) длительное время сохраняют жизнеспособность при низких температурах и не отмирают при хранении охлажденного мяса.

Размножение микроорганизмов в мясе при низких температурах проходит несколько фаз (лаг-фазу, логарифмическую фазу, максимальную стационарную фазу и фазу отмирания). В начальный период хранения охлажденного мяса психрофильные микроорганизмы, находясь в лаг-фазе (фазе задержки роста), некоторое время не размножаются или их размножение происходит в очень незначительной степени. По этой причине состав микрофлоры мяса в этот период почти не изменяется.

Продолжительность фазы задержки роста психрофильных микроорганизмов зависит от того, при какой температуре находилось мясо перед поступлением на хранение. Если мясо поступает из камер с более низкой температурой (3-4°C) и в нем содержатся психрофильные микроорганизмы в состоянии активного роста, то лаг-фаза будет менее продолжительной.

На продолжительность фазы задержки роста психрофилов влияют также скорость охлаждения, температура и влажность воздуха при хранении мяса. При резком и быстром охлаждении, более низкой температуре и влажности лаг-фаза увеличивается.

На длительность лаг-фазы существенно влияет степень обсемененности микроорганизмами мясных туш, поступивших на хранение. Чем ниже степень обсемененности мяса, тем более длительной будет задержка роста находящихся на нем микроорганизмов. При соблюдении установленного температурно-влажностного режима (относительная влажность 85-90%, температура воздуха от -1 до 1°C) на охлажденном мясе, полученном в результате убоя здоровых, отдохнувших животных с соблюдением всех основных санитарных правил и имеющем обычно незначительную микробную обсемененность, размножение микроорганизмов задерживается на 3-5 дней и более. При высокой степени загрязнения мяса микроорганизмами фаза задержки роста микроорганизмов сокращается до 1 сут., а иногда составляет всего несколько часов.

По истечении лаг-фазы начинают усиленно размножаться психрофильные микроорганизмы (логарифмическая фаза) и их число резко возрастает.

В зависимости от условий хранения охлажденного мяса (определенных температур, газового состава атмосферы и влажности воздуха) наиболее активно размножаются только некоторые психрофильные микроорганизмы, для развития которых эти определенные условия хранения оказались наиболее благоприятными. Остальные психрофилы вследствие недостаточной влажности и пониженной температуры, газового состава атмосферы, непригодного для их развития, или в результате подавления их роста другими видами психрофильных микроорганизмов, обладающими антагонистической способностью, не размножаются и постепенно отмирают. Психрофильные микроорганизмы, способные активно размножаться, со временем становятся преобладающими в составе микрофлоры продуктов, хранящихся в данных условиях.

На охлажденном мясе в аэробных условиях хранения размножаются неспорообразующие грамотрицательные бактерии рода псевдомонас и ахромобактер, а также плесневые грибы и аэробные дрожжи, преимущественно родов родоторула (*Rodotorula*) и торулопсис. Активность развития той или иной группы этих психрофильных микроорганизмов зависит от температурно-влажностного режима хранения мяса.

В условиях, неблагоприятных для развития психрофильных аэробных бактерий (пониженная влажность и более низкая температура хранения), наблюдается активный рост плесневых грибов и аэробных дрожжей, которые имеют более низкие температурные пределы роста и менее требовательны к влажности.

Если при хранении охлажденного мяса в процессе холодильной обработки применяют дополнительные средства (частичную замену воздуха диоксидом углерода, полную замену воздуха азотом, вакуумную упаковку), то создаются условия, неблагоприятные для развития аэробных микроорганизмов (аэробные бактерии, плесневые грибы, аэробные дрожжи). Размножение этих психрофильных микроорганизмов задерживается или полностью подавляется. В таких условиях хранения активно размножаются психрофильные микроаэрофильные и факультативно-анаэробные лактобациллы и микробактерии, а также факультативно-анаэробные грамотрицательные бактерии рода аэромонас, способные развиваться в анаэробных условиях.

При активном размножении микроорганизмов в результате их жизнедеятельности в конце стационарной фазы может наступить порча охлажденного мяса.

Микрофлора мороженого мяса. Во время замораживания мяса отмирают микроорганизмы, содержащиеся в охлажденном мясе. Кроме низкой температуры на микроорганизмы губительно действуют высокая концентрация растворенных в продукте веществ и пониженная влажность, создающиеся в результате вымерзания воды, изменение содержащихся в клетках белков и механическое действие льда, образующегося вне клетки, а при быстром замораживании – и внутри клетки.

Микроорганизмы отмирают как в процессе замораживания мяса, так и в процессе его последующего хранения в замороженном состоянии. Отмирание микроорганизмов во время замораживания находится в прямой зависимости от скорости и степени понижения температуры. Чем ниже температура ($-18...-20^{\circ}\text{C}$) и выше скорость замораживания, тем

больше погибает микроорганизмов. При медленном неглубоком замораживании до температуры не ниже $-10...-12$ °С микроорганизмов отмирает значительно меньше.

При одинаковых условиях замораживания скорость отмирания микроорганизмов зависит от видовой и родовой принадлежности, возраста и состояния микробных клеток в момент замораживания. Неспорообразующие бактерии и вегетативные клетки спорообразующих бактерий погибают быстрее, чем споры. Среди неспорообразующих бактерий энтерококки и стафилококки более устойчивы к замораживанию, чем, например, такие, как палочка протей и кишечная палочка. Наиболее устойчивы к действию низких температур плесневые грибы и дрожжи. Молодые микробные клетки менее стойки, чем старые. Этим можно объяснить тот факт, что аэробные психрофильные бактерии отмирают во время замораживания быстрее, чем мезофильные, поскольку клетки последних находятся в охлажденном мясе в состоянии анабиоза, а клетки психрофильных – молодые.

В процессе хранения мороженого мяса отмирание микроорганизмов, выживших при замораживании, замедляется. Скорость отмирания микроорганизмов при хранении мороженого мяса в отличие от замораживания находится в обратной зависимости от температуры: чем ниже температура, тем медленнее происходит отмирание. При $-18...-20$ °С микроорганизмов отмирает значительно меньше, чем при $-10...-12$ °С.

Несмотря на то, что при замораживании и хранении уменьшается число жизнеспособных микробных клеток, полного отмирания микроорганизмов в мороженом мясе не происходит. Даже после длительного хранения мороженого мяса оно не становится стерильным и может содержать много живых сапрофитных микроорганизмов – возбудителей порчи, а иногда и патогенных бактерий. Большинство плесневых грибов и дрожжей на мороженом мясе при -18 °С не погибают в течение 3 лет. При $-15...-20$ °С токсигенные стафилококки сохраняют жизнеспособность на мороженом мясе до 30 дней, а сальмонеллы – до 6 мес. и более. При -20 °С содержание кишечной палочки уменьшается только через 6 мес., а энтерококков остается практически постоянным в течение 9 мес. хранения мороженых продуктов.

Минимальная предельная температура роста психрофильных микроорганизмов выше -10 °С, поэтому при хранении мяса ниже -10 °С психрофилы, как и мезофильные микроорганизмы, не размножаются, а частично отмирают. В соответствии с этим по действующей в нашей стране технологической инструкции мороженое мясо рекомендуется

хранить при $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ и ниже, что позволяет сохранять его практически неограниченное время без признаков порчи.

При температуре хранения выше $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ на мясе могут размножаться психрофильные микроорганизмы (преимущественно плесневые грибы), которые менее чувствительны к пониженной влажности и высокой концентрации растворенных в продукте солей, создающихся в результате вымерзания воды. При температурах, близких к $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($-5\text{...}-10\text{ }^{\circ}\text{C}$), размножаются плесени гроздевидная и тамнидиум; при температурах около $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ и выше – плесени кистевидная и головчатая. Некоторые дрожжи также растут на мясе при температуре около $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$. При $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ и выше на мороженом мясе иногда размножаются отдельные виды бактерий.

Развиваясь на мороженом продукте при температурах выше $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, микроорганизмы могут вызывать во время длительного хранения его порчу.

Микроорганизмы, выжившие в процессе хранения мороженого мяса, при его оттаивании начинают размножаться, так как происходят выделение мышечного сока и увлажнение поверхности, т. е. создаются благоприятные условия. Интенсивность размножения микроорганизмов во многом зависит от способа замораживания. При медленном неглубоком замораживании в мышечной ткани образуются крупные кристаллы льда, что обуславливает разрыв оболочек большого количества клеток мышечных волокон и выделение значительного количества мышечного сока. В результате быстрого глубокого замораживания в мышечной ткани образуются мелкие кристаллы льда, которые не травмируют оболочек окружающих их клеток ткани. После оттаивания мышечный сок проникает обратно в мышечные волокна и почти не выделяется. На активность размножения микроорганизмов во время размораживания влияет также температура.

Если размораживание проводят при повышенной температуре ($20\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$), то к тому времени, когда оттают глубинные участки мышечной ткани, на поверхности туши происходит интенсивное размножение микробов. При медленном размораживании (низкой плюсовой температуре $1\text{--}8\text{ }^{\circ}\text{C}$) микроорганизмы размножаются на поверхности мясных туш менее активно.

Тема 4.2. МИКРОФЛОРА МЯСА И МЯСОПРОДУКТОВ ПРИ ПОСОЛЕ

Посол – это способ консервирования и технологическая операция в колбасном производстве, в результате которого мясопродукты приобретают характерные запах, вкус и окраску.

При посоле под влиянием высокой концентрации хлорида натрия, пониженной температуры и антагонистических взаимоотношений микроорганизмов различных видов резко изменяется количественный и групповой состав микрофлоры мяса. Наиболее существенные изменения обусловлены воздействием хлорида натрия. Он оказывает консервирующее действие, задерживая развитие многих микроорганизмов, что объясняется одновременным действием нескольких факторов:

Создаваемое солью высокое осмотическое давление вызывает обезвоживание тканей продукта. Вследствие обезвоживания и проникновения хлорида натрия снижается показатель а/у (активность воды), в результате чего нормальная жизнедеятельность многих организмов невозможна, они переходят в анабиотическое состояние, а иногда гибнут; выделяемые из поваренной соли ионы хлора нарушают протеолитическую ферментативную деятельность микроорганизмов. Например, палочка протей может размножаться в продукте при концентрации соли 9-10%, а разжижает желатин только при содержании хлорида натрия в количестве 2-3 %; в результате плохой растворимости кислорода в рассоле создается низкая его концентрация, вследствие чего замедляется размножение аэробных микроорганизмов. При продувании рассола кислородом количество бактерий в нем увеличивается примерно в 10 раз. Но, поскольку многие микроорганизмы, содержащиеся в рассоле, являются факультативными анаэробами, недостаток кислорода не может иметь решающего значения для задержки их размножения.

В мясе и рассоле могут содержаться микроорганизмы, имеющие различную чувствительность к хлориду натрия:

– несолелюбивые (негалофильные), которые размножаются только при 1-2% и полностью прекращают свое развитие при 6-10% соли. К этой группе относят многие неспорообразующие грамотрицательные гнилостные бактерии, многие патогенные и токсигенные микроорганизмы;

– солеустойчивые (солетолерантные) хорошо размножаются при небольших концентрациях (1-2 %), дают слабый рост в средах, содержащих до 6-8 % хлорида натрия, и длительное время сохраняют жизнеспособность при высоких его концентрациях. К ним относят многие гнилостные аэробные бациллы, анаэробные клостридии, кокки, некоторые молочнокислые и патогенные бактерии;

– солелюбивые (галофилы) бывают двух типов: облигатные и факультативные. Облигатные размножаются только при высоких концентрациях соли (от 12 % и выше) и совсем не растут на средах с низким содержанием хлорида натрия. Факультативные растут достаточно хорошо как при высоких концентрациях, так и в присутствии 1-2 % соли. Галофилами являются многие плесени, некоторые дрожжи, многие пигментные микрококки, некоторые пигментные палочковидные бактерии и др.

В процессе посола наиболее чувствительные к высоким концентрациям хлорида натрия микроорганизмы (негалофильные) полностью приостанавливают свое развитие, не размножаются и частично отмирают. Жизнедеятельность солетолерантных микроорганизмов не всегда подавляется. Некоторые из них, например, молочнокислые бактерии, постепенно адаптируются к высокой концентрации хлорида натрия, начинают размножаться. Солелюбивые микроорганизмы могут активно размножаться при высоких концентрациях поваренной соли, используемых для посола мясопродуктов. Поскольку значительная часть микроорганизмов, содержащихся в рассоле, способна размножаться при высоких концентрациях хлорида натрия, посол следует проводить при пониженной температуре (не выше 3-5°C). В этом случае обеспечивается подавление жизнедеятельности этих микроорганизмов.

Хлорид натрия обладает в основном бактериостатическим, а не бактерицидным действием. Поэтому многие микроорганизмы, не способные размножаться при высоких концентрациях хлорида натрия, сохраняют свою жизнеспособность в условиях посола продолжительное время. Могут выживать некоторые патогенные бактерии, попадающие в рассол при посоле мяса больных животных. Например, листерии выживают в 24%-ных рассолах более года, возбудитель рожи свиней и сальмонеллы – несколько месяцев. Бруцеллы сохраняют свою жизнеспособность при посоле до 2 мес. Следовательно, посол не является надежным способом обезвреживания мяса, полученного от больных животных. Для посола необходимо использовать только мясо от

здоровых, отдохнувших перед убоем животных, благополучное в санитарном отношении.

Под влиянием соли микроорганизмы в процессе посола могут изменять свои свойства. Например, сальмонеллы становятся похожими на сапрофитных бактерий группы кишечных палочек.

Через 30 дней посола при высеве на среду Эндо вместо характерных для сальмонелл мелких бесцветных колоний они дают рост в виде крупных красных колоний и не агглютинируются специфическими сальмонеллезными сыворотками. Поэтому из солонины редко удается выделить сальмонелл.

В процессе посола изменяется количественный и качественный состав микрофлоры рассола и мясопродуктов. В результате размножения микробов, адаптированных к условиям посола, общее количество микроорганизмов в рассоле возрастает в десятки раз и достигает в конце посола сотен тысяч и миллионов микробных клеток в 1 мл. Количество микроорганизмов в мясе в течение первых 3-4 недель посола также увеличивается, а затем начинает постепенно уменьшаться.

Качественный состав микрофлоры изменяется как в результате подавления жизнедеятельности одних и преимущественного развития других микроорганизмов, так и вследствие приспособления некоторых микроорганизмов к условиям посола.

Микрофлора рассола и соленых мясопродуктов имеет свою специфику. В рассолах и солонине обнаруживают различные галофильные и солеустойчивые микрококки, солеустойчивые штаммы бактерий из родов псевдомонас и ахромобактер, солеустойчивые молочнокислые бактерии, кишечную палочку, энтерококки и грамположительные аэробные бациллы. Все эти микроорганизмы составляют основную микрофлору рассолов и соленых мясопродуктов.

В доброкачественных рассолах и солонине обычно преобладают микрококки, молочнокислые бактерии и некоторые виды неспорообразующих грамотрицательных палочек.

При посоле окороков в производственных заливочных рассолах к концу процесса микрофлора бывает обычно представлена главным образом молочнокислыми бактериями. Их количество в 1 мл рассола может достигать 80-90% общего числа обнаруженных микроорганизмов. Кроме молочнокислых бактерий в состав основной микрофлоры заливочных рассолов, как правило, входят микрококки.

Многие штаммы молочнокислых бактерий (в основном лактобацилл) и микрококков обладают выраженным антагонистическим действием по отношению к гнилостным микробам.

Большое количество лактобацилл и микрококков – активных антагонистов гнилостных микробов – обнаруживают в старых производственных рассолах хорошего качества. Устойчивость таких рассолов в значительной степени обусловлена активным размножением этих микроорганизмов и наличием определенного биологического равновесия в биоценозе рассола. Подавляя развитие гнилостных бактерий, микробы-антагонисты предохраняют продукты от порчи в процессе посола. Таким образом, микробный антагонизм наряду с действием поваренной соли, пониженной температурой также является одним из важных консервирующих факторов, действующих на микроорганизмы при посоле мяса и вызывающих изменение микробиологических процессов.

Посол окороков и получение продукта с хорошо выраженными органолептическими свойствами связаны с жизнедеятельностью микроорганизмов, и в частности с молочнокислыми бактериями и микрококками. В результате их жизнедеятельности накапливаются и изменяются карбонильные соединения (ацетон, диацетил), летучие жирные кислоты, спирты, аминокислоты и другие метаболиты, играющие определенную роль в образовании специфического аромата и вкуса ветчинности, а также улучшении цвета продукта.

При нарушении температурного режима посола, недостатке соли, высокой контаминации сырья, нарушении санитарно-гигиенических условий производства в результате активного размножения микроорганизмов может наступить порча рассола и соленых мясопродуктов.

При порче рассола изменяются запах (вместо ароматного и чистого – затхлый, гнилостный или кисловатый и т. д.) и вкус (прогорклый, кислый). В недоброкачественном рассоле происходит сильное помутнение и выпадают хлопья, образуются стойкая пена и поверхностная пленка, изменяется цвет (от коричневого до красно-бурого или зеленоватого при закисании). По сравнению с доброкачественным в испорченном рассоле отмечается более высокий уровень pH (выше 7,0) и более низкий окислительно-восстановительный потенциал (rH_2). При постановке редуктазной пробы с метиленовым голубым (по Деброт), которая применяется для определения rH_2 рассола, в доброкачественном

рассоле метиленовый голубой обесцвечивается только через 1 ч, тогда как в испорченном рассоле – в течение 5-30 мин.

У недоброкачественной солонины изменяется цвет от розового или темно-красного до серо-зеленого или коричневого, консистенция продукта дряблая и рыхлая, запах неприятный, гнилостный, мясной сок мутный. Жир у такой солонины мажущийся, с прогорклым запахом, темно-желтого или грязно-серого цвета.

Возбудителями порчи рассолов и мясопродуктов чаще всего являются бактерии родов ахромобактер, спириллум, вибрио, иногда лактобациллы, микрококки, бактерии рода лейконосток, энтерококки и плесени. Кроме этих микроорганизмов в начальной стадии порчи рассолов в них обнаруживают в небольших количествах бактерии группы кишечных палочек, рода протеус, стрептококки, анаэробные клостридии и аэробные бациллы, которые хотя и не способны активно размножаться при посоле вследствие повышенной чувствительности к высоким концентрациям соли, однако также могут участвовать в процессе порчи рассолов.

Соленые мясопродукты с незначительными признаками порчи после зачистки направляют на немедленную промышленную переработку, а при значительном поражении – на техническую утилизацию.

Рассолы, применяемые для посола мясопродуктов, не должны содержать сальмонелл и других патогенных микроорганизмов, поскольку многие патогенные бактерии, в том числе сальмонеллы, обладают значительной устойчивостью к хлориду натрия. В шприцовочных рассолах должны отсутствовать анаэробные клостридии и аэробные бациллы. Наличие энтерококков допускается только в очень незначительных количествах (более чем в 50 мл), так как они могут вызывать закисание рассолов и мясопродуктов. В заливочных рассолах после прогревания при 100°С в течение 5 мин энтерококки не должны содержаться в 500 мл, а споры анаэробных клостридии и аэробных бацилл – в 50 мл рассола.

Тема 5 Микробиология производства мясных, мясорастительных, растительных и молочных консервов.

Технологический процесс производства мясных и мясорастительных консервов состоит из ряда операций: подготовки сырья к закладке в банки, закладки сырья и вспомогательных материалов в банки и порционирования, удаления воздуха из банок, закатки банок, проверки герметичности, стерилизации, охлаждения, хранения. Продукты, подготовленные к стерилизации, всегда содержат микроорганизмы, которые попадают в них из различных источников. Уничтожение микроорганизмов в процессе стерилизации в значительной степени зависит от термоустойчивости микроорганизмов, степени микробной контаминации консервируемых продуктов и других условий, влияющих на выживаемость микроорганизмов при высоких температурах. Остаточная микрофлора готовых консервов в процессе хранения может отрицательно влиять на качество продуктов и вызывать их порчу.

Пути контаминации консервируемых продуктов

Рассмотрим изменение состава микрофлоры при подготовке сырья, его закладке в банки и стерилизации, так как при других технологических операциях микрофлора не изменяется. Обсеменение консервируемых продуктов микроорганизмами происходит за счет микрофлоры сырья, используемого для консервирования, а также из различных источников в процессе его подготовки для закладки в банки, при закладке в банки и порционировании.

Сырье и его подготовка. Сырьё для консервов всегда в той или иной степени обсеменено различными сапрофитными микробами, в том числе возбудителями порчи консервов (анаэробными клостридиями и термофильными бациллами), а иногда токсигенными и патогенными микроорганизмами (палочкой перфрингенс, токсигенными стафилококками, сальмонеллами и др.). При изготовлении мясорастительных консервов кроме мясного используют также растительное сырьё (бобы, фасоль, горох и др.), которое может быть источником обсеменения продукта микроорганизмами. На поверхности гороха, фасоли и другого растительного сырья обычно обнаруживают десятки и сотни тысяч микробов. Основную микрофлору растительного сырья составляют почвенные спорообразующие микроорганизмы – аэробные бациллы, анаэробные клостридии, в том числе иногда возбудитель ботулизма - палочка ботулиnum. Следовательно, мясо и растительное

сырье – это основные источники микрофлоры консервируемых продуктов, от загрязненности которых в значительной степени зависит степень обсеменения продукта микроорганизмами до стерилизации. Поэтому при производстве консервов к мясному сырью предъявляют более высокие требования, чем при производстве колбас. Для выработки мясных консервов можно использовать мясо и субпродукты, полученные от здоровых, упитанных животных. Нельзя применять сырье, плохо обескровленное, загрязненное, дважды замороженное, условно годное. Мясное и растительное сырье обсеменено микроорганизмами в основном с поверхности. Поэтому непосредственно перед переработкой его необходимо подвергнуть тщательной санитарной обработке (зачистке и мойке). При этом вода, используемая для мойки сырья, должна соответствовать требованиям ГОСТа на питьевую воду и не содержать спор анаэробных клостридии в 100 мл. При подготовке мясного сырья к закладке в банки, т. е. при разделке, обвалке и жиловке мяса, происходит его дальнейшее обсеменение микроорганизмами. Источниками обсеменения могут стать инструменты, обвалочные столы и другой инвентарь, тара, руки и спецодежда рабочих, воздух производственных помещений. Следовательно, степень обсеменения подготавливаемого сырья микроорганизмами находится в прямой зависимости от санитарно-гигиенических условий производства.

Закладка сырья и вспомогательных материалов в банки и порционирование. В процессе закладки плотных составных частей продукта (мясо, растительное сырье, пряности), заливки жидких составных частей (бульон, соус) и доведения массы нетто до стандартной (порционирование) контаминации консервируемого сырья повышается. При этом источниками обсеменения могут быть руки рабочих или оборудование (наполнительные машины), а также вспомогательные материалы (пряности, соль, сахар, бульонная добавка и др.), которые всегда содержат микроорганизмы. Пряности обычно содержат в большом количестве микроорганизмы. Общая микробная обсемененность пряностей (перец, лавровый лист, кориандр, гвоздика и др.) часто составляет десятки и сотни тысяч и миллионы микробных клеток в 1 г. Преобладают различные виды аэробных бацилл и анаэробных мезофильных и термофильных клостридий. Наиболее сильно обсеменены микроорганизмами молотые пряности.

Соль и, особенно, сахар часто бывают обсеменены (до 80 % случаев) различными спорообразующими микроорганизмами, главным

образом мезофильными аэробными бациллами и анаэробными клостридиями.

Жир-сырец, добавляемый в консервы, содержит бесспорные микроорганизмы; топленый жир – споры многих аэробных и анаэробных микроорганизмов; бульонная заливка – спорообразующие термофильные микроорганизмы, попадающие в нее из трубопроводов бульоноварочных установок, где они могут размножаться. При внесении вспомогательных материалов консервируемые продукты обсеменяются главным образом термоустойчивыми микроорганизмами, что затрудняет их стерилизацию.

Дополнительным источником обсеменения продукта микроорганизмами в некоторых случаях может быть консервная тара (банки). До санитарной обработки на поверхностях консервных банок имеются различные кокковые бактерии, мезофильные аэробные бациллы и анаэробные клостридий, неспорообразующие гнилостные бактерии, плесени, дрожжи, актиномицеты и бактерии группы кишечных палочек. Поэтому перед использованием консервные банки следует тщательно мыть и пропаривать.

Стерилизация. Стерилизация консервов – заключительный этап технологического процесса консервирования. Под стерилизацией подразумевается различная степень нагревания продукта, приводящая к получению микробиологически стабильного консервированного продукта, не содержащего микроорганизмов, способных развиваться в нем во время хранения в определенных температурных условиях. Основная цель стерилизации консервов – уничтожение патогенных и токсигенных микроорганизмов, а также микроорганизмов, способных вызвать порчу продукта.

Режим стерилизации, регламентированный технологическими инструкциями, устанавливают в зависимости от вида консервов, размера консервной тары, условий хранения. Мясные консервы стерилизуют при 112-120°C. Уничтожение микробов при стерилизации является функцией времени и температуры. Чем выше температура, тем быстрее гибнут микроорганизмы. Однако, несмотря на воздействие высоких температур, в консервах после стерилизации могут сохраняться жизнеспособные микробные клетки, т. е. не всегда достигается полная стерильность всех банок. Поэтому при выработке различных видов консервов ориентируются обычно на консервированный продукт, удовлетворяющий требованиям промышленной стерильности. В консервированном продукте промышленной стерильности допускается присутствие только

ограниченного числа видов спорообразующих микроорганизмов. В нем должны отсутствовать микроорганизмы и вещества микробиологического происхождения, опасные для здоровья людей, а также микроорганизмы, способные развиваться и вызывать порчу продукта при температуре хранения, установленной для данного вида консервов.

Надежность термического консервирования, т. е. эффективность стерилизации консервов, зависит от продолжительности и температуры нагревания, а также от ряда показателей, влияющих на выживаемость микроорганизмов в процессе стерилизации: количественного и группового состава микрофлоры и физико-химических свойств консервируемого продукта, в частности его консистенции, рН среды, содержания в нем жира, хлорида натрия и сахара.

Существенно влияет на эффективность стерилизации консервов групповой состав микрофлоры продукта, т. е. то, какие микроорганизмы присутствуют в консервируемом продукте, какова их устойчивость к высоким температурам. Термоустойчивость микроорганизмов в значительной степени зависит от их родовой и видовой принадлежности, физиологического состояния клеток или спор. Неспорообразующие бактерии менее устойчивы к нагреванию, чем спорообразующие. Термоустойчивость бактериальных спор может в 10^3 раз превышать термоустойчивость вегетативных клеток. Устойчивость к высоким температурам среди неспорообразующих бактерий тоже неодинакова. Например, кокки более термоустойчивы, чем палочковидные бактерии. Молодые микробные клетки чувствительнее к воздействию высоких температур, чем старые. Споры различных видов спорообразующих микроорганизмов обладают неодинаковой устойчивостью к высоким температурам. Так, споры многих мезофильных аэробных бацилл отмирают уже при 100°C , тогда как споры сенной палочки могут сохранять жизнеспособность при 130°C . Устойчивы к действию высоких температур также споры термофильных аэробных бацилл, сохраняющих жизнеспособность при $125-130^{\circ}\text{C}$. Споры анаэробных микроорганизмов отмирают при высоких температурах медленнее, чем споры аэробов. Споры разных штаммов одного и того же вида микроба также могут иметь неодинаковую устойчивость к высоким температурам. Наиболее термоустойчивыми являются зрелые покоящиеся споры. Следовательно, результаты стерилизации во многом зависят от того, какова устойчивость микроорганизмов, содержащихся в продукте, к температурам, применяемым при его консервировании.

В не меньшей степени на результаты стерилизации влияет количественный состав микрофлоры, т. е. общее количество микроорганизмов и их спор, содержащихся в консервируемом продукте. Чем выше начальная микробная контаминация консервов, тем больше времени требуется для полного уничтожения микроорганизмов и тем больше их может выжить при нагревании.

При значительной микробной контаминация продукта перед стерилизацией увеличивается вероятность попадания в банки термоустойчивых спор, а следовательно, эффективность стерилизации при прочих равных условиях зависит от числа микроорганизмов, содержащихся в стерилизуемом продукте.

Скорость отмирания микроорганизмов в процессе стерилизации зависит также от консистенции и гомогенности продукта. В консервах, имеющих жидкую консистенцию, образуются конвекционные токи, в результате чего температура при стерилизации быстро становится почти одинаковой во всех частях банки. При плотной консистенции продукта конвекция затруднена и тепло в основном распространяется вследствие теплопроводности банки, поэтому температура в разных точках продукта неодинакова. В периферических зонах она выше, чем в центре банки. Например, при одинаковых условиях стерилизации в банке с зеленым горошком температура 110°C достигается через 25 мин, а в банке с мясом – только через 50 мин. Поскольку консервы, имеющие жидкую заливку, быстрее прогреваются, то микроорганизмы в них гибнут быстрее, чем в сухих плотных консервах.

При стерилизации консервов от концентрации водородных ионов в среде в значительной степени зависит термоустойчивость микроорганизмов. В продуктах с нейтральной и слабощелочной реакцией среды большинство спорообразующих микроорганизмов обладают максимальной устойчивостью к высоким температурам. Например, палочка ботулиnum сохраняет свою жизнеспособность при pH 6,3-6,9, а сенная палочка – при 6,8-7,6.

Кислая реакция ускоряет денатурацию белков и отмирание микроорганизмов, а также вызывает снижение термоустойчивости вегетативных микробных клеток и их спор. Чем выше кислотность продукта, тем большее влияние она оказывает на снижение термоустойчивости микроорганизмов и, следовательно, их гибель наступает при менее высокой температуре.

На устойчивость микроорганизмов к высоким температурам влияет также наличие жира в консервируемом продукте. Жир – плохой проводник тепла – способствует выживанию микроорганизмов при стерилизации. Жир проводит тепло в 1,82 раза медленнее, чем мясо. При увеличении содержания жира в мясных консервах понижается теплопроводность продукта, а термоустойчивость микробных клеток повышается. На поверхности микробных клеток образуется гидрофобная пленка жира, которая препятствует проникновению воды в клетку и тем самым защищает белки цитоплазмы от денатурации. При этом создаются условия, близкие к условиям стерилизации “сухим жаром”, в силу чего для уничтожения микробов требуется более продолжительное время. Например, споры сенной палочки в бульоне при 106°С погибают через 10 мин, тогда как в животном жире даже при 150°С – только через 1 ч. Бактерии группы кишечных палочек в бульоне при 100°С гибнут моментально, а в масле при этой же температуре – только через 30 мин. После прогревания в течение 10 мин при 100°С в мясе без жировой ткани от общего количества микробов, содержащихся до нагревания, сохраняется только 1% жизнеспособных клеток, в мясе с 5% жира – до 6, а в мясе с 15% жира – около 9%.

Присутствие соли в консервируемом продукте влияет на термоустойчивость микроорганизмов в зависимости от ее концентрации и вида микробов.

Небольшие концентрации хлорида натрия (1-2%) повышают устойчивость к высокой температуре многих микроорганизмов и их спор, в том числе палочки ботулинум. Наивысший эффект действия соли на термоустойчивость некоторых споровых (картофельная палочка, палочка спорогенес) и беспоровых микроорганизмов – микрококков, лактобацилл и др. – наблюдается при концентрации соли 5,8%. Споры палочки перфрингенс наиболее устойчивы к нагреванию в присутствии 3% хлорида натрия.

Значительные концентрации соли (выше 10%) оказывают обратное действие, т. е. уменьшают термоустойчивость палочки перфрингенс, палочки ботулинум и других микроорганизмов.

Повышение термоустойчивости микроорганизмов при небольших концентрациях хлорида натрия объясняется осмотическим отсасыванием влаги из микробных клеток, в результате чего их устойчивость к нагреванию повышается. Если же концентрация соли достигает 10 %, то начинает проявляться ее высаливающее действие на белки, что приводит

к снижению термоустойчивости микробов и их спор. Сахар в небольших концентрациях (2-18%) заметно не влияет на устойчивость микроорганизмов к высоким температурам. Сахар в несколько больших концентрациях (30%) оказывает защитное действие на дрожжи и плесени. Высокие концентрации сахара (70 %) повышают устойчивость многих микроорганизмов, в том числе палочки ботулиnum, к нагреванию. В этом случае повышение термоустойчивости также объясняется потерей клетками части свободной воды в результате осмоса.

Роль остаточной микрофлоры на качество консервов

Микроорганизмы, которые при тепловой обработке, т. е. в процессе стерилизации консервов, сохранили свою жизнеспособность, принято называть остаточной микрофлорой. Состав остаточной микрофлоры стерилизованных консервов, как правило, бывает представлен спорообразующими микроорганизмами, споры которых обладают значительной устойчивостью к действию высокой температуры. В некоторых мясных пастеризованных консервах в состав остаточной микрофлоры кроме спорообразующих входят также кокковые формы микроорганизмов.

Из спорообразующих микроорганизмов значительную долю остаточной микрофлоры мясных и мясо-растительных консервов обычно составляют термофильные бациллы, имеющие очень термоустойчивые споры.

Часто в состав остаточной микрофлоры, особенно консервов, богатых белковыми веществами (в том числе мясных и мясо-растительных), входят мезофильные облигатные клостридии. Споры этих микроорганизмов могут сохранять жизнеспособность даже после длительного нагревания продукта при 115-120°C. Реже в консервах обнаруживают токсигенный облигатный анаэроб – палочку ботулиnum. Споры палочки ботулиnum имеют несколько меньшую термоустойчивость, чем споры других анаэробных клостридии. Гибель этого микроорганизма принимается как минимальная стандартная норма при разработке режимов стерилизации низкокислотных и среднекислотных консервов, в том числе различных мясных и мясо-растительных.

Неспорообразующие микроорганизмы вследствие своей невысокой термоустойчивости обычно полностью погибают при стерилизации. Наличие в готовых консервах жизнеспособных клеток

неспорообразующих бактерий всегда указывает на нарушение температурного режима и изменение продолжительности стерилизации или на высокую исходную микробную контаминацию консервируемого продукта.

В таких случаях кроме спорообразующих микробов в консервах обнаруживают стафилококков, бактерий группы кишечных палочек, бактерий рода протейс и других бактерий.

Промышленно-стерильными считают консервы, содержащие жизнеспособные клетки негазообразующих непатогенных и нетоксигенных аэробных бацилл типа сенной палочки. В промышленно-стерильных консервах не должно содержаться патогенных и токсигенных микроорганизмов, а также возбудителей порчи консервов: термофильных бацилл и клостридий, газообразующих мезофильных бацилл и клостридий. Допустимое количество клеток микроорганизмов в 1 г консервируемого продукта, не нарушающее его микробиологической стабильности в процессе хранения и не представляющее опасности для здоровья человека, составляет до 10^3 . Для выявления остаточной микрофлоры, способной развиваться, после стерилизации консервы подвергают косвенному микробиологическому контролю – 5-10%-ной термостатной выдержке при 37°C в течение 10 сут. За это время сохранившие жизнеспособность споры микроорганизмов могут прорасти. Затем вегетативные формы их будут размножаться и вызовут порчу продукта, определяемую наружным осмотром (бомбаж или течь на лопнувших банках). Однако термостатная выдержка – недостаточный критерий для заключения о промышленной стерильности консервов. При длительном хранении консервов, подвергнутых термостатированию, иногда вновь выявляются бомбажные банки.

Это объясняется, во-первых, тем, что температура термостатной выдержки (37°C) не является оптимальной для всех микроорганизмов остаточной микрофлоры консервов, среди которых много термофилов, активно проявляющих свою жизнедеятельность при более высоких температурах. Во-вторых, споры микроорганизмов, ослабленные стерилизацией, часто не успевают прорасти в течение 10 дней и проявляют свою жизнедеятельность значительно позже. Например, споры сенной палочки и картофельной палочки иногда прорастают при 37°C только после 20-27-дневной выдержки, палочки ботулиnum и палочки спорогенес – нередко после 56-58 дней, а споры маслянокислых бактерий в некоторых случаях – через 75-91 день.

Кроме того, термостатная выдержка не позволяет обнаружить в консервах жизнеспособные микроорганизмы, размножение которых не сопровождается образованием газов и не приводит к бомбажу банок (возбудители плоскокислой порчи, токсигенные стафилококки и другие патогенные бактерии).

Наряду с термостатной выдержкой для установления видового состава остаточной микрофлоры проводят выборочный микробиологический контроль консервов.

Поскольку доброкачественность консервов значительно зависит от степени контаминация консервов перед стерилизацией микроорганизмами, в настоящее время основным методом микробиологического контроля качества продукции на консервных заводах является микробиологическое исследование содержимого консервных банок перед стерилизацией.

В процессе хранения остаточная микрофлора может или сохраняться в консервах в подавленном состоянии, не размножаясь и не влияя на их доброкачественность, или переходить от временного “латентного” состояния к активной жизнедеятельности и размножаться. В результате размножения микроорганизмов, не погибших в процессе стерилизации или попавших в банки вследствие их негерметичности после стерилизации, может наступить порча консервов.

Наиболее распространенные виды порчи консервов, вызываемые микроорганизмами, – бомбаж, плоскокислая порча (плоскокислоскисание), сульфитная порча.

Бомбаж. Различают действительный (истинный) и ложный. Банки с доньшками, вздутыми вследствие внутреннего давления, называются бомбажными. Действительный бомбаж может быть микробиологическим и химическим. Микробиологический бомбаж обусловлен скоплением в банке газов, образующихся в результате жизнедеятельности микроорганизмов. Размножаясь в консервах, микроорганизмы разлагают органические вещества (углеводы и белки) с образованием больших количеств газообразных веществ. Микробиологический бомбаж чаще всего вызывают газообразующие мезофильные облигатные анаэробные клостридии: палочки спорогенес, путрификус и перфрингенс. Бомбаж консервов может вызвать также мезофильная токсигенная клостридия ботулинум. Однако при ее размножении в консервах не всегда наблюдается явно выраженный бомбаж. Чаще всего банки остаются по

внешнему виду вполне нормальными. Кроме мезофильных облигатных анаэробов к возбудителям бомбажа консервов относят термофильный облигатный анаэроб клостридиум термосахаролитикус, обладающий резко выраженными сахаролитическими свойствами и способностью к энергичному газообразованию. Причиной бомбажа мясных и мясо-растительных консервов могут также быть факультативно-анаэробные термофильные бациллы: палочка полимикса, палочка картофельная, палочка астероспорус. Кроме спорообразующих микроорганизмов микробиологический бомбаж могут иногда вызывать бактерии группы кишечных палочек, бактерии рода протеус, кокки, дрожжи и другие бесспорные газообразующие микроорганизмы, сохранившие жизнеспособность при стерилизации или попавшие в готовые консервы вследствие негерметичности тары.

Химический бомбаж возникает в результате скопления водорода, образующегося при коррозии металла банки. В продукте обнаруживают соли железа и олова, которые придают ему металлический привкус. Нередко изменяется цвет продукта. Химический бомбаж чаще всего наблюдается в консервах (фруктовые, овощные и др.), содержащих органические кислоты.

Ложный бомбаж (физический) после стерилизации происходит после расширения содержимого банок под воздействием высокой температуры. Он может быть в результате переполнения банки продуктом, при закладке в банку продукта с низкой температурой, вследствие недостаточного удаления из банки воздуха перед стерилизацией, при слишком быстром снижении давления пара в конце стерилизации, неправильной закатке доньшка (“хлопушка”), сильной деформации банок и т. д.

Плоскокислая порча консервов вызвана разложением углеводов с образованием органических кислот без выделения газа, поэтому деформации, т. е. бомбажа банок, не наблюдается. Содержимое банок приобретает слабый кислый запах и выраженный неприятный кислый привкус. Иногда цвет продукта изменяется. Основные возбудители плоскокислой порчи – термофильные спорообразующие факультативно-анаэробные микроорганизмы. Порчу мясных и мясо-растительных консервов чаще всего вызывают: аэротермофилус и палочка стеаротермофилус. Эти микроорганизмы сохраняют жизнеспособность и развиваются в консервированных, богатых углеводами продуктах в условиях хранения при повышенных температурах (55-70°C).

Сульфитная порча – возбудитель термофильный споровый микроорганизм клостридиум нигрификанс, который обладает слабовыраженными сахаролитическими свойствами, но разлагает белки с образованием большого количества сероводорода. Он растворяется в содержимом банки и вызывает вздутие доннышек банки, т. е. бомбаж. Сероводород адсорбируется продуктом, который чернеет и приобретает запах тухлых яиц.

При микробиологическом бомбаже, плоскокислой порче и сульфитной порче консервы на пищевые цели непригодны. Консервы с признаками химического и ложного бомбажа после органолептической оценки и лабораторных исследований используют по указанию санитарного или ветеринарного врача.

Мероприятия по обеспечению выработки доброкачественных консервов, отвечающих требованиям промышленной стерильности, предусматривают строгое выполнение санитарных норм и всех технологических режимов производства, проведение микробиологического контроля санитарно-гигиенических условий производства и санитарного качества сырья.

Санитарно-гигиенические требования к производству консервов

С точки зрения гигиены производства наибольший интерес представляет подразделение консервов на две группы по признаку теплового воздействия: стерилизованные и пастеризованные.

Выпуск мясных консервов гарантированного качества возможен только при высоком уровне гигиены на всех этапах технологического процесса. Особенно это относится к выпуску пастеризованных консервов и консервов для детского питания.

Температурный и влажностный режимы в охлаждаемых помещениях цеха (завода) определяются нормами технологического проектирования и технико-экономическими показателями мясной промышленности. В отделениях порционирования и закатки банок поддерживают температуру 12-15 °С. Для лучшего обеспечения соответствующего микроклимата в помещениях используют кондиционеры. Температурный и влажностный режимы в процессе работы постоянно контролируют. Стены помещения облицовывают плиткой на всю высоту.

Парное мясо рекомендуют использовать для производства консервированных сосисок и фарша.

При поступлении на консервный завод осматривают всю партию сырья. Измеряют температуру в толще мышц бедренной части туши на

глубине не менее 6 см от поверхности. Температуру сырья измеряют не менее чем в четырех полутушах (выводят среднюю цифру).

Каждую партию сырья с ветеринарным свидетельством по форме № 2 с удостоверением о качестве подвергают ветеринарно-санитарной экспертизе. При использовании на консервы условно годного мяса на тушах наряду с клеймами ветеринарно-санитарного осмотра должен стоять прямоугольный штамп «На консервы». Условно годное мясо принимают отдельно от других партий. Такое сырье размещают в отдельной изолированной камере, которую после использования сырья подвергают соответствующей санитарной обработке.

Для производства консервов нельзя использовать мясо плохо обескровленное, замороженное более одного раза, с признаками несвежести или посторонним запахом, свинину с пожелтевшим шпиком, некастрированных производителей. Растительное сырье (крупы, бобы и т. д.) должно быть хорошего качества. Жесть, поступившую на предприятие, контролируют (1 %, но не менее одной упаковки) на эластичность, прочность, пористость, толщину, содержание олова. Паста и уплотнительные резиновые кольца не должны содержать свинец и цинк.

Особое внимание обращают на санитарное состояние отрубов (срезают клейма, зачищают загрязненные участки без применения воды) и поверхности размороженного сырья (при загрязнениях размороженные мясные отрубы зачищают и моют водой температурой 40 °С). Затем выполняют жиловку и обвалку. При обнаружении патологических изменений в мясе вопрос о его использовании принимают специалисты службы ОПВК (отдел производственно-ветеринарного контроля).

При изготовлении некоторых видов консервов мясо и субпродукты бланшируют или обжаривают. После бланшировки или обжаривания сырье немедленно подают на фасование, так как задержка этой операции ведет к накоплению и размножению микроорганизмов. Фасованный в банки продукт нельзя задерживать более 30 мин перед стерилизацией. Перед фасованием банки моют горячей водой (80 °С) и в течение 10-15 с обрабатывают паром. После такой обработки содержание микроорганизмов не должно превышать 500 клеток на банку.

Санитарно-микробиологическое исследование сырья выполняют систематически для выявления содержания микроорганизмов: спор мезофильных облигатных анаэробов (возбудителей бомбажа), термофильных микроорганизмов (возбудителей плоскокислой порчи).

Содержание микроорганизмов контролируют один раз в каждую смену на каждой линии и по каждому виду вырабатываемой продукции. Пробы (3 банки) отбирают через 1 ч после начала работы линии.

При получении результатов лабораторных исследований, указывающих на превышение норм содержания микроорганизмов в сырье перед стерилизацией банок, исследуют весь технологический цикл производства консервов для выявления и устранения источников загрязнения сырья. В этом случае сырье контролируют на различных этапах его подготовки к стерилизации. Содержание микроорганизмов не должно превышать 300 колоний микробных клеток на 1 см² оборудования, инвентаря, тары и т. п. Не допускается наличие палочки протей и кишечной палочки в смывах. При удовлетворительном состоянии оборудования и помещения в 0,5 см³ содержимого банок перед стерилизацией должны отсутствовать споры облигатных мезофильных и термофильных анаэробов - возбудителей бомбажа.

Аппараты для стерилизации должны быть оборудованы контрольно-регистрирующими самопишущими приборами. На каждой термограмме указывают наименование консервов, номер автоклава и варки, смену, дату стерилизации и фамилию работ ника, осуществляющего контроль за автоклавом. Термограмма должна храниться на предприятии не менее 5 лет.

Наряду с термограммами в стерилизационном отделении должен быть журнал, где регистрируют дату работы, смену, номер автоклава, варки, наименование продукта, номер банки по объему, количество банок, продолжительность стерилизации, продолжительность и конец охлаждения, величину избыточного давления, зафиксированные отклонения от режима, распоряжения об изменении режима стерилизации, подпись аппаратчика, ответственного за стерилизацию.

Контрольные вопросы и задание.

1. Перечислите источники микрофлоры консервированных продуктов.
2. Что подразумевают под термином «остаточная микрофлора» консервов?
3. Какие микроорганизмы входят в состав остаточной микрофлоры консервов?
4. Какие консервы считают промышленно-стерильными?
5. Назовите наиболее распространенные виды порчи консервов.
6. Какие санитарные требования необходимо соблюдать при приеме и приготовлении консервов?

Тема 6. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ КОЛБАС

1. Пути контаминации данных изделий. 2. Влияние остаточной микрофлоры на качество и хранение продукции. 3. Ветеринарно-санитарный контроль готовых колбасных изделий.

В процессе приготовления колбасных изделий колбасный фарш обсеменяется микроорганизмами, попадающими в него из различных источников. Степень исходной микробной контаминации колбасного фарша зависит от санитарно-гигиенических условий производства и соблюдения технологических режимов.

В силу различий технологических процессов выработки вареных и копченых колбасных изделий состав микрофлоры этих продуктов изменяется неодинаково. При нарушении сроков и режимов хранения готовых колбасных изделий в результате протекающих в них микробиологических процессов может ухудшаться их качество.

Контаминация колбасного фарша микроорганизмами

В колбасный фарш микроорганизмы могут попадать из различных источников на всех основных этапах технологического процесса его приготовления: из сырья, при подготовке мяса (разрубке туш, обвалке, жиловке), посоле, составлении колбасного фарша, наполнении колбасной оболочки фаршем.

Сырье. К сырью в колбасном производстве предъявляют высокие санитарные требования, поскольку оно является одним из источников микробного обсеменения.

Мясо и субпродукты имеют различную степень обсеменения микроорганизмами в зависимости от предубойного состояния животных, от которых они получены. Для выработки колбасных изделий применяют сырье, полученное от здоровых, упитанных животных. Контаминация микроорганизмами сырья, благополучного в санитарном отношении (т. е. полученного от здоровых животных), также может быть различной в зависимости от санитарно-гигиенических условий его получения, хранения, транспортирования и предварительной обработки, а также температурных режимов. Например, размороженное мясо содержит больше микробов, чем охлажденное, так как в процессе оттаивания мороженых продуктов создаются благоприятные условия для размножения микроорганизмов. При этом контаминация поверхности размороженного мяса зависит от

санитарно-гигиенических условий и соблюдения технологических режимов оттаивания.

В несвежем и ослизшем, а также с загрязненной поверхностью (кровь, содержимое желудочно-кишечного тракта и др.) сырье микроорганизмы содержатся в большом количестве. В производство такое сырье допускают только после предварительной тщательной санитарной обработки (зачистка, промывание и т. д.).

Подготовка мяса. Количество микроорганизмов в мясе резко увеличивается при разрубке туш, обвалке, жиловке, так как эти операции выполняют вручную. Например, только после разрубки и обвалки контаминация мяса микроорганизмами иногда возрастает в 100 раз и более.

Обычно мышечная ткань при ненарушенной целостности представляет собой препятствие для внедрения микробов с поверхности мясной туши в толщу мышечной ткани. Несмотря на то, что на поверхности туши иногда находится много микроорганизмов, они довольно медленно проникают в глубь тканей.

В процессе разрубки, обвалки и жиловки мышечная ткань обнажается и измельчается, вследствие чего увеличивается площадь ее соприкосновения с внешней средой и становится неизбежным попадание в мясо различных гнилостных не спорообразующих и спорных бактерий, энтерококков, актиномицетов, плесневых грибов, дрожжей, кишечной палочки, бактерий рода протеус, стафилококков и других сапрофитных и условно-патогенных микроорганизмов, а иногда и патогенных бактерий (сальмонелл и др.). Микроорганизмы попадают в мясо с рук рабочих, со спецодежды, инструментов, обвалочных столов, инвентаря, тары, из воздуха производственных помещений и др. Происходит также перераспределение микроорганизмов, имеющих на поверхности туши, на обнажаемые при разрезе новые (внутренние) участки мышечной ткани. Степень обсеменения мяса зависит от размеров кусков, на которые разделяют тушу: чем больше отношение поверхности к объему куска (т. е. меньше его величина), тем больше степень контаминация микроорганизмами. В целях максимального снижения степени микробного обсеменения сырья необходимо, чтобы процесс подготовки был кратковременным (не более нескольких часов) и проводился при пониженной температуре производственных помещений. Кроме того, следует строго соблюдать санитарно-гигиенический режим производства (тщательная санитарная обработка помещений, обвалочных столов,

инструментов, тары, спецодежды, соблюдение правил личной гигиены рабочими и т. д.).

Посол. Дальнейшее увеличение количества микроорганизмов в мясе происходит главным образом в результате попадания вместе с посолочной смесью (или рассолом) различных солеустойчивых (голофилы) и солелюбивых гнилостных бацилл, флавобактерии, пигментных кокков, дрожжей, спор плесневых грибов, актиномицетов и др. Большинство бактерий не погибают при 10-20% концентрации соли, а лишь приостанавливают рост. Для исключения этого источника дополнительного загрязнения мяса микроорганизмами рекомендуется для посола применять стерильную посолочную смесь. Микроорганизмы попадают в мясо также с оборудования и инвентаря, используемого при посоле. При соблюдении температурного режима (температура не выше 2-4 °С) и сроков посола (не более 1-3 сут. для вареных и не более 5-10 сут. для сырокопченых колбас) значительного увеличения содержания микроорганизмов не происходит.

Составление колбасного фарша. Обсеменение фарша может происходить во время выполнения механических операций (измельчение мяса на волчке и куттере, обработка фарша в смесительной машине), с оборудования, рук рабочих, тары, инвентаря, воздуха помещений. Соблюдение установленного санитарного режима при выполнении этих операций будет способствовать уменьшению микробного обсеменения фарша. Микроорганизмы могут попадать в фарш при добавлении шпика, крахмала, муки и специй. Со специями, особенно с перцем, в фарш попадают спорообразующие бактерии. Как показали исследования, микробная контаминация перца исчисляется миллионами или даже десятками миллионов микробов в 1 г. Подавляющая масса микробов, находящихся в перце, приходится на аэробные бациллы. Использование стерилизованных специй позволяет устранить этот источник микробного загрязнения фарша.

Наполнение колбасной оболочки фаршем. При набивке колбас в фарш из шприцев могут попадать микроорганизмы. Поэтому шприцы необходимо тщательно мыть и дезинфицировать.

Другим источником микробного обсеменения фарша при набивке может служить **колбасная оболочка**. Применяют естественные (мокросоленые, пресно-сухие) и искусственные оболочки. Естественные кишечные оболочки загрязнены различными микроорганизмами, многие из которых являются возбудителями порчи мяса и мясопродуктов. В

мокросоленых кишечных оболочках обычно содержатся бактерииум галофилум, различные виды микрококков, сарцины, аэробные бациллы, актиномицеты, плесневые грибы и другие галофильные и солеустойчивые микроорганизмы. В пресно-сухих кишечных оболочках также часто находятся споровые аэробные гнилостные бациллы, актиномицеты, споры плесневых грибов и различные кокковые бактерии. Санитарная обработка кишечных оболочек перед использованием (очистка, дезинфекция) снижает микробное загрязнение. Искусственные оболочки более гигиеничны. При соблюдении санитарных условий хранения и транспортирования в них обычно содержится немного микроорганизмов. По сравнению со щприцеванием набивка фарша в оболочку вручную во время изготовления штучных колбас (слоеная, языковая и др.) приводит к значительному микробному обсеменению. При исследовании таких колбас в 35,5 % случаев выделяли кишечную палочку и в 20 % - палочку протей. Тогда как в колбасах машинной набивки протей не был обнаружен, а кишечная палочка обнаружена в 5,8 % случаев. После набивки фарша в оболочку какое-либо дополнительное микробное обсеменение извне исключено. При последующих технологических операциях в зависимости от способа изготовления колбас происходят определенные изменения микрофлоры фарша.

Вспомогательные пищевые продукты и материалы.

Вспомогательные пищевые продукты и материалы (посолочные ингредиенты, белковые стабилизаторы, молоко и молочные продукты, мучные продукты, пряности, яйцепродукты, оболочки для колбасных изделий и др.) могут быть источником проникновения микроорганизмов в сырье и готовую продукцию, а также причиной возникновения в них неспецифического вкуса и запаха.

Каждую партию вспомогательных пищевых продуктов и материалов контролируют по мере поступления на предприятие, в процессе их хранения и перед использованием в колбасном производстве.

Посолочные ингредиенты. К ним относят поваренную соль, сахар, нитрит натрия, аскорбиновую кислоту или аскорбинат натрия.

В колбасном производстве используют *соль поваренную пищевую* выварочную или молотую помолов № 0, 1, 2, не ниже I сорта.

Из 1 г поваренной соли можно выделить до 100-200 тыс. микроорганизмов, но значительным загрязнением уже считается наличие более 1000 микробных тел.

Сахар содержит различную микрофлору: *B. stearothermophilus*, *C.thermosaccharoliticum*, дрожжи, *B. leuconostoc mesenteroides* и другие слизиобразующие виды бактерий.

Молоко и молочные продукты. Их применяют при производстве диетических и других мясных продуктов. Молоко и молочные продукты должны отвечать требованиям действующей нормативно-технической документации. Особую опасность для потребителя представляет наличие в молоке токсигенных стафилококков, экзотоксины которых могут не разрушаться при установленных режимах тепловой обработки колбасных изделий. В сухом молоке не допускают наличия кишечной палочки и патогенных микроорганизмов.

Мучные продукты. К ним относят пшеничную муку и крахмал, которые увеличивают вязкость и влагоудерживающую способность фарша. В колбасном производстве применяют пшеничную муку I и II сортов. В ней можно выявить микроорганизмы, встречающиеся в зерне: бактерии родов *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus* и др., а также микроскопические грибы родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Phusarium*, *Cladosporium* и т. д.

Содержание микроорганизмов в 1 г муки колеблется от $2 * 10^3$ до $5 * 10^6$. Желательно, чтобы количество микробов в 1 г муки не превышало $1 * 10^4$.

Муку хранят при 15-18°C и относительной влажности воздуха 60-65%. Неблагоприятные условия хранения приводят к самосогреванию и слеживанию муки в комки, появлению затхлого запаха.

Крахмал. Для изготовления колбас используют крахмал пшеничный, картофельный, кукурузный и рисовый, не ниже I сорта. В 1 г крахмала можно обнаружить до $11,8 * 10^4$ бактерий, до $12 * 10^4$ - микроскопических грибов, до 1,2-84 тыс. спорных микроорганизмов.

Специи и пряности. Для придания колбасным изделиям специфического аромата и вкуса используют черный, белый душистый, красный молотый перец, мускатный орех, кориандр, кардамон, тмин и другие пряности, а также смесь пряностей различных составов. Пряности обладают антимикробным действием. Замедляющими рост микроорганизмов являются составные части эфирных масел (спирты, альдегиды, кетоны, фенолы, кислоты и сложные эфиры), алкалоиды, фитонциды. Спектр антимикробного действия отдельных пряностей сильно ограничен и бактериальное влияние их в тех концентрациях, которые применяют в мясной промышленности, не следует переоценивать.

Несмотря на то что пряности содержат антимикробные вещества, в них может быть большое количество микроорганизмов (табл. 1).

Таблица 1. Максимальное микробное загрязнение специй, применяемых в колбасном производстве

| Специи | Общее количество микроорганизмов, $1 \cdot 10^3/\text{г}$ | Количество споровых микроорганизмов, $1 \cdot 10^3/\text{г}$ | Количество бактерий рода эшерихиа коли $1 \cdot 10^3/\text{г}$ |
|------------------|---|--|--|
| Перец | | | |
| черный целый | 6120-284000 | 600-4200 | 6,62 |
| черный молотый | 10500-612000 | 600-12700 | 1 |
| душистый целый | 1000-10000 | 420-1300 | – |
| душистый молотый | 12000–170000 | 800-26000 | – |
| красный молотый | 1200-22070 | 260-3420 | |
| Кардамон | | | |
| целый | 42-2400 | 18-240 | – |
| молотый | 48-2900 | 26-300 | – |
| Смесь | | | |
| № 1 | 544-1000 | 70-1700 | 1,22 |
| № 3 | 26000-33400 | 80,4-1200 | 12,8 |
| № 4 | 540-6000 | 55,2-1000 | 1,954 |

Содержание микроорганизмов особенно высокое в черном перце, меньше - в мускатном орехе, гвоздике.

Микроорганизмы попадают в пряности из почвы в случаях нарушения требований гигиены в производстве. Наличие в пряностях спор, устойчивых к нагреванию, может вызвать порчу вареных, полукопченых и вареных колбас. В пряностях обычно преобладают бациллы: *B. subtilis*, *B. circulans*, *B. Coagulans*. Однако нередко присутствуют стафилококки и стрептококки, представители родов *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Klebsiella* и др., а иногда сальмонеллы и эшерихиа коли. Дрожжи обычно выявляют редко, в то время как плесневые грибы различных родов - достаточно часто, в том числе штаммы, образующие афлатоксины. Плесневые грибы могут вызывать порчу специй, например перца. Особые трудности в колбасном производстве может создавать наличие в смесях пряностей *S. perfringens*.

Известны различные способы улучшения санитарного состояния пряностей. Стерилизация пряностей сухим жаром возможна, однако при такой

обработке частично теряются летучие эфирные масла и пряности значительно утрачивают свои свойства. Так, после нагревания до 121 °С микроорганизмы в пряностях гибнут, но потеря ароматических веществ достигает 10 % и более.

Ультрафиолетовое воздействие является недостаточно эффективным, так как гибель микроорганизмов отмечается только в поверхностных слоях пряностей. Хороший стерилизующий эффект дают γ -лучи при дозе облучения до $1 \cdot 10^4$ / Гр погибают как вегетативные так и споровые формы. После обработки специй γ -лучами существенных изменений органолептических показателей не обнаружено.

В колбасном производстве применяют экстракт пряностей, так как в нем практически нет микрофлоры. Однако экстракты пряностей не передают всех вкусовых оттенков, которые характерны для натуральных веществ.

Изменение микрофлоры мяса при выработке вареных и полукопченых колбас

При выработке вареных и полукопченых изделий после наполнения фаршем колбасные батоны подвергают осадке, обжарке, варке и охлаждению. Полукопченые колбасы дополнительно коптят и сушат.

Осадка. При соблюдении технологического режима (температура не выше 2°C , относительная влажность 85-95 % и продолжительность не более 2-4 ч) состав микрофлоры фарша почти не изменяется. Повышение температуры и увеличение продолжительности осадки может привести к размножению микроорганизмов (в том числе иногда палочки перфрингенс и других токсигенных бактерий) и увеличению общей микробной контаминации.

Обжарка. При обработке горячим дымом температурой $80-110^{\circ}\text{C}$ в течение 0,5-2 ч оболочка (а частично и сам фарш с краев) пропитывается составными частями дыма и подсушивается. В результате этого создаются условия, неблагоприятные для размножения микробов на поверхности колбасных батонов. Под влиянием горячего дыма фарш нагревается. В колбасных батонах небольшого диаметра (3-5 см) температура в центре повышается до $40-50^{\circ}\text{C}$, а батонов большого диаметра (от 5-15 см и больше) – до $30-40^{\circ}\text{C}$. Следовательно, в батонах большого диаметра создаются условия, благоприятные для размножения микробов. Поэтому количество микроорганизмов в глубине батонов несколько возрастает. В связи с этим очень важно правильно соблюдать сроки обжарки, поскольку при их удлинении возможно значительное увеличение количества микроорганизмов в фарше.

Варка. К концу процесса варки в глубине батонов температура в зависимости от вида колбас достигает 68-75°C. При таком температурном режиме погибает до 90 % и более микробов, содержащихся в сырых колбасах. При этом отмирают все не споровые патогенные и условно-патогенные бактерии: кишечная палочка и палочка протей, большинство сапрофитных не спорообразующих микроорганизмов (кокки, молочнокислые бактерии, дрожжи и др.), вегетативные формы и часть спор спорообразующих бактерий.

Под влиянием высокой температуры в процессе варки резко изменяется количественный и групповой состав микрофлоры колбасного фарша. До варки состав микрофлоры фарша колбасных батонов очень разнообразен и обычно представлен различными видами как не спорообразующих, так и спорообразующих микроорганизмов. Общее количество микробов в 1 г сырого фарша составляет десятки тысяч и более. После варки в 1 г фарша обычно содержатся только сотни или несколько тысяч микроорганизмов. В толще батонов количество микроорганизмов бывает несколько больше, чем в поверхностных слоях, которые более интенсивно прогреваются во время варки.

Остаточная микрофлора колбасных изделий после варки состоит в основном из спорообразующих палочковидных сапрофитных аэробных и анаэробных бактерий и незначительного количества не спорообразующих сапрофитных бактерий, главным образом кокков. Количество не спорообразующих микробов в вареных колбасах большого диаметра составляет обычно не более 10-12%, в батонах небольшого диаметра – только 4-7, а в сосисках – всего 1-3% от общего числа микробов, выживших при варке.

Копчение и сушка. Токсичными для микробов являются различные составные части дыма: формальдегид, смолистые вещества, углеводороды, аммиак, углекислый газ, муравьиный альдегид, уксусная кислота, высшие жирные кислоты. Бактерицидный эффект копчения обуславливается в первую очередь наличием в дыме фенольных веществ.

Бактерицидное действие компонентов дыма зависит от их химической природы: кислоты наиболее эффективно подавляют спорообразующие виды (*B. subtilis*, *B. megatherium*), фенолы - банальную и условно патогенную микрофлору (*E. coli*, *Proteus*), нейтральные соединения и органические основания обладают слабым бактерицидным эффектом. *E. coli* при копчении погибают через 20 мин, *B. prodigiosus* - через 3 ч. Особенно чувствительны к дыму грамотрицательные бактерии, несколько менее - стафилококки. Не-

спорообразующие и вегетативные формы споровых типа *B. subtilis* погибают в дыму за 1-2 ч, споры этих бактерий - через 8 ч, споры *C. sporogenes* не погибают при длительном воздействии дыма. Очень устойчивы к действию коптильных веществ плесени.

Для обработки мясопродуктов применяют различные коптильные препараты и коптильные жидкости, которые обладают бактерицидными и антиокислительными свойствами. Степень их бактерицидного и окислительного действия зависит от того, насколько удастся при их изготовлении сохранить компоненты, обладающие наибольшей способностью подавлять микроорганизмы и предотвращать порчу жиров.

Охлаждение колбасных изделий производят для предотвращения порчи и снижения потерь массы продукции. Этот процесс необходимо проводить в максимально короткий срок, чтобы создать неблагоприятные условия для развития остаточной микрофлоры. Колбасы после варки охлаждают под ледяным душем в течение 10 мин. Процесс считают законченным после достижения температуры внутри батона 8-15°C. Затем продукцию направляют на хранение в помещения с кондиционированным воздухом или в обычные охлаждаемые камеры

Остаточная микрофлора. Групповой состав микрофлоры полукопченых колбас после копчения и сушки не изменяется. Общее количество микроорганизмов уменьшается, часть микробов, выживших при варке, отмирает в процессе дополнительной обработки.

Содержание остаточной микрофлоры в вареных и полукопченых колбасах колеблется в зависимости от исходного количества и состава микрофлоры сырого фарша, соблюдения термического режима варки, вида, сорта колбас и др. Так, общая микробная контаминация мясных колбасных изделий составляет в среднем от нескольких десятков до нескольких сотен или нескольких тысяч микробных клеток в 1 г, тогда как в ливерных колбасах - от нескольких десятков тысяч до нескольких сотен тысяч микробов в 1 г. В колбасах III сорта всегда содержится больше микроорганизмов, чем в колбасных изделиях I и II сортов. При соблюдении всех санитарных норм и технологических режимов производства общая микробная контаминация (КОЕ) вареных и полукопченых колбас I и II сортов должна быть не выше 1000 и колбас III сорта не выше 2000 микробных клеток в 1 г. В колбасах не должны содержаться патогенные и условно-патогенные микроорганизмы (кишечная палочка и палочка протей).

Большое количество микроорганизмов в вареных и полукопченых колбасах (более 1000-2000 микробных клеток в 1 г) или наличие палочки

протей и кишечной палочки независимо от общей микробной контаминации указывает на нарушение санитарных норм, приводящее к значительному микробному загрязнению фарша в процессе приготовления колбас, или на несоблюдение технологических режимов осадки, обжарки или варки.

Безоболочные виды колбасных изделий (мясные хлебы, карбонат и др.) после надлежащей термической обработки также имеют небольшую общую микробную контаминацию и не должны содержать патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Групповой состав их микрофлоры представлен главным образом споровыми формами сапрофитных микроорганизмов и единичными кокковыми бактериями. После термической обработки эти продукты часто получают практически стерильными. Но, поскольку они не имеют защитной оболочки, при несоблюдении мер предосторожности на конечных операциях (извлечение из форм, внутризаводские перемещения, упаковывание в бумагу или целлофан) их поверхность легко может быть обсеменена микроорганизмами, наиболее часто встречающимися в колбасном производстве: палочкой протей, кишечной палочкой, споровыми гнилостными бактериями, кокками. В этих случаях на поверхности упакованной продукции количество микробов достигает сотен тысяч на 1 см², и во всех пробах обнаруживают кишечную палочку.

Изменение микрофлоры фарша при выработке копченых колбас

В зависимости от способа изготовления копченые колбасы подразделяют на сырокопченые и варено-копченые.

Сырокопченые колбасы. При изготовлении сырокопченых колбас колбасные батоны подвергают длительной (5-7 сут.) осадке, холодному копчению (при 18-25°C) и сушке (до 1,5 мес.). Разновидностью сырокопченых колбас являются сыро-вяленые (вяленые) колбасы, которые после осадки сушат без предварительного копчения (вяление).

Поскольку в процессе изготовления сырокопченых колбас не применяют тепловой обработки, обеспечивающей уничтожение не спорообразующих микроорганизмов, микрофлора этих колбас изменяется иначе, чем вареных и полукопченых. В ходе технологического процесса изготовления сырокопченых и вяленых колбас создаются условия, хотя и замедляющие, но не исключающие жизнедеятельности микроорганизмов

в продукте. Поэтому в фарше этих колбас размножаются некоторые группы микроорганизмов. В результате их размножения общая микробная контаминация фарша возрастает во время длительной осадки, копчения (у сырокопченых колбас) и в начале процесса сушки, достигая к 10-20-му дню созревания (сушки) продукта миллионов и более микробных клеток в 1 г. Затем общее количество микроорганизмов постепенно снижается и к концу сушки (примерно через 30-50 дней) уменьшается в несколько раз. При созревании колбас их микрофлора изменяется не только количественно, но и качественно. Групповой состав микрофлоры исходного фарша сырокопченых и сыровяленых колбас очень разнообразен. Основную массу микрофлоры составляют грамотрицательные бактерии, в том числе из группы кишечных палочек и рода протеус, гнилостные спорообразующие, аэробные бациллы, анаэробные клостридии, энтерококки, стафилококки. Кроме этих групп микроорганизмов в фарше обычно содержатся в небольших количествах дрожжи, микрококки и молочнокислые бактерии.

В процессе созревания колбас состав микрофлоры изменяется и становится более однородным. Происходит постепенное увеличение количества молочнокислых бактерий, микрококков, а в некоторых колбасах и дрожжей, т. е. тех групп микроорганизмов, содержание которых в начале сушки было незначительным. Обычно в конце созревания сырокопченых и вяленых колбас молочнокислые бактерии и микрококки составляют наибольшую часть от общего количества микрофлоры продукта. Грамотрицательные бактерии, преобладавшие в начальный период процесса, по мере созревания колбас постепенно отмирают: бактерии рода протеус отмирают и не обнаруживаются в фарше примерно к 18-20-30-му дню, а кишечная палочка – через 30-50 дней сушки. В готовых созревших колбасах эти микроорганизмы, как правило, всегда отсутствуют.

Изменение состава микрофлоры сырокопченых и вяленых колбас связано с тем, что на состав и развитие микроорганизмов воздействуют такие факторы, как обезвоживание среды, повышение концентрации соли и связанное с ними снижение активности воды (показателя ОН), применение коптильных веществ (на поверхностную микрофлору сырокопченых колбас), изменение рН продукта и микробный антагонизм.

В процессе копчения продукт пропитывается антисептическими веществами коптильного дыма, подавляющими развитие микроорганизмов. Однако к действию коптильных веществ наиболее

чувствительны только неспорообразующие микроорганизмы, особенно палочка протей, кишечная палочка, стафилококки и вегетативные формы споровых микроорганизмов. Споры аэробных бацилл, анаэробных клостридии и плесени обычно при копчении не погибают. Кроме того, в значительном количестве коптильные вещества проникают только в поверхностные слои фарша, а в толще колбасных батонов их концентрация обычно в 10-15 раз ниже. Следовательно, коптильные вещества играли второстепенную роль в подавлении жизнедеятельности микрофлоры фарша. Бактерицидный эффект копчения заключается главным образом в создании бактерицидной зоны на поверхностных участках продукта, защищающей его от проникновения и размножения микроорганизмов извне.

Существенное, определяющее воздействие на развитие микроорганизмов в сырокопченых и вяленых колбасах оказывают обезвоживание продукта и повышение вследствие этого концентрации соли как фактора, определяющего величину осмотического давления и активности воды в фарше. Обезвоживание и повышение концентрации соли происходит по всей толще продукта неравномерно. Поэтому в центральных, менее обезвоженных участках колбасных батонов благоприятные условия для размножения микроорганизмов сохраняются дольше, чем в поверхностных слоях. По мере обезвоживания, увеличения концентрации соли и в связи с этим значительного снижения показателя a_w количество микроорганизмов начинает уменьшаться. При концентрации соли 10 % и более происходит резкое снижение количества микробов в колбасном фарше. Дальнейшее уменьшение содержания микроорганизмов находится в прямой зависимости от повышения концентрации соли.

Существенно влияют на изменение состава микрофлоры при созревании колбас антагонистические взаимоотношения между различными микроорганизмами. Многие штаммы молочнокислых бактерий, выделяемых из копченых колбас, обладают выраженным антагонизмом в отношении тест-культур кишечной палочки, обыкновенного протей, гнилостных аэробных бацилл, стафилококков. Штаммы дрожжей из рода дебариомицес оказывают антагонистическое действие на плесневые грибы.

Микробы-антагонисты обладают значительной солеустойчивостью, что позволяет им активно размножаться в процессе постепенного обезвоживания продукта. В результате жизнедеятельности

молочнокислых бактерий и микрококков постепенно вытесняются грамотрицательные бактерии, аэробные гнилостные бациллы, стафилококки. Антагонизм молочнокислых бактерий и микрококков обуславливается выработкой антибиотических веществ и сдвигом рН фарша в кислую сторону, неблагоприятную для размножения гнилостных и условно-патогенных бактерий. Активное размножение молочнокислых бактерий и микрококков объясняет факт постепенного увеличения общего количества микроорганизмов в первый период созревания колбас, когда значительная часть других микроорганизмов фарша отмирает под влиянием обезвоживания, повышенной концентрации соли, действия коптильных веществ и антагонизма микробов.

Таким образом, типичными представителями микрофлоры готовых созревших сырокопченых и сыровяленых колбас являются отдельные виды молочнокислых бактерий и различные виды микрококков. В некоторых сыровяленых и копченых колбасах (сервелат, салями и др.) кроме указанных микроорганизмов к типичной микрофлоре относятся дрожжи преимущественно из родов дебариомицес и кандиды. В составе микрофлоры сырокопченых и вяленых колбас в незначительных количествах присутствуют аэробные бациллы, анаэробные клостридии и другие сапрофитные микроорганизмы.

Основная микрофлора сырокопченых и вяленых колбас (молочнокислые бактерии, микрококки, дрожжи) влияет на созревание и формирование специфических запаха, вкуса, цвета и других органолептических свойств продукта.

Варено-копченые колбасы. В отличие от сырокопченых варено-копченые колбасы подвергают менее длительной осадке (1-2 сут.), горячему копчению (при 50-60 °С), варке, вторичному копчению (при 32-45°С) и менее продолжительной сушке (7-15 сут.).

Особенности технологического процесса влияют на изменение состава микрофлоры колбас.

Во время осадки и горячего копчения, как и при изготовлении сырокопченых колбас, размножаются микрококки и молочнокислые бактерии, количество микробов в фарше увеличивается.

При варке значительная часть микрофлоры фарша погибает. В том числе отмирают протей, кишечная палочка, часть молочнокислых бактерий, микрококков и спорообразующих бактерий.

В процессе вторичного копчения и сушки часть микроорганизмов, выживших при варке, главным образом молочнокислые бактерии и микрококки, размножаются. Однако по сравнению с содержанием микроорганизмов в сырокопченых колбасах общее количество микроорганизмов в фарше готовых варено-копченых колбас значительно ниже.

Состав микрофлоры варено-копченых колбас в конце сушки (созревания) почти не отличается от состава микрофлоры сырокопченых колбас. В нем преобладают те же микроорганизмы (микрококки, молочнокислые бактерии), жизнедеятельность которых играет определенную роль в процессе формирования цвета, специфических запаха и вкуса продукта.

Для улучшения качества сырокопченых и вяленых колбас и интенсификации технологического процесса применяют специально подобранные штаммы молочнокислых бактерий и микрококков. Получены положительные результаты по использованию дрожжей из рода *Debaryomyces* для обработки поверхности сырокопченых и вяленых колбас в целях защиты от плесневения.

Влияние остаточной микрофлоры на качество колбас при хранении

Стойкость колбасных изделий при хранении неодинакова, что обусловлено многими факторами: степенью обезвоживания, содержанием хлорида натрия, рН, пропиткой коптильными веществами, химическим составом фарша, количеством и составом остаточной микрофлоры. Наиболее устойчивы при хранении сырокопченые и сыровяленые колбасы, так как они содержат наименьшее количество влаги, имеют более плотную консистенцию и наибольшую концентрацию соли, в составе микрофлоры почти отсутствуют гнилостные бактерии. Кроме того, все виды копченых колбас содержат много антисептических веществ коптильного дыма.

Вареные колбасы содержат более 50 % влаги, слабо посолены, имеют не очень плотную консистенцию, лишь в незначительной степени пропитаны коптильными веществами (при обжарке), поэтому они менее стойки при хранении, чем копченые (сырокопченые, сыровяленые и др.). Из вареных колбас наименее стойки субпродуктовые колбасы, которые не подвергаются обжарке, имеют наиболее рыхлую консистенцию и более высокий, чем мясные, рН (6,7-6,9 вместо 6,2-6,4 у мясных).

При неправильном хранении остаточная микрофлора колбас и микроорганизмы, попавшие на их поверхность в процессе хранения, могут размножаться и вызывать порчу этих продуктов. Различают несколько видов порчи колбас: гниение, прогорклость, кислое брожение, плесневение.

Гниение. Гниение колбас обусловлено жизнедеятельностью тех же неспоро- и спорообразующих гнилостных бактерий, которые вызывают гниение мяса. В отличие от гниения мяса гнилостное разложение колбас наступает одновременно по всей толще батона. Оно сопровождается, как и при гниении мяса, выделением дурнопахнущих продуктов разложения белков, жиров и углеводов. Под влиянием выделяющихся газообразных продуктов жизнедеятельности гнилостных бактерий колбасный фарш приобретает рыхлую консистенцию. В копченых колбасах специфический гнилостный запах “маскируется” запахом коптильных веществ, что затрудняет обнаружение признаков порчи продукта.

Колбасные изделия с признаками гнилостного разложения направляют на техническую утилизацию.

Прогорклость. Этот вид порчи чаще всего наблюдается при длительном хранении копченых колбас. Прогорклость является результатом размножения в продукте флуоресцирующих бактерий, чудесной палочки, молочной плесени и других микроорганизмов, обладающих липолитическими свойствами. Липолитические микроорганизмы расщепляют жиры на глицерин и жирные кислоты, которые окисляются, образуя альдегиды и кетоны, придающие продукту прогорклый вкус и едкий запах. Продукты с такими изменениями не допускаются в реализацию.

Кислое брожение. Возбудителями кислого брожения колбас являются те же микроорганизмы, которые вызывают аналогичный порок в мясе (палочка перфрингенс, кишечная палочка, молочнокислые бактерии, дрожжи и др.). Этот вид порчи характерен для вареных мясных и ливерных колбас, содержащих компоненты, богатые углеводами (мука, растительные примеси) и имеющие высокую влажность. В копченых колбасах эта порча встречается редко. В результате накопления органических кислот, образующихся при разложении микроорганизмами углеводов, продукт приобретает кислый запах и вкус. Консистенция и цвет фарша не изменяются. В дальнейшем при широком доступе кислорода может появиться серовато-зеленая окраска фарша. При этом вида порчи продукцию направляют на техническую утилизацию.

Плесневение - наиболее распространенный вид порчи сыровяленых и сырокопченых колбас при неправильном хранении этих продуктов в условиях повышенной влажности. Обладая способностью хорошо размножаться при повышенном осмотическом давлении и устойчивостью к коптильным веществам, плесени могут размножаться на увлажненных оболочках колбасных батонов, в результате чего образуются сухие или влажные налеты. На начальных стадиях развития плесени не влияют существенно на органолептические показатели продукта. При активном и длительном размножении на поверхности батонов плесневые грибы нарушают целостность колбасной оболочки и поражают глубокие слои батона, изменяя консистенцию, цвет и запах колбасы. Продукция с признаками начальной стадии порчи после обработки (очистка, промывание, дополнительное копчение) подлежит быстрой реализации. При изменении органолептических показателей колбасные изделия направляют на техническую утилизацию.

Ветеринарно-санитарный контроль готовых колбасных изделий

Ветеринарно-санитарная оценка колбасных изделий складывается из органолептических, физико-химических и микробиологических показателей. При проведении этих исследований придерживаются действующей нормативно-технической документации (ГОСТ, технические условия технологические инструкции и др.). При контроле внешнему осмотру подвергают не менее 10% каждой партии колбасных изделий. Для проведения лабораторных исследований берут следующие пробы: от изделий в оболочке и продуктов из мяса массой более 2 кг отбирают две единицы продукции для всех видов испытаний; от изделий в оболочке массой менее 2 кг отбирают две единицы для каждого вида испытаний; от изделий без оболочки отбирают не менее трех единиц для каждого вида испытаний.

Из отобранных единиц продукции берут разовые пробы для органолептических испытаний общей массой 800-1000 г, для химических исследований – 400-500 г. Для микробиологических исследований отбирают не менее двух разовых проб колбасы, каждая длиной 15 см от края батона; от продуктов из мяса – 10 см; от изделия без оболочки разовые пробы по 200-250 г от каждой из трех единиц.

Отбор проб. Отбор проб колбасных изделий осуществляется в соответствии с нормативными документами:

- ❖ ГОСТ 9792-73 Колбасные изделия и продукты из свинины, баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц. Правила приемки и методы отбора проб;

- ❖ ГОСТ Р 51447-99 (ИСО 3100-1-91) Мясо и мясные продукты. Методы отбора проб

6.1 Органолептическая оценка качества колбасных изделий

Для контроля внешнего вида колбасного изделия формируют выборку в размере 10 % от объема партии. Для определения органолептических показателей из отобранных проб продукции берут две точечные пробы от разных единиц продукции массой 400-500 г, из которых составляют объединенную пробу массой 800-1000 г.

Органолептический контроль осуществляется в соответствии с ГОСТ 9959-91. «Продукты мясные. Органолептический метод определения показаний качества». Определение показателей качества проводят на целом, а затем разрезанном продукте. При исследовании целого продукта определяют внешний вид, цвет, состояние поверхности (наличие плесени, ослизнение, наплывы и др.), запах (аромат), консистенцию (надавливанием пальцами или шпателем).

Определение показателей качества разрезанного продукта проводят в следующей последовательности:

- **плотность прилегания оболочки к фаршу**

- **внешний вид (структуру и распределение ингредиентов), цвет определяют визуально на только что сделанном продольном и поперечном разрезах колбас;**

- **запах (аромат), вкус и сочность определяют опробованием продуктов сразу же после того, как их нарежут ломтиками, и определяют отсутствие или наличие постороннего запаха, привкуса, степень выраженности аромата пряностей и копчения, соленость;**

- **консистенцию продукта определяют надавливанием, разрезанием, разжевыванием. При этом устанавливают: плотность, рыхлость, нежность, жесткость, крошливость, однородность.**

Наличие липкости и ослизнения устанавливают прикосновением пальцев к продукту. Запах в глубине продукта определяют после разреза оболочки, поверхностного слоя и быстрого разламывания колбасных

изделий. Запах целых неразрезанных изделий определяют по запаху только что вынутой из толщи продукта специальной деревянной или металлической спицы, или иглы. Вкус и запах сосисок и сарделек устанавливают в разогретом состоянии, для чего их целиком опускают в кипящую воду и нагревают до 60-70°C внутри продукта. Консистенцию определяют легким надавливанием на свежий разрез батона. Крошливость фарша можно определить осторожным разламыванием среза колбасы. Цвет фарша и шпика оценивают со стороны оболочки после ее снятия с половины батона и на разрезе. Для исследования на вкус колбасы режут на ломтики толщиной 3-4 мм - вареные; 2-3 мм - полукопченые; 1,5-2 мм - сырокопченые; 5 мм - ливерные.

Доброкачественные колбасные изделия должны соответствовать определенным требованиям и удовлетворять традиционно сложившиеся вкусы и потребности населения.

Батоны всех видов колбас должны быть чистыми, сухими, без повреждений оболочки, пятен, слипов и наплывов фарша, без бульонных и жировых отеков. Оболочки должны плотно прилегать к фаршу. Вареные и полукопченые колбасы должны иметь упругую консистенцию; варенокопченые, сырокопченые и сыровяленые - плотную; кровяные - от упругой до мажущейся; ливерные и паштеты - мажущуюся; зельцы - плотную, упругую консистенцию.

Фарш на разрезе вареных колбас должен быть розовым или светло-розовым, хорошо перемешанным; в нем равномерно распределены кусочки шпика, грудинки, языка или других компонентов определенного размера. Не допускаются к реализации варёные колбасы с загрязнениями на оболочке, с лопнувшими или поломанными батонами, с рыхлым фаршем, с наплывами фарша над оболочкой или слипами длиной от 5-30 см и более (при длине колбас менее 30 см размер слипов уменьшается наполовину), с наличием серых пятен и крупных пустот, а также бульонно-жировых отеков величиной 2-5 см и более.

Не разрешается выпускать в реализацию сосиски и сардельки с загрязнениями оболочки, отеками жира и бульона, серого цвета с поверхности или на разрезе, со липами по всей длине батона (более 10% всей партии).

В мясных хлебах поверхность должна быть равномерно обжаренная, сухая, гладкая, без загрязнений. Консистенция упругая. Фарш на разрезе розового или светло-розового цвета, равномерно перемешан. Запах и вкус, свойственный каждому виду продукции. Не разрешается реализовывать

мясные хлеба с загрязнениями поверхности, рыхлым фаршем, с наличием в фарше серых пятен, оплавленного шпика, отеков бульона и жира.

В фаршированных колбасах поверхность батонов должна быть чистой и сухой, без повреждений, пятен, слипов и наплывов фарша на оболочке. Слой шпика под оболочкой допускается высотой не более 5 см. Отклонением от нормы считается оплавление и окрашивание шпика. Консистенция изделия упругая. На разрезе не допускается наличие пустот, серых пятен, видимых включений грубой соединительной ткани. Запах и вкус, характерные для каждого вида изделий. Разрешается реализовать не цельные батоны фаршированных колбас с открытым концом (с одной стороны) массой не менее 2 кг. Срезанный конец батона заворачивают пергаментом на применение которого есть разрешение санэпиднадзора, и перевязывают шпагатом или резинкой.

Фарш полукопченых, варено-копченых, сырокопченых и сыровяленых колбас должен быть от розового до темно-красного цвета, без серых пятен, пустот и содержать кусочки шпика, жирной или полужирной свинины (в полукопченых и варено-копченых в соответствии с рецептурами возможно наличие кусочков сыра твердых сортов) определенного размера.

В варено-копченых, полукопченых и сырокопченых колбасах на поверхности батонов не допускаются загрязнения, наличие плесени, повреждения оболочки, слипы и наплывы фарша. Консистенция плотная. В наружном слое сырокопченых колбас могут быть уплотненная (закал глубиной не более 3 мм). В фарше исключается присутствие серых пятен, пустот. Цвет колбас розовый, вкус слегка острый, солоноватый с выраженным ароматом копчения и пряностей. Фарш ливерных колбас и паштетов – от серого до розовато-красного цвета, фарш кровяных колбас – от темно-коричневого до коричневого, с кусочками шпика, грудинки, вареных субпродуктов или крупы. Запах и вкус колбасных изделий должны быть свойственны данному виду продукта, с выраженным ароматом пряностей без посторонних запаха и вкуса, полукопченые, варено-копченые и сырокопченые – с выраженным ароматом копчения.

В копченостях поверхность изделий должна быть сухой, без загрязнений, бахромок и остатков щетины. На буженине и карбонаде допускается наличие кристаллов поваренной соли и частиц пряностей. Консистенция копченостей плотная и упругая. Цвет, запах и вкус должны соответствовать специфике каждого продукта. У копченой баранины цвет на разрезе мышечной части розово-красный. У говядины – темно-красный, равномерный, без пятен. У говядины жир может быть слегка желтоватым. Копчености должны иметь приятный аромат копчения и солоноватый вкус.

Запах в глубине колбасного батона и сарделек в натуральной оболочке определяют, прокалывая их, наблюдая при этом за появлением капель жидкости; консистенцию продукта – надавливанием, разрезанием, разжевыванием при этом устанавливают плотность, рыхлость, нежность, жесткость, крошливость.

6. 2 Дефекты и пороки колбасных изделий

Дефекты вареных колбас, сосисок и сарделек. В процессе производства в колбасах могут отмечаться различные пороки, снижающие их пищевую ценность и ухудшающие товарный вид продукции. К ним относятся наличие постороннего запаха или привкуса, бульонно-жировые отеки, слипы, разрыв оболочки, деформация батонов, наплыв фарша на оболочке, большие пустоты в фарше, слабая обжарка, недовар, наличие в фарше посторонних предметов, фарш ломкой или рыхлой консистенции, шпик желтый или сильно оплавленный. Колбасу с такими дефектами выпускать в реализацию запрещается, ее бракуют или с разрешения ветеринарного врача направляют на доработку или переработку. При долгом неправильном хранении колбасные изделия начинают портиться. Различают несколько видов порчи: гнилостное разложение, кислое брожение, прогоркание жира и другие, чаще всего встречается комбинация различных видов порчи. Кислое брожение происходит в случае недостаточной проварки колбас, фарш которых содержит много воды или крахмала, муку и другие растительные продукты. Гнилостное разложение возникает как на поверхности, так и в глубине батона, особенно в воздушных пустотах. Это объясняется тем, что при варке колбас погибают вегетативные формы микробов, но споры и кокки сохраняются. В воздушных пустотах содержатся влага и кислород, необходимые для развития бактерий.

Дефекты вареных колбас, сосисок и сарделек обуславливают сортировку и выбраковку продукта.

Не допускаются для реализации вареные колбасы, сосиски и сардельки:

| |
|---|
| с рыхлым фаршем; |
| - имеющие загрязнения на оболочке; |
| - с желтым или осалившимся шпиком; |
| - сильно плавленным шпиком (при тепловой обработке); |
| - с наплывом фарша над оболочкой (разрыв при шприцевании фарша); |
| - нарушающий целостность батона; |
| - со слипами (когда батоны в процессе обжарки и варки слипаются и в результате остаются светлые полосы) на колбасах высшего сорта длиной более 5см, первого - более 10, второго - более 30см; |
| - для колбас длиной менее 30 см, размер слипов соответственно уменьшается наполовину; |
| - для сосисок и сарделек - со слипами по всей длине батонов (более 10 % от всей партии); |
| - с наличием серых пятен и крупных пустот, для сосисок и сарделек – с серым цветом батонов и серыми пятнами на разрезе; |
| - с наличием бульонно-жировых отеков под оболочкой: в колбасах высшего сорта - более 2 см, первого - 5, второго и третьего - более 10 см; |
| - сосисок и сарделек - с отеками жира и бульона; |
| - с бледным или тусклым цветом оболочки. |

Дефекты мясных хлебов. Не могут быть допущены для реализации мясные хлебы, имеющие загрязнения на поверхности, с рыхлым фаршем, с наличием серых пятен, оплавленного шпика, бульонных и жировых отеков.

Дефекты полукопченых колбас. Не допускается реализация полукопченых колбас, имеющих следующие дефекты: деформированные, ломаные, лопнувшие батоны, загрязненные жиром, сажой, пеплом, наличие плесени и слизь на оболочке; наличие слипов размером более 5 см; отеки жира по всей длине батона для колбас второго сорта и на отдельных участках батонов колбас первых сортов (более 5 см); бледный или тусклый цвет оболочки; недовар и серые пятна на разрезе; рыхлый, фарш; желтый, осалившийся или оплавленный шпик; сильно плавленный шпик.

Дефекты варено-копченых и сырокопченых колбас аналогичны дефектам полукопченых. Для сырокопченых колбас не допускается также закал (уплотненный поверхностный слой под оболочкой) свыше 3 мм. На поверхности батонов может быть белый сухой налет плесени, которая не проникает через оболочку в фарш и легко удаляется. Чтобы придать батонам привлекательный внешний вид их протирают 1%-ным раствором поваренной соли, а затем растительным маслом. Белый налет в виде выкристаллизовавшейся поваренной соли ("поседение") не является признаком их несвежести и также легко удаляется. В сырокопченых

колбасах, кроме указанных, отмечены и такие дефекты, как складчатость и отставание оболочки; неравномерный или слишком темный цвет батонов; воздушные пустоты («фонари»), пористость; мягкая консистенция и влажная колбаса; серые, коричневые или зеленые пятна в толще фарша; отставание оболочки.

Дефекты кровяных и ливерных колбас, паштетов и зельцев могут быть такие же, как вареных колбас, сосисок и сарделек.

Причины порчи колбас. Все причины порчи обусловлены нарушениями технологических процессов при изготовлении и хранении колбас.

Кислое брожение. Вызывается микроорганизмами, разлагающими углеводы с образованием кислоты.

Плесневение. Вызывается развитием различных видов микроскопических грибов.

Изменение цвета колбасных изделий. Серый цвет появляется при хранении колбас в условиях повышенной влажности, серый цвет на разрезе возникает в результате жизнедеятельности в сырье и готовых изделиях микроорганизмов, образующих пероксидазы, оксидазы и сероводород, которые превращают азоксигемохромоген в гематин, имеющий серый цвет. В сырокопченой колбасе на оболочке и под ней можно обнаружить черные пятна, причиной появления которых может быть применение аскорбиновой кислоты и ее солей. Черные пятна могут возникать при совместной переработке замороженного и охлажденного сырья.

Ослизнение колбасных изделий. Проявляется в виде серовато-белого налета. Вызывают микрококки, стрептококки, дрожжи или грамотрицательные психрофильные бактерии.

Прогоркание колбас и копченостей. Происходит при применении сырья с признаками прогоркания, а также в случаях нарушения условий и сроков хранения колбасных изделий.

Гнилостное разложение колбас. С участием различных видов микроорганизмов, которые размножаются при нарушении температурных режимов хранения продукции. При обнаружении любого из перечисленных видов порчи колбасы в реализацию не выпускают.

6.3 Физико-химический анализ колбасных изделий

Физико-химические показатели колбас включают определение массовой доли влаги, содержания поваренной соли, нитритов, крахмала (в случае его использования), фосфора в пересчете на P_2O_5 (в случае использования фосфатов), а также остаточной активности кислой фосфатазы.

Отбор проб. Пробы колбас отбирают в соответствии с ГОСТ:

ГОСТ 9792-73 Колбасные изделия и продукты из свинины, баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц. Правила приемки и методы отбора проб

- ГОСТ Р 51447-99 (ИСО 3100-1-91) Мясо и мясные продукты. Методы отбора проб.

Для определения химических показателей из партии колбас берут две точечные пробы от разных единиц продукции массой 200-250 г и составляют объединенную пробу массой 400- 500 г. При подготовке проб к анализу с колбасных изделий снимают оболочку и дважды измельчают на мясорубке с диаметром отверстий в решетке 3-4 мм, тщательно перемешивая полученный фарш.

Определение содержания влаги. Проводят в соответствии с ГОСТ:

ГОСТ 9793-74 Продукты мясные. Методы определения влаги;

- ГОСТ Р 51479-99 (ИСО 1442-97) Мясо и мясные продукты.

Для этого навеску фарша около 3 г взвешивают в бюксе, предварительно высушенной до постоянной массы, с 5-6 г прокаленного песка и стеклянной палочкой с точностью до 4-го знака. Продукт высушивают в сушильном шкафу при температуре 150°С в течение 1 часа. После высушивания бюксы с навеской охлаждают в эксикаторе с закрытой крышкой в течение 30 минут и взвешивают.

Содержание влаги (X, %) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{(m_1 - m_2) \times 100}{m_0}$$

где:

- m_1 – масса колбасы с бюксой до высушивания, г.
- m_2 – масса колбасы с бюксой после высушивания, г.
- m_0 – масса колбасы, г.

Вычисление производят с точностью до 0,1%. Конечный результат анализа выражают как среднее арифметическое из двух параллельных определений, расхождение между которыми не должно превышать 0,5%.

В зависимости от вида используемого сырья, массовая доля влаги в колбасных изделиях должна находиться на следующем уровне: вареные

колбасы, сосиски, сардельки, мясные хлебы – 55-75%; полукопченые колбасы – 35-55%; варено-копченые – 38-45%; сырокопченые и сыровяленые – 25-30%; ливерные колбасы и паштеты – 60-65%; кровяные колбасы – не регламентируется.

Определение хлорида натрия. Определяют в соответствии с ГОСТ:

ГОСТ 9792-73 Колбасные изделия и продукты из свинины, баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц. Правила приемки и методы отбора проб.

- ГОСТ 9957-73 Колбасные изделия и продукты из свинины, баранины и говядины. Метод определения хлористого натрия;

- ГОСТ Р 51480-99 (ИСО 1841-1-96) Мясо и мясные продукты. Определение массовой доли хлоридов. Метод Фольгарда;

- ГОСТ Р 51444-99 (ИСО 1841-2-96) Мясо и мясные продукты.

Потенциометрический метод определения массовой доли хлорида натрия. По методу Мора навеску пробы исследуемых колбасных изделий измельчают в виде фарша, взвешивают на аналитических весах около 3 г с точностью до 1 мг, переносят в химический стакан и приливают точно 100 мл дистиллированной воды.

При исследовании вареных колбас фарш в стакане с водой размешивают стеклянной палочкой с резиновым наконечником. Через 15 мин, включая 5 мин на отстаивание, из стакана берут в колбу для титрования 5 - 10 мл водной вытяжки. приливают 1 мл 10 % раствора хромата калия и титруют 0,05 н раствором азотнокислого серебра. Титрование продолжают до появления в колбе красно-оранжевого окрашивания.

При вычислении содержания хлористого натрия в процентах к навеске пользуются формулой:

$$X = \frac{0,0029 \times K \times V_1 \times 100}{V_2 \times m_0}, \text{ где}$$

V_1 - количество мл раствора азотнокислого серебра, пошедшее на титрование;

K - коэффициент нормальности раствора азотнокислого серебра (0,1 н);

$0,0029$ – количество поваренной соли, эквивалентное 7 мл 0,05н р-ра азотно-кислого серебра, г;

m_0 - навеска исследуемого вещества, г;

- объем вытяжки, приготовленный из навески исследуемого продукта, мл;

V_2 - объем вытяжки, взятой для титрования, мл.

Определение содержания нитрита. Определяют в соответствии с ГОСТ:

- **ГОСТ 9792-73 Колбасные изделия и продукты из свинины, баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц. Правила приемки и методы отбора проб.**

- **ГОСТ 8558.1-78 Продукты мясные. Методы определения нитрита;**

- **ГОСТ 29299-92 (ИСО 2918-75) Мясо и мясные продукты.**

Метод определения нитрита натрия. Для этого в химический стакан отвешивают 20 г колбасного фарша, приливают 35-40 мл подогретой дистиллированной воды, смесь настаивают 10 мин, периодически помешивая стеклянной палочкой. После настаивания фильтруют через слой, смоченной водой вату. Пробу промывают несколько раз, доводя объем фильтрата до 150 мл, затем фильтрат охлаждают.

Для приготовления вытяжки из сырокопченых продуктов навеску заливают 200 мл дистиллированной воды, подогретой до 50-60°C, и настаивают 30 мин, периодически помешивая, затем 20 мл фильтрата помещают в колбу, добавляют 10 мл 0,1 н едкого натра, 40 мл 0,45% раствора сернокислого цинка. Нагревают 5 мин. в кипящей водяной бане, после чего охлаждают и фильтруют. 5 мл безбелкового фильтрата переносят в мерную колбу на 100 мл, приливают 1 мл 5% раствора аммиака, 2 мл 0,1 н раствора соляной кислоты, 5 мл стандартного раствора нитрита натрия, содержащего в 1 мл 1 мкг NaNO_2 , затем в колбу добавляют 15 мл реактива Грисса и через 15 минут измеряют интенсивность окраски на ФЭКе. Одновременно измеряют окраску 5 мл образцового раствора, для чего в колбу вместо безбелкового фильтрата добавляют дистиллированную воду. По полученной оптической плотности на калибровочном графике находят концентрацию нитрита в 1 мл окрашенного раствора. Содержание нитрита (X , мг%) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(c - c_1) \times 200 \times 100 \times 30 \times 100}{m_0 \times 20 \times 5 \times 1000} \text{, где}$$

- с-содержание нитрита в 1 мл испытуемого раствора, мкг;
- c_1 - содержание нитрита в 1 мл образцов раствора, мкг;
- m_0 - масса колбасы, г;
- **30** – объем окрашенного раствора.

Массовая доля остаточного нитрита натрия не должна превышать в большинстве колбасных изделий - **0,005%**, в сырокопченых и сыровяленых колбасах – **0,003%**.

Определение крахмала. Определяют в соответствии с ГОСТ:

ГОСТ 9792-73 Колбасные изделия и продукты из свинины, баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц. Правила приемки и методы отбора проб.

- ГОСТ 10574-91 Продукты мясные. Методы определения крахмала;

- ГОСТ 29301-92 (ИСО 5554-78) Продукты мясные. Метод определения крахмала.

При определении содержания крахмала в колбасе используют качественный и количественный методы исследования.

При качественном определении – на поверхность свежего разреза колбасы наносят каплю раствора Люголя. Появление синей или черно-синей окраски указывает на присутствие крахмала.

При количественном определении – в колбу помещают 20 г измельченного фарша и небольшими порциями при перемешивании добавляют 80 мл 10% раствора соляной кислоты. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и содержимое кипятят 15 мин, периодически помешивая, затем охлаждают и фильтруют. К 25 мл фильтрата добавляют 1 каплю 1% раствора фенолфталеина и нейтрализуют 10% раствором едкого натра до появления красноватой окраски от одной капли, затем по каплям добавляют 10% соляную кислоту до исчезновения окраски, 1,5 мл 15% раствора желтой кровяной соли, 1,5 мл 30% раствора сернокислого цинка, охлаждают, перемешивают, фильтруют, к 10 мл прозрачного фильтрата добавляют 20 мл жидкости Фелинга, взбалтывают, кипятят 3 мин, охлаждают в холодной воде. 20 мл раствора без осадка помещают в колбу добавляют 10 мл 30% раствора перманганата калия, 10 мл 25% раствора серной кислоты и титруют из микробюретки 0,1 н раствором тиосульфата до слабозеленой окраски,

добавляют 1 мл 1% раствора крахмала и медленно титруют до исчезновения синей окраски. Содержание крахмала высчитывают по формуле:

$$X = \frac{(250 - 2) \times 50 \times 100a}{25 \times 20 \times 10},$$

где, а – количество крахмала, соответствующее количеству 0,1 н раствора тиосульфата, г.

Определение содержания фосфатов. Определяют в соответствии с ГОСТ:

- ГОСТ 9792-73 Колбасные изделия и продукты из свинины, баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц. Правила приемки и методы отбора проб;

- ГОСТ 9794-74 Продукты мясные. Методы определения содержания общего фосфора.

Исследования проводят гравиметрическим методом (основан на минерализации пробы азотной и серной кислотами, осаждении фосфора в виде фосфомолибдата хинолина и определении массы осадка) и фотометрическим методом (основан на реакции фосфора с молибденово-кислым аммонием в присутствии гидрохинона и сульфита натрия с образованием окрашенного соединения, интенсивность окраски которого измеряют фотометрически). В случае применения фосфатов при производстве колбасных изделий массовая доля фосфора в пересчете на P_2O_5 не должна превышать 1%.

Определение остаточной активности кислой фосфатазы.
Определение эффективности тепловой обработки. Определяют в соответствии с ГОСТ:

- ГОСТ 9792-73 Колбасные изделия и продукты из свинины, баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц. Правила приемки и методы отбора проб.

- ГОСТ 23231-90 Колбасы и продукты мясные вареные. Метод определения остаточной активности кислой фосфатазы.

Метод основан на фотометрическом определении в продукте интенсивности развивающейся окраски, зависящей от остаточной активности кислой фосфатазы, выраженной массовой долей фенола. Метод применяют в случае сомнения в проваренности продукта.

Остаточная активность кислой фосфатазы в вареных колбасах, сосисках, сардельках и мясных хлебах не должна превышать **0,006%**.

6.4 Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности колбасных изделий

Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов, в том числе колбасных изделий, регламентируются Гигиеническими требованиями безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов, разработанными на основании Федеральных законов Российской Федерации «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» и «О качестве и безопасности пищевых продуктов», утвержденными постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 14.11.01 г. № 36 и введенным в действие постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от г. и нормативным документом «Дополнения и изменения № 2 к СанПиН 2.3.2.1078-01», утвержденным Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 9 апреля 2003 г., и введенным в производство с 25 июня 2003 г.

Гигиенические показатели. Содержание токсичных элементов, бенз(а)-пирена (для копченых продуктов), нитрозаминов (сумма НДМА и НДЭА), антибиотиков, пестицидов и радионуклидов в колбасных изделиях не должно превышать допустимых уровней, установленных СанПиН 2.3.2.1078-01 с изменениями и дополнениями.

Токсичные элементы, допустимые уровни, мг/кг, не более: свинец -0,5; кадмий - 0,05; мышьяк -0,1; ртуть- 0,03.

Токсичные элементы определяют в соответствии с ГОСТ:

ГОСТ 30178-96 Сырье и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения токсичных элементов;

- ГОСТ 30538 -97 Продукты пищевые. Методика определения токсичных элементов атомно-эмиссионным методом;

- ГОСТ Р 51301-99 Продукты пищевые и продовольственное сырье. Инверсионно-вольтамперометрические методы определения содержания токсичных элементов (кадмия, свинца, меди и цинка);

- свинец – ГОСТ 26932 -86 [Сырье и продукты пищевые. Методы определения свинца](#) ;

- кадмий – ГОСТ 26933-86, [Сырье и продукты пищевые. Методы определения кадмия](#);

- мышьяк - ГОСТ 26930-86 [«Сырье и продукты пищевые. Метод определения мышьяка»](#); ГОСТ Р 51766-2001 Атомно-абсорбционный метод определения мышьяка; ГОСТ Р 51962- 2002 Продукты пищевые и продовольственное сырье. Инверсионно-вольтамперометрический метод определения массовой концентрации мышьяка;

- бенз(а)пирен, мг/кг, не более: 0,001 (для копченых продуктов) - ГОСТ Р 51650 -2000 «Сырье и продукты пищевые. Методы определения массовой доли бенз(а)пирена»

Нитрозамины (сумма НДМА и НДЭА), мг/кг, не более: 0,002, для копченых продуктов - 0,004, МУК 4.4.1.011-93 «Определение летучих N-нитрозаминов в продовольственном сырье и пищевых продуктах»

Антибиотики, допустимые уровни, ед/г:

- ❖ левомицетин - не допускается (для колбасных изделий с олениной и мясом диких животных - менее 0,01);
- ❖ тетрациклиновая группа - не допускается (для колбасных изделий с олениной и мясом диких животных - менее 0,01);
- ❖ гризин - не допускается (для колбасных изделий с олениной и мясом диких животных - менее 0,01);
- ❖ бацитрацин - не допускается (для колбасных изделий с олениной и мясом диких животных - менее 0,01).

Антибиотики определяют в соответствии с нормативными документами:

- ❖ МУ 3049-84 Методические указания по определению остаточных количеств антибиотиков в продуктах животноводства;
- ❖ МУК 4.2.026-95.Экспресс метод определения антибиотиков в пищевых продуктах.

Пестициды, допустимые уровни, мг/кг, не более:

- ❖ гексахлорциклогексан (а-, (З-, у-изомеры) - 0,1;
- ❖ ДДТ и его метаболиты - 0,1.

Пестициды определяют в соответствии с нормативными документами:

- ❖ МУ N 2142-80 Методические указания по определению хлорорганических пестицидов в воде, продуктах питания, кормах, табачных изделиях методом хроматографии в тонком слое;

- ❖ МУ N 1222-75 Определение хлорорганических пестицидов в мясе, продуктах и животных жирах хроматографией в тонком слое.
Радионуклиды, Бк/кг, не более:
- ❖ цезий-137 - 160 (мясо без костей); 320 (оленина без костей, мясо диких животных без костей);
- ❖ стронций-90 - 50 (мясо без костей); 100 (оленина без костей, мясо диких животных без костей).

Радионуклиды определяют в соответствии с нормативными документами:

- ❖ МУК 2.6.2.717-98 «Радиационный контроль. Стронций -90 и Цезий - 137. Пищевые продукты. Отбор проб, анализ и гигиеническая оценка. Методические указания»;
- ❖ МУ 5779-912 «Цезий -137. Определение в пищевых продуктах»;
- ❖ МУ 5778 -91 «Стронций -90. Определение в пищевых продуктах»

Показатели пищевой ценности. В пищевых продуктах, в том числе колбасных изделиях, определяют показатели пищевой ценности. Показатели пищевой ценности колбасных изделий обосновывает изготовитель (разработчик технических документов) на основе аналитических методов исследования и (или) с использованием расчетного метода с учетом рецептуры и данных по составу сырья.

Колбасные изделия по показателям пищевой ценности должны соответствовать СанПиН 2.3.2.1078-01 (таблица 2).

Таблица 2 - Пищевая ценность колбасных изделий (СанПиН 2.3.2.1078-01)

| Индекс | Наименование колбасных изделий | Массовая доля на 100 г продукта, г | | |
|------------|--------------------------------|------------------------------------|----------------|------------------|
| | | белка, не менее | жира, не более | углеводов, менее |
| 2.1.1.1.1. | Вареные | 11 | 25 | 2 |
| 2.1.1.1.2. | Сосиски и сардельки | 10 | 30 | 1 |
| 2.1.1.1.3. | Мясные хлебы | 11 | 30 | 2 |
| 2.1.1.1.4. | Варено-копченые | 16 | 38 | 1 |
| 2.1.1.1.5. | Полукопченые | 16 | 45 | 1 |
| 2.1.1.1.6. | Сырокопченые | 20 | 50 | 1 |

6.4.4.5 Микробиологические исследования колбасных изделий

Микробиологический анализ колбасных изделий и продуктов из мяса проводят периодически, но не реже одного раза в 10 дней, а также по требованию контролирующих организаций и в случаях установления использования в производстве подозрительного по доброкачественности сырья и вспомогательных материалов, нарушения температурного или санитарно-гигиенического режимов при изготовлении продукции.

Бактериоскопия мазков–отпечатков. С этой целью поверхность колбасного батона прижигают раскаленным металлическим шпателем. Стерильными ножницами вырезают кусочек и делают 2-3 мазка–отпечатка на предметном стекле. Мазки после высушивания на воздухе и фиксации над пламенем горелки окрашивают по Граму. Для анализа поверхности изделий без оболочки после снятия упаковки с каждого образца делают смыв стерильным увлажненным тампоном.

По микробиологическим показателям колбасные изделия должны отвечать требованиям, установленным Гигиеническими требованиями безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов (СанПиН 2.3.2.1078-01).

Гигиенические нормативы по микробиологическим показателям безопасности для отдельных видов колбасных изделий зависят от вида используемого сырья и особенностей технологических процессов.

Колбасы и продукты из мяса убойных животных сырокопченые и сыровяленые, в том числе нарезанные и упакованные под вакуумом (индекс 1.1.4.1.):

- мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы (КМАФАнМ), КОЕ/г – не допускаются;

- бактерии группы кишечных палочек (колиформы) - не допускаются в 0,1 г продукта;

- сульфитредуцирующие клостридии - не допускаются в 0,01 г продукта;

- *St. aureus* - не допускаются в 1 г продукта;

- патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы - не допускаются в 25 г продукта *E. coli* в 1 г и *L. monocytogenes* в 25 г продукта не допускаются.

Колбасы полукопченые и варено-копченые (индекс 1.1.4.2.):

- мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы (КМАФАнМ), КОЕ/г - не допускаются;

- бактерии группы кишечных палочек (колиформы) - не допускаются в 0,1 г продукта;

- сульфитредуцирующие клостридии - не допускаются в 0,01 г продукта;

- *St. aureus* - не допускаются в 1 г продукта;

- патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, - не допускаются в 25 г продукта *L. monocytogenes* в 25 г продукта не допускаются.

Колбасы варено-копченые, полукопченые, сроки годности которых превышают 5 сут, в том числе нарезанные и упакованные под вакуумом в условиях модифицированной атмосферы (индекс 1.1.4.3.):

- мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы (КМАФАнМ), КОЕ/г - не допускаются;

- бактерии группы кишечных палочек (колиформы) - не допускаются в 1 г продукта;

- сульфитредуцирующие клостридии - не допускаются в 0,1 г продукта; *St. aureus* - не допускаются в 1 г продукта;

- патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, - не допускаются в 25 г продукта *L. monocytogenes* в 25 г продукта не допускаются.

Колбасные изделия вареные, сосиски, сардельки, мясные хлебы (индекс 1.1.4.4.):

- мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы (КМАФАнМ), КОЕ/г - высшего и 1-го сортов - 1×10^3 , 2-го сорта - $2,5 \times 10^3$;

- бактерии группы кишечных палочек (колиформы) - не допускаются в 1 г продукта;

- сульфитредуцирующие клостридии - не допускаются в 0,01 г продукта;

- *St. aureus* - не допускаются в 1 г продукта;

- патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, - не допускаются в 25 г продукта *L. monocytogenes* в 25 г продукта не допускаются в колбасных изделиях высшего и 1-го сортов.

Колбасные изделия вареные с добавлением консервантов, в том числе деликатесные (индекс 1.1.4.5.):

- мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы (КМАФАнМ), КОЕ/г - 1×10^3 ;

- бактерии группы кишечных палочек (колиформы) - не допускаются в 1 г продукта;

- сульфитредуцирующие клостридии - не допускаются в 0,1 г продукта; *S. aureus* - не допускаются в 1 г продукта;

- патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, - не допускаются в 25 г продукта.

Колбасные изделия вареные, сроки годности которых превышают 5сут, нарезанные и упакованные под вакуумом в условиях модифицированной атмосферы (индекс 1.1.4.6.):

- мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы (КМАФАнМ), КОЕ/г- 1×10^3 (для сервировочной нарезки - $2,5 \times 10^3$);

- бактерии группы кишечных палочек (колиформы) не допускаются в 1 г продукта;

- сульфитредуцирующие клостридии - не допускаются в 0,1 г

продукта; *S. aureus* — не допускаются в 1 г продукта;

- патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, - не допускаются в 25 г продукта.

Колбасы кровяные (индекс 1.1.5.1.):

- мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы (КМАФАнМ), КОЕ/г- 2×10^3 ;

- бактерии группы кишечных палочек (колиформы) не допускаются в 1 г продукта;

- сульфитредуцирующие клостридии - не допускаются в 0,01 г продукта;

- *St. aureus* - не допускаются;

- патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, - не допускаются в 25 г продукта.

Для продуктов, сроки годности которых превышают 2 суток:

- *St. aureus* не допускаются в 1 г продукта;
- сульфитредуцирующие клостридии не допускаются в 0,1 г продукта.

Зельцы (индекс 1.1.5.2.):

- мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы (КМАФАнМ), КОЕ/г - 2×10^3 ;

- бактерии группы кишечных палочек (колиформы) - не допускаются в 1 г продукта;

- сульфитредуцирующие клостридии - не допускаются в 0,1 г продукта- *St. aureus*- не допускаются в 1 г продукта;

- патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, - не допускаются в 25 г продукта.

Колбасы ливерные (индекс 1.1.5.3.):

- мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы (КМАФАнМ), КОЕ/г- 2×10^3 ;

- бактерии группы кишечных палочек (колиформы) - не допускаются в 1 г продукта;

- сульфитредуцирующие клостридии - не допускаются в 0,01 г продукта;

St. aureus - не допускаются;

- патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, - не допускаются в 25 г продукта.

Для продуктов, сроки годности которых превышают 2 суток:

- ❖ *St. aureus* не допускаются в 1 г продукта;
- ❖ сульфитредуцирующие клостридии не допускаются в 0,1 г продукта.

Паштеты из печени и (или) мяса, в том числе в оболочках (индекс 2.1.1.1.1.)

- мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы (КМАФАМ), КОЕ/г - 1×10^3 ;

- бактерии группы кишечных палочек (колиформы) - не допускаются в 1 г продукта;

- сульфитредуцирующие клостридии - не допускаются в 0,1 г продукта;

St. aureus - не допускаются;

- патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, - не допускаются в 25 г продукта.

Для продуктов, сроки годности которых превышают 2 суток:

- ❖ *St. aureus* не допускаются в 1 г продукта;
- ❖ *L. monocytogenes* не допускаются в 25 г продукта.

Желированные мясные продукты (студни, холодцы, заливные) (индекс

2.1.1.1.1):

- мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы (КМАФАМ), КОЕ/г - 2×10^3 ;

- бактерии группы кишечных палочек (колиформы) - не допускаются в 1 г продукта;

- сульфитредуцирующие клостридии - не допускаются в 0,1 г продукта;

- *St. aureus* - не допускаются в 1 г продукта;

- патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, - не допускаются в 25 г продукта;

Для продуктов, сроки годности которых превышают 2 суток:

- ❖ *St. aureus* не допускаются в 1 г продукта;
- ❖ *L. monocytogenes* не допускаются в 25 г продукта.

Сырокопченые и сыровяленые колбасы с использованием мяса птицы (индекс 1.1.11.1):

- бактерии группы кишечных палочек (колиформы) - не допускаются в 0,1 г продукта;

- сульфитредуцирующие клостридии - не допускаются в 0,01 г продукта;

- *St. aureus* - не допускаются в 1 г продукта;

- патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, - не допускаются в 25 г продукта.

- *E. coli* не допускаются в 1 г продукта;

- *L. monocytogenes* не допускаются в 25 г продукта.

Сырокопченые и сыровяленые колбасы с использованием мяса птицы, нарезанные и упакованные под вакуумом в условиях модифицированной атмосферы (индекс 1.1.11.2.):

- бактерии группы кишечных палочек (колиформы) - не допускаются в 0,1 г продукта;

- сульфитредуцирующие клостридии - не допускаются в 0,1 г продукта;

- *St. aureus* - не допускаются в 1 г продукта;

- патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, - не допускаются в 25 г продукта.

- *E. coli* не допускаются в 1 г продукта;

- *L. monocytogenes* не допускаются в 25 г продукта.

Полукопченые колбасы с использованием мяса птицы, в том числе нарезанные и упакованные под вакуумом в условиях модифицированной атмосферы (индекс 1.1.11.3.):

- бактерии группы кишечных палочек (колиформы) — не допускаются в 1 г продукта;

- сульфитредуцирующие клостридии — не допускаются в 0,01 г продукта;

- для полукопченых колбас, нарезанных и упакованных под вакуумом в условиях модифицированной атмосферы, - не допускаются в 0,1 г продукта; *St. aureus* - не допускаются в 1 г продукта;

- патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, - не допускаются в 25 г продукта.

Вареные колбасы, сосиски, сардельки, мясные хлебы, ветчина, рулеты с использованием мяса птицы (индекс 1.1.11.4.):

- мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы (КМАФАнМ), КОЕ/г- 1×10^3 ;

- бактерии группы кишечных палочек (колиформы) - не допускаются в 1 г продукта;

- сульфитредуцирующие клостридии - не допускаются в 0,1 г продукта; *St. aureus* - не допускаются в 1 г продукта;

- патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, - не допускаются в 25 г продукта.

- для сосисок и сарделек *L. monocytogenes* не допускаются в 25 г продукта.

Варено-копченые колбасы с использованием мяса птицы (индекс 1.1.11.4.):

- бактерии группы кишечных палочек (колиформы) - не допускаются в 1 г продукта;

- сульфитредуцирующие клостридии - не допускаются в 0,1 г продукта;

- *St. aureus* - не допускаются в 1 г продукта;

- патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, - не допускаются в 25 г продукта.

Паштеты из мяса птицы, в том числе с использованием птичьих потрохов (индекс 1.1.12.1.):

- мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы (КМАФАМ), КОЕ/г - 2×10^3 ;

- бактерии группы кишечных палочек (колиформы) - не допускаются в 1 г продукта;

- сульфитредуцирующие клостридии - не допускаются в 0,1 г продукта;

- *St. aureus* - не допускаются в 1 г продукта;

- патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, - не допускаются в 25 г продукта;

- *L. monocytogenes* не допускаются в 25 г продукта.

Паштеты из птичьей печени (индекс 1.1.12.2.):

- мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы (КМАФАМ), КОЕ/г - 5×10^3 ; бактерии группы кишечных палочек (колиформы) - не допускаются в 1 г продукта;

- сульфитредуцирующие клостридии - не допускаются в 0,1 г продукта;

- *St. aureus* - не допускаются в 0,1 г продукта;

- патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, - не допускаются в 25 г продукта;

- *L. monocytogenes* - не допускаются в 25 г продукта.

Желированные продукты из птицы: зельцы, студни, заливные и др., в том числе ассорти с использованием мяса убойных животных (индекс

- мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы (КМАФАМ), КОЕ/г - 2×10^3 ;

- бактерии группы кишечных палочек (колиформы) - не допускаются в 1 г продукта;

- сульфитредуцирующие клостридии - не допускаются в 0,1 г продукта;

- *St. aureus* - не допускаются в 1 г продукта;

- патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, - не допускаются в 25 г продукта.

1.1.12.3.):

Ливерные колбасы из мяса птицы и субпродуктов (индекс 1.1.12.4.):

- мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы (КМАФАнМ), КОЕ/г - 5×10^3 ;

- бактерии группы кишечных палочек (колиформы) - не допускаются в 1 г продукта;

- сульфитредуцирующие клостридии - не допускаются в 0,1 г продукта;

St. aureus - не допускаются в 1 г продукта;

- патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, - не допускаются в 25 г продукта.

Микробиологические показатели определяют по ГОСТ:

- ГОСТ 9792-73 Колбасные изделия и продукты из свинины, баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц. Правила приемки и методы отбора проб;

- ГОСТ Р 51447-99 (ИСО 3100-1-91) Мясо и мясные продукты. Методы отбора проб;

- ГОСТ 26669-85 Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов;

- ГОСТ 9958-81 Колбасные изделия и продукты из мяса. Методы бактериологического анализа.

Пробы хранят при температуре 6-8°C, анализ проводят не позднее 4 ч с момента отбора проб.

При подготовке объединенную пробу массой 50 г составляют из точечных проб следующим образом:

- Колбасные изделия в оболочке помещают в эмалированную тарелку, тщательно протирают ватным тампоном, смоченным спиртом, и дважды обжигают над пламенем.

- Затем батоны разрезают продольно стерильным (фламбированным) ножом на две половинки, не рассекая оболочки противоположной стороны батона. Пробу отбирают из нескольких участков центральной части и из-под оболочки обеих половинок батона.

- Из объединенной пробы каждого образца отбирают в стерильную посуду (пергамент) навеску массой 20 г с погрешностью, не превышающей 0,1 г.

- Навеску помещают в стерильную колбу гомогенизатора для приготовления испытуемой взвеси. Для этого в колбу добавляют 0,1% раствор стерильной пептонной воды в четырехкратном количестве и гомогенизируют в электрическом смесителе; вначале измельчают материал на кусочки замедленной скоростью вращения ножей, затем при 15000 – 20000 оборотов в минуту в течение 2,5 минут.

- для посевов на питательные среды стерильной градуированной пипеткой отбирают взвесь после 15 минут выдержки при комнатной температуре. 1 см³ приготовленной испытуемой взвеси содержит 0,2 г продукта.

Определение общего количества микробов (КМАФАнМ) в 1 г продукта.
Основным нормативным документом при определении КМАФАнМ является

ГОСТ 10444.15-94 Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.

Сущность метода заключается в способности мезофильных аэробов и факультативных анаэробов расти на питательном агаре при температуре $37 \pm 5^\circ\text{C}$ с образованием колоний, видимых при пятикратном увеличении. Питательный агар (МПА) расплавляют на водяной бане и охлаждают до температуры 45°C .

Стерильные чашки Петри раскладывают на столе, подписывают наименование анализируемого продукта, дату посева и количество посеянного продукта. Из каждой пробы должно быть сделано не менее двух посевов, различных по объему и взятых с таким расчетом, чтобы на чашках выросло от 30 до 300 колоний. При этом на одну чашку Петри проводят посев 0,1 г, а на другую – 0,01 г продукта.

Для посева 0,1 г продукта готовят первое десятикратное разведение продукта испытуемой взвеси, переносят ее в пробирку с 5 куб. см стерильного физиологического раствора, не прикасаясь к стенкам пробирки, чтобы избежать смывания бактерий с наружной стороны (1 куб. см полученного раствора содержит 0,1 г испытуемого продукта). Другой стерильной пипеткой тщательно перемешивают содержимое пробирки, отбирают 1 куб. см полученного раствора и переносят в стерильную чашку Петри, слегка приоткрывая крышку.

Для посева 0,01 г продукта готовят следующее разведение: другой стерильной пипеткой тщательно перемешивают содержимое пробирки, отбирают 1 куб. см и переносят в пробирку с 9 куб. см стерильного физиологического раствора. 1 куб. см испытуемого раствора вторичного разведения содержит 0,01 г испытуемого продукта. 1 куб. см этого раствора переносят в стерильную чашку Петри, как описано выше. При необходимости таким же образом готовят последующие разведения.

После внесения разведения анализируемой взвеси в чашку Петри чашку заливают 12-15 куб. см расплавленного и охлажденного питательного агара при фламбировании краев пробирки или бутылки, где он содержится. Быстро смешивают с мясопептонным питательным агаром, осторожно наклоняя или вращая чашку по поверхности стола. Необходимо избегать образования пузырьков воздуха, незалитых участков дна чашки, попадания среды на края и крышку чашки. Для того, чтобы помешать развитию на поверхности спорообразующих микробов и бактерий группы протей в Н-форме, допускают наслоение расплавленного и охлажденного до температуры $45-50^\circ\text{C}$ холодного агара толщиной 3-4 мм.

После застывания агара чашки Петри переворачивают и помещают в термостат в температурой 37° С на 48 часов. Через 48 часов подсчитывают общее число колоний бактерий, выросших на чашках. Колонии, выросшие на поверхности, а также в глубине агара, подсчитывают с помощью лупы с пятикратным увеличением или специальным прибором с лупой. Для этого чашку кладут вверх дном на черный фон и каждую колонию отмечают со стороны дна тушью или чернилами для стекла. Для определения общего количества микробов в 1 г продукта подсчитанное количество колоний умножают на степень разведения анализируемого продукта. За окончательный результат определения количества бактерий в 1 г анализируемого продукта принимают среднее арифметическое результатов подсчета двух чашек разной массы продукта.

Определение бактерий группы кишечной палочки (БГКП) в продукта. Основным нормативным документом является **ГОСТ Р 50474-93 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий)**

Метод выявления и определения колиформных бактерий основан на высеве определенного количества продукта и (или) разведений навески продукта в жидкую селективную среду с лактозой, инкубировании посевов, учете положительных пробирок, пересеве культуральной жидкости в жидкую селективную среду для учета газообразования или пересева, при необходимости, культуральной жидкости на поверхность агаризованной селективно-диагностической среды для подтверждения по биохимическим и культуральным признакам роста принадлежности выделенных колоний к колиформным бактериям.

Сущность метода заключается в способности бактерий группы кишечной палочки расщеплять глюкозу и лактозу. При этом в средах «ХБ», Хейфеца и КОДА образуются кислые продукты, меняющие цвет индикаторов, а в среде «Кесслер» в поплавке образуется газ вследствие расщепления глюкозы. Цель определения этой группы бактерий – проверка соблюдения режима при варке колбас.

При микробиологическом контроле колбасных изделий в производственных лабораториях можно ограничиваться обнаружением бактерий из группы кишечной палочки без их биохимической идентификации.

В пробирки, содержащие по 5 куб. см среды «ХБ», среды Хейфеца двойной концентрации или среды КОДА, вносят по 5 куб. см испытуемой взвеси стерильной пипеткой вместимостью 5-10 куб. см с широким концом.

Допускается применение среды Кесслер по 10 куб. см. Пробирки со средами «ХБ», Кесслер, Хейфеца и КОДА помещают в термостат с температурой 37°С на 18–20 часов.

При росте бактерий группы кишечной палочки среды «ХБ» и КОДА окрашиваются в желтый цвет, среда Хейфеца приобретает также желтый цвет, который может меняться до салатно-зеленого, на среде Кесслер в поплавке образуется газ.

Для окончательного заключения о присутствии в продукте бактерий группы кишечной палочки проводится высеив со среды Кесслер (заквашенные пробирки) или Хейфеца (изменившие цвета среды) в чашки Петри со средой Эндо или Плоскирева, или Левина. Чашки Петри помещают в термостат с температурой 37°С. Через 18-20 часов посеив просматривают. На среде Эндо бактерии группы кишечной палочки образуют темно-красные колонии с металлическим блеском или розово-красные без блеска, на среде Плоскирева – кирпично-красные с глянцевой поверхностью, на среде Левина – темно-фиолетовые колонии или фиолетово-черные блестящие. Из подозреваемых колоний готовят мазки, которые окрашивали по Граму. Специфическое изменение среды «ХБ» и КОДА не требует дальнейшего подтверждения.

При заведомо высокой обсемененности анализируемый продукт массой не более 0,25 г помещают в пустую пробирку, в которую закладывают комочек стерильной фильтрованной бумаги размером 5 ×5 см, и стерильной стеклянной палочкой или фламбированной проволокой подталкивают материал до дна (не уплотняя), в пробирку наливают среду «ХБ», КОДА или Хейфеца (нормальной концентрации), заполняя ее на 3/4 высоты пробирки. Пробирки помещают в термостат с температурой 37° С. на 8-10 часов. При росте бактерий группы кишечной палочки на среде Хейфеца среда изменяет свой цвет из красно-фиолетового в желтый, который затем может меняться до салатно-зеленого.

Обнаружение грамтрицательных палочек, специфически изменяющих цвет жидких дифференциально-диагностических сред и образующих характерные колонии на элективных средах с лактозой, указывает на наличие бактерий группы кишечной палочки.

Определение бактерий рода *Salmonella* в 25 г продукта. Основным нормативным документом является ГОСТ 30519-97 Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *salmonella*.

Сущность метода заключается в определении характерного роста сальмонелл на элективных средах и установлении биохимических и серологических.

Навеску продукта массой 25 г от объединенной пробы вносят во флакон Сокслета, содержащий 100 куб. см среды обогащения (Мюллера, Кауфмана, хлористомagneйевой среды М).

Жидкость во флаконе должна подняться до метки 125 куб. см. Флаконы тщательно встряхивают и помещают в термостат с температурой 37° С. Через 16-24 ч после тщательного перемешивания с помощью бактериологической петли (диаметр 0,4 – 0,5 мм) или пастеровской пипетки проводят посев из среды обогащения в чашки Петри с предварительно подсушенной средой Эндо, БФА, Плоскирева, Левина или висмут-сульфит-агар (по выбору). Чашки с посевами помещают в термостат с температурой 37° С; посеvy просматривают через 16-18 часов.

На среде Эндо бактерии из рода сальмонелл образуют бесцветные или с розовым оттенком колонии.

На среде БФА сальмонеллы образуют крупные, гладкие, красноватого оттенка прозрачные колонии (колонии сальмонеллы тифи суис, как и на среде Эндо – мелкие). Бактерии группы кишечной палочки образуют колонии желто-зеленоватого цвета. Бактерии группы протей дают рост через 72 часа.

На среде Плоскирева сальмонеллы растут в виде бесцветных колоний, но колонии более плотные и несколько меньшего размера, чем на среде Эндо.

На среде Левина сальмонеллы растут в виде прозрачных, бледных нежно-розовых или розовато-фиолетовых колоний.

На висмут сульфитном агаре сальмонеллы растут в виде черных или коричневых колоний с характерным металлическим блеском. При этом наблюдается прокрашивание в черный цвет участка среды под колонией. Исключение составляют некоторые серологические типы из группы С, которые на этой среде растут в виде нежных светло-зеленых или серовато-зеленых колоний.

Изолированные колонии, характерные для бактерий из рода сальмонелл, пересевают на трехсахарный агар Крумвиде-Олькеницкого в модификации Ковальчука штрихом по скошенной поверхности и уколом в столбик. Посевы помещают на 12-16 часов в термостат с температурой 37° С.

При росте бактерий из рода сальмонелл цвет скошенной поверхности среды Крумвиде-Олькеницкого в модификации Ковальчука – розовый, столбик – желто-бурый; газообразование устанавливают по наличию трещин и разрыву столбика агара, сероводородообразующие – вызывают потемнение столбика. Другие грамнегативные бактерии дают следующие изменения цвета среды:

Бактерии группы кишечной палочки – вся среда окрашивается в синий или сине-зеленый цвет с образованием газа или без него;

Бактерии из группы протей – среда окрашивается в ярко-красный цвет, может образоваться черный осадок;

Шигеллы и возбудители брюшного тифа – косяк окрашивается в розовый цвет, столбик – в синий, или сине-зеленый.

Допускается вместо среды Крумвиде-Олькеницкого в модификации Ковальчука посев на углеводные среды в короткий пестрый ряд, включая среды с глюкозой, лактозой, сахарозой, маннитом, и мальтозой, полужидкий агар уколом (для определения подвижности) и бульон Хоттингера для определения образования индола и сероводорода.

Для дальнейшей идентификации бактерий готовят мазки, которые окрашивают по Граму, микроскопируют и изучают серологические свойства микроорганизмов путем постановки пробной агглютинации на предметном стекле с агглютинирующей адсорбированной поливалентной сальмонеллезной О-сывороткой. При получении положительной реакции на стекле с поливалентной сывороткой проводят идентификацию с помощью монорецепторных агглютинирующих О- сывороток.

Установив серологическую группу, к которой относятся исследуемые бактерии, с помощью Н-сывороток определяют тип бактерий.

Обнаружение подвижных (кроме *S. pullorum* и *S. gallinarum*) грамотрицательных палочек, дающих характерный рост на элективных средах, неферментирующих лактозу и сахарозу, ферментирующих глюкозу и маннит с образованием кислоты и газа (*S. typhi* suis не ферментирует маннит), дающих положительную реакцию агглютинации с монорецепторными О- и Н-сальмонеллезными сыворотками, указывает на наличие бактерий из рода сальмонелл.

Определение бактерий группы протей. Нормативным документом для выделения протей является ГОСТ 28560-90 Продукты пищевые. Метод выявления бактерий родов *proteus*, *morganella*, *providencia*

Сущность метода заключается в определении морфологии и роста на питательных средах, способности гидролизировать мочевины и образовывать сероводород.

Для подтверждения наличия роста протей в Н-форме 0,5 куб.см анализируемой взвеси вносят в конденсационную воду свежескошенного мясопептонного агара, разлитого в широкие пробирки, не касаясь среды (метод Шукевича). Вертикально поставленные пробирки помещают в термостат с температурой 37° С. Через 18-24 ч посева просматривают.

Обращают внимание на образование ползучего вуалеобразного налета с голубым оттенком; на скошенном мясопептонном агаре культура поднимается из конденсационной жидкости вверх по поверхности среды. При появлении характерного роста микробов рода протей, микроскопируют окрашенные по Граму мазки и изучают подвижность микробов в раздавленной или висячей капле.

Для обнаружения нероящихся О-форм можно проводить посев на поверхность агара Плоскирева. О-форма протей растет на этой среде в виде прозрачных колоний, слегка подщелачивающих среду, окрашивая ее в желтый цвет. Делают пересев материала из подозрительных колоний в среду Крумвиде-Олькеницкого в модификации Ковальчука, где при наличии бактерий из группы протей среда окрашивается в ярко-красный цвет (вследствие расщепления мочевины) и может образовываться черный осадок с возможным разрывом агарового столбика (вследствие образования сероводорода).

Обнаружение полиморфных грамотрицательных палочек, образующих характерный рост на средах в Н-форме (подвижные) и О-форме (неподвижные), ферментирующих глюкозу и мочевины, неферментирующих лактозу и маннит, указывает на наличие бактерий из рода протей.

Определение коагулазоположительных стафилококков.

Нормативным документом является ГОСТ 9958-81 Изделия колбасные и продукты из мяса. Методы бактериологического анализа

Сущность метода заключается в определении морфологии, характера роста на питательных средах и в способности отдельных стафилококков ферментировать лецитиназу и коагулировать цитратную плазму крови кролика под воздействием фермента коагулазы.

Из разведения анализируемой взвеси продукта (1/10) проводят посеvy на молочно-солевой агар, содержащий 6,5% хлористого натрия, для выявления пигмента или желточно-солевой агар, содержащий 6,5% хлористого натрия, для выявления лецитиназной активности.

Взвесь наносят на поверхность агара в количестве 0,2 куб.см и равномерно растирают по всей поверхности агаровой среды. Посевы термостатируют в течение 24 ч при температуре 37°C и 24 ч выдерживают при комнатной температуре.

На поверхности питательной среды колонии стафилококка имеют вид плоских или слегка выпуклых блестящих колоний с ровным краем. При этом на молочно-солевом агаре лучше выявляется пигмент (эмалево-белый или золотистый), а на желточно-солевом агаре колонии стафилококков могут образовывать «радужный венчик», что является одним из признаков их

патогенности. Из подозрительных колоний готовят препараты, которые окрашивают по Граму.

При наличии стафилококков в препарате обнаруживаются грамположительные мелкие кокки, располагающиеся неправильными гроздьями.

Для подтверждения признаков патогенности стафилококков ставят реакцию плазмокоагуляции. В пробирку с 0,5 см³ цитратной плазмы крови кролика, разведенной физиологическим раствором в соотношении 1:5, вносят петлю чистой суточной культуры стафилококка и ставят в термостат при температуре 37°C. Реакцию плазмокоагуляции учитывают через 3-4 ч (не встряхивая пробирку) и оставляют в термостате на сутки для окончательного учета через 24 ч.

Для постановки реакции плазмокоагуляции можно использовать также сухую цитратную плазму крови кролика. Реакцию считают положительной, если плазма коагулируется в сгусток.

Для определения количества стафилококков учитывают колонии стафилококков, давшие положительную реакцию плазмокоагуляции. При расчете на 1 г продукта количество подсчитанных колоний умножают на степень разведения и делят на количество посевного материала.

Определение клостридий перфрингенс (сульфит-восстановителей).

Нормативным документом для выделения клостридий является ГОСТ 29185-91. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества сульфитредуцирующих клостридий.

Сущность метода заключается в специфическом росте клостридий перфрингенс в средах СЦС или Вильсон-Блера, на которых в результате восстановления сернистокислого натрия в серноокислый натрий происходит взаимодействие с хлористым железом и образуется почернение среды за счет сернистого железа.

Проведение анализа на среде Вильсон-Блера.

В пробирки, содержащие по 9 куб.см расплавленной и охлажденной до температуры 45° С среды Вильсон-Блера, вносят стерильной пипеткой по 1 куб.см десятикратных разведений (от 1:10 до 1:1000000) взвеси испытуемого продукта. Посевной материал и среду тщательно перемешивают. Посевы помещают в термостат с температурой 46° С на 8-12 ч. Появление в среде черных колоний или почернение всей среды указывает на присутствие сульфит-редуцирующих клостридий.

За положительный титр клостридий (сульфит-восстановителей) принимают то максимальное разведение суспензий, в посеве которого произошло почернение среды.

Определение *B. cereus*. Нормативным документом для определения *B. Cereus* является ГОСТ 10444.8-88 Продукты пищевые. Метод определения *Bacillus cereus*

Сущность метода заключается в выделении *B. cereus* из колоний, полученных при поверхностном посеве продукта на селективных средах и изучении их морфологических и биохимических свойств.

Подготовка проб проводится в соответствии с ГОСТ 26669, масса навески не менее $10 \pm 0,1$ г (см. куб) Исходное разведение продукта готовят с использованием пептонной воды или физиологического раствора. Из пробы готовят ряд разведений в соответствии с допустимым количеством *B. cereus*, указанным в нормативно-технической документации. Культуральную жидкость разводят так, чтобы получить при высеве отдельные колонии. Для

проведения испытания отбирают объем 0,1-0,2 см подготовленной пробы продукта, его разведения или разведения культуральной жидкости. Подготовленную пробу продукта, его разведения или разведения культуральной жидкости высевают поверхностным методом по ГОСТ 26670 параллельно в две чашки Петри с предварительно подсушенной селективной средой (селективный агар, желточный агар с хлористым натрием, полимиксин В или полимиксин М сульфатом и 2, 3, 5-трифенилтетразолиум хлоридом или желточный агар с маннитом, полимиксин В или полимиксин М сульфатом и феноловым красным). Посевы на чашках Петри термостатируют при (30 ± 1) °С в течение 24-48 ч. Через 24 ч посевы просматривают и выбирают чашки Петри, на которых выросло от 15 до 150 колоний, характерных для *B. cereus*. Через 48 ч уточняют число обнаруженных колоний. Корректировку подсчета количества *B. cereus* проводят после изучения морфологических и биохимических особенностей микроорганизмов из колоний, характерных для *B. cereus*.

Для подтверждения принадлежности подсчитанных колоний к колониям, образуемым *B. cereus*, микроорганизмы из пяти колоний пересевают на скошенный мясопептонный агар и термостатируют 18-24 ч при 30 ± 1 °С.

На скошенном мясопептонном агаре *B. cereus* образует сплошной налет белого цвета, иногда с мучнистой поверхностью.

Со скошенного мясопептонного агара готовят препараты, окрашивают по Граму по ГОСТ 30425, а также определяют подвижность клеток при микроскопировании методом висячей капли.

В мазках, приготовленных со скошенного агара, *B. cereus* имеет вид крупных грамположительных палочек размером 1,0-1,2х3,0-5,0 мкм со слегка

закругленными концами, лежащих в виде цепочек или штакетообразных скоплений, реже отдельно друг от друга. *V. cereus* образует субтерминальные или центральные споры. В висячей капле клетки подвижны, однако могут встречаться штаммы со слабо выраженной подвижностью.

Для доказательства анаэробной ферментации глюкозы культуры со скошенного агара высевают уколом в питательную среду с индикатором бромкрезоловым пурпуровым и глюкозой. Посевы инкубируют при температуре 30 ± 1 °С в течение 24 ч. *V. cereus* растет, окрашивая среду в желтый или желто-коричневый цвет по всей длине укола.

Для определения способности *V. cereus* ферментировать маннит культуры со скошенного агара пересевают на питательную среду с индикатором бромкрезоловым пурпуровым и маннитом. Посевы термостатируют при 30 ± 1 °С в течение 24 ч. При развитии *V. cereus* на среде с маннитом цвет среды не изменяется.

Для постановки реакции на образование ацетилметилкарбинола культуры со скошенного агара пересевают на пептонную среду с глюкозой с рН 7,0. Посевы термостатируют при 30 ± 1 °С в течение 24 ч.

В чистую пробирку отбирают 1 см³ культуры, добавляют 0,2 см³ раствора гидроокиси калия массовой концентрацией 400 г/дм и 0,6 см³ свежеприготовленного по ГОСТ 10444.1 раствора α -нафтола и несколько кристаллов креатина. Допускается реакцию на образование ацетилметилкарбинола проводить без применения креатина.

После добавления каждого раствора содержимое пробирки тщательно встряхивают, а затем оставляют на 1 ч при комнатной температуре.

V. cereus образует ацетилметилкарбинол, поэтому окраска среды меняется в розовый цвет. При отрицательной реакции культуральную жидкость термостатируют дополнительно 24 ч, после чего делают окончательное заключение.

Если при изучении культуральных, морфологических и биохимических свойств микроорганизмов, выделенных из колоний, обнаружены подвижные, грамположительные, нитратредуцирующие, спорообразующие палочки, способные образовывать ацетилметилкарбинол, ферментировать в анаэробных условиях глюкозу и не способные ферментировать маннит, то дают заключение о том, что обнаруженные микроорганизмы относятся к *V. cereus*.

Результаты испытаний пересчитывают на 1 г продукта и записывают в соответствии с требованиями ГОСТ 26670.

Выделение и определение *Listeria monocytogenes*. Основными нормативными документами для выделения листерий являются:

- МУК 4.2.1122-02 Организация контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах;

- ГОСТ Р 51921-2002 Продукты пищевые. Методы выявления и определения бактерий *Listeria monocytogenes*

Сущность метода заключается в высеве определенного количества продукта в жидкую селективную питательную среду (с предварительным обогащением), последующем пересеве на агаризованные селективно-диагностические среды, культивировании посевов при оптимальных условиях и определении принадлежности выявленных колоний к *Listeria monocytogenes* по биологическим свойствам.

Подготовка проб проводится в соответствии с ГОСТ 26669, масса навески не менее $25 \pm 0,1$ г (см. куб).

Навеску пищевого продукта вносят в 225 см.куб. одной из жидких сред для обогащения (ПБЛ 1, бульон Фразера полуконцентрированный). Содержимое встряхивают, посева культивируют при $T 30 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24 часов. После инкубирования делают посев бактериологической петлей из культуральной жидкости на поверхность одной из агаризованных селективно-диагностических сред (среда ПАЛ, Оксфордский агар, ПАЛКАМ –агар), штрихом, посева инкубируют при $T 37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24-48 часов. После инкубирования чашки с посевами просматривают и отмечают рост характерных колоний (на среде ПАЛ – мелкие серовато-желтые колонии с черным ореолом с диаметром от 1 до 2 мм; на ПАЛКАМ –агаре - мелкие серовато-зеленые или оливково-зеленые колонии с черным ореолом с диаметром от 1 до 1,5 мм, иногда с черным центром; на Оксфордском агаре – мелкие, сероватые, окруженные черным ореолом, диаметром 1 мм). Для определения принадлежности характерных колоний к роду *Listeria* отдельные колонии пересевают на МПА с 1% глюкозой или TSYEA, TSA, TSYEB, TSB, посева инкубируют при $T 37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24 часа и микроскопируют. Бактерии рода *Listeria* являются Гр+ короткими палочками, спор и капсул не образуют, являются каталазоположительными, не восстанавливают нитраты до нитритов (за исключением непатогенной *L.grayi*) Подвижность листерий зависит от температуры.

Обнаружение в посевах грамположительных коротких тонких палочек, каталазоположительных, не восстанавливающих нитраты до нитритов, подвижных при $22 \pm 1^\circ\text{C}$, не подвижные или слабо подвижные при $37 \pm 1^\circ\text{C}$, указывает на принадлежность выделенных микроорганизмов к бактериям рода *Listeria*.

Для подтверждения принадлежности выделенных культур к виду *Listeria monocytogenes* у выделенных культур определяют ферментативные

свойства, β -гемолитическую активность, лецитиназную активность и постановку реакции агглютинации на стеклес поливалентной сывороткой ил антительным латексным диагностикумом «Листерия – АГ-тест».

В образце констатируют присутствие *Listeria monocytogenes*, если из среды накопления выделены грамположительные короткие тонкие палочки, каталазоположительные, подвижных при $22\pm 1^\circ\text{C}$ не подвижные или слабо подвижные при $37\pm 1^\circ\text{C}$. Гидролизующие эскулин. Ферментирующие рамнозу и маннозу, не сбразивающие манит и ксилозу, обладающие лецитиназной активностью только в присутствии активированного угля и β -гемолитической активностью.

Результаты записывают так: *Listeria monocytogenes* обнаружены (не обнаружены) в 25 г продукта

Определение дрожжей и плесневых грибов. Основным нормативным документом является ГОСТ 10444.12-88 Продукты пищевые. Метод определения дрожжей и плесневых грибов.

Метод основан на высеве продукта или гомогената продукта или их разведений в питательные среды, определении принадлежности выделенных микроорганизмов к плесневым грибам и дрожжам по характерному росту на питательных средах и по морфологии клеток.

Подготовка проб проводится в соответствии с ГОСТ 26669-85, масса навески не менее $10,0\pm 0,1\text{г}$. Для приготовления исходных разведений используют физиологический раствор, для последующих десятикратных разведений – пептонно-солевой раствор.

Продукт и (или) его разведение высевают параллельно в две чашки Петри, Посевы заливают расплавленной и охлажденной до температуры $45\pm 1^\circ\text{C}$ средой Сабуро (средой из сухого сывороточного агара БФ, агаризированной средой с антибиотиками) или в две пробирки с 5 см куб. жидкого агаризированноо солодового сусла). Посевы термостатируют при температуре $24\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 5 суток, посевы на чашках Петри термостатируют вверх дном.

Через 3 суток проводят предварительный учет типичных колоний, через 5 суток – окончательный учет.

Рост дрожжей на агаризированных средах сопровождается образованием крупных, выпуклых, блестящих, серовато-белых колоний с гладкой поверхностью и ровным краем. Развитие дрожжей в жидкой среде сопровождается появлением мути, запаха брожения и газа.

Развитие плесневых грибов сопровождается появлением мицелия различной окраски.

Для количественного подсчета отбирают чашки на которых выросло от 15 до 150 колоний дрожжей и (или) от 5 до 50 колоний плесневых грибов.

Результаты учитывают отдельно для дрожжей и плесневых грибов.

Требования к упаковыванию и маркировке колбасных изделий

Для предотвращения деформации колбасных батонов, сохранения качества продукции, снижения отрицательного воздействия внешних факторов колбасные изделия подвергают упаковке.

Очевидно, что упаковка должна обладать механической прочностью, быть герметичной, иметь хорошие барьерные характеристики по отношению к газам (в особенности к таким, как кислород и двуокись углерода (углекислый газ), ароматам, влаге, обладать устойчивостью к агрессивным средам в широком диапазоне рН, жиростойкостью и не должна влиять на вкус и запах упакованного продукта.

Наиболее часто в качестве упаковочных материалов для колбасной и деликатесной продукции используют многослойные полимерные пленки с высокими прочностными характеристиками.

Колбасные изделия перед упаковыванием должны быть хорошо охлаждены и иметь T в толще батона- не ниже 0 и не выше 6°C.

Время с момента окончания технологического процесса изготовления, до начала процесса упаковывания при условиях и параметрах хранения продукции, установленных нормативными документами, не должно превышать: для вареных, ливерных и кровяных колбас, сосисок, сарделек, шпикачек и зельцев - 3 часа; для полукопченых, варено-копченых и полусухих колбас - 2 суток; для сырокопченых и сыровяленых колбас - 7 суток.

Не допускается упаковывать колбасные изделия с нехарактерным изменением цвета, наличием серых пятен, а также изделия, хранившиеся при минусовой температуре.

Вареные, полукопченые, варено-копченые, сырокопченые и сыровяленые колбасы могут быть упакованы целыми изделиями (батонами), нарезанными ломтиками (сервировочная нарезка) или куском (порционная нарезка). Ливерные и кровяные колбасы упаковывают целыми батонами, зельцы - целыми батонами или куском (порционно). Сосиски, сардельки и шпикачки упаковывают порционно. Порционную и сервировочную нарезку осуществляют на резательных машинах, толщина ломтика колбасных изделий при сервировочной нарезке не должна превышать 3 мм, толщина (длина) порции при порционной нарезке должна составлять 30-125 мм в зависимости от вида продукции.

Поверхность среза колбасных изделий должна быть ровной, без вмятин, изломов «бахромы».

Хранение колбасных изделий должно осуществляться в установленном порядке при соответствующих параметрах температуры, влажности и светового режима для каждого вида продукции.

Для хранения и транспортирования колбасные изделия упаковываются в чистые металлические, пластмассовые и деревянные ящики, а также контейнеры. Тара должна быть сухой, чистой, без плесени и постороннего запаха, с крышкой.

При перевозке полукопченой, варено-копченой колбас на дальние расстояния в целях предохранения от усушки, загрязнения и порчи их покрывают защитными покрытиями или заливают жиром (колбаса в жире не портится и не плесневеет).

Требования к транспортировке колбасных изделий

Условия транспортировки должны соответствовать установленным требованиям на каждый вид колбасных изделий, а также правилам перевозок скоропортящихся грузов, действующим на соответствующем виде транспорта.

Транспортирование колбасных изделий осуществляется специально оборудованными транспортными средствами.

Скоропортящиеся продукты перевозят охлаждаемым или изотермическим транспортом, обеспечивающим необходимые температурные режимы транспортировки.

Не допускается перевозить готовые колбасные изделия вместе с сырьем и полуфабрикатами. При транспортировке пищевых продуктов должны соблюдаться правила товарного соседства.

Не допускается перевозить колбасные изделия случайными транспортными средствами, а также совместно с непродовольственными товарами.

Сроки годности и условия хранения колбасных изделий

Гигиенические требования к срокам годности и условиям хранения пищевых продуктов устанавливаются в целях обеспечения безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов в процессе производства, хранения, транспортировки и оборота, а также при их разработке и постановке на производство.

В определенном законодательством Российской Федерации порядке на пищевые продукты, качество которых по истечении определенного срока с момента их изготовления ухудшается и ими приобретаются свойства,

опасные для здоровья человека, в связи с чем утрачиваются пригодность для использования по назначению, устанавливаются сроки годности.

Продукты, требующие для обеспечения безопасности специальных температурных или иных режимов и правил, без обеспечения которых они могут привести к вреду для здоровья человека, следует считать скоропортящимися и особо скоропортящимися продуктами, которые подлежат хранению в условиях холода и предназначены для краткосрочной реализации.

Пищевые продукты при их изготовлении и обороте (производстве, хранении, транспортировке и обороте) должны храниться при условиях, обеспечивающих сохранение их качества и безопасности в течение всего срока годности.

Установленные сроки годности и условия хранения особо скоропортящихся и скоропортящихся пищевых продуктов, вырабатываемых по нормативной и/или технической документации, указаны в приложении №1 к СанПиН 2.3.2.1324-03, если иные сроки годности не оговорены другими документами.

Сроки годности пищевых продуктов, вырабатываемых по нормативной документации, должны быть обоснованы на основании результатов широких производственных испытаний отраслевыми научно-исследовательскими организациями, аккредитованными в установленном порядке, с участием учреждений, уполномоченных федеральным органом исполнительной власти в области санитарно-эпидемиологического благополучия.

Срок годности пищевого продукта определяется периодом времени, исчисляемым со дня его изготовления, в течение которого пищевой продукт пригоден к использованию, либо даты, до наступления которой пищевой продукт пригоден к использованию.

Период времени (дата) в течение которого (до наступления которой) пищевой продукт пригоден к использованию, следует определять с момента окончания технологического процесса его изготовления, и включает в себя хранение на складе организации-изготовителя, транспортирование, хранение в организациях продовольственной торговли и у потребителя после закупки. Информация, наносимая на этикетку о сроках годности пищевых продуктов, должна предусматривать указание; часа, дня, месяца, года выработки для особо скоропортящихся продуктов, продуктов для детского и диетического питания; дня, месяца и года - для скоропортящихся продуктов; месяце, года - для нескоропортящихся продуктов, а также правил и условий их хранения, и употребления.

Сроки годности скоропортящихся пищевых продуктов распространяются на продукты в тех видах потребительской и транспортной тары и упаковки, которые указаны в нормативной и технической документации на эти виды продуктов, и не распространяются на продукцию во вскрытой в процессе их реализации таре и упаковке или при нарушении ее целостности (таблица 59).

Не допускается переупаковка или перефасовка скоропортящихся пищевых продуктов после вскрытия и нарушения целостности первичной упаковки или тары организации-изготовителя в организациях, реализующих пищевые продукты, с целью установления этими организациями новых сроков годности на продукт и проведения работы по обоснованию их длительности в новой упаковке или таре.

Скоропортящиеся пищевые продукты после вскрытия упаковки в процессе реализации следует реализовать в срок не более 12 часов с момента ее вскрытия при соблюдении условий хранения (температура, влажность).

Таблица 59 - Гигиенические требования к срокам годности и условиям хранения пищевых продуктов СанПиН 2.3.2.1324-03

| Колбасные изделия из мяса всех видов убойных животных, птицы | | |
|---|--------------|-------------------------|
| 28. Колбасы вареные, вырабатываемые по ГОСТ: - высшего и первого сорта - второго сорта | 72 48 | часа часов |
| 29. Колбасы вареные по ГОСТ в парагазонепроницаемых оболочках: - высшего сорта, деликатесные, с добавлением консервантов - первого сорта - второго сорта | 10 8 7 | суток суток суток |
| 30. Сосиски, сардельки вареные, хлеба мясные, вырабатываемые по ГОСТ | 72 | часов |
| 31. Сосиски, сардельки вареные в парагазонепроницаемых оболочках | 7 | суток |
| 32. Колбасы, сосиски, сардельки вареные, нарезанные и упакованные под вакуумом, в условиях модифицированной атмосферы | 5 | суток |
| 33. Продукты мясные вареные (окорока, рулеты, свинина и говядина прессованные, ветчина, бекон, мясо свиных голов прессованное, баранина в форме) | 72 | часа |
| 34. Продукты мясные вареные, нарезанные и упакованные под вакуумом, в условиях модифицированной атмосферы | 5 | суток |
| 35. Колбасы ливерные, кровяные | 48 | часов |
| 36. Колбасы, сосиски, сардельки вареные с добавлением субпродуктов | 48 | часов |

| | | |
|--|----|-------|
| 37. Колбасные изделия вареные из мяса птицы (колбасы, мясные хлеба, рулеты, сосиски, сардельки, ветчина и др.) | | |
| - высшего сорта | 72 | часа |
| - первого сорта | 48 | часов |
| 38. Колбасные изделия вареные из мяса птицы, упакованные под вакуумом, в условиях модифицированной атмосферы | 5 | суток |

Памятка мастеру колбасного производства

Мастер, помни! Только от твоего личного умения организовать производство, строго соблюдать технологическую и санитарную дисциплину, мобилизовать коллектив на выполнение планов и заданий, зависит выпуск продукции высокого качества, рациональное и экономное использование сырьевых ресурсов.

Мастер должен детально знать технологический процесс вверенного участка и регулярно осуществлять пооперационный контроль.

Температурно- влажностные режимы производственных помещений

ВНИМАНИЕ! Нарушение температуры и влажности воздуха - одна из основных предпосылок выпуска некачественной продукции (таблица 3).

Таблица 3 – Этапы контроля в колбасном производстве

| Этапы контроля | Режимы | |
|--|-------------------------|----------------------------|
| | температура воздуха, °С | относительная влажность, % |
| 1.Накопитель мяса | 4 | 90 |
| 2. Камера размораживания мяса | 20+2 | 85-95 |
| 3. Сырьевой цех (отделение обвалки и жиловки мяса) | 12 | 70 |
| 4. Отделение посола (созревания) мяса для колбас | 2-4 | 85 |
| 5. Цех (отделение) приготовления фарша | 12 | 70 |
| 6. Шприцовочный цех (отделение) | 12 | 70 |
| 7. Камера охлаждения вар. изделий | 4 | 95 |
| | -10 | - |

| | | |
|---|----|----|
| 8. Туннель для охлаждения колб. изделий | 8 | 85 |
| 9. Камера хранения вар. колб. изделий | 12 | 75 |
| 10. Экспедиция | | |

Температура сырья и готовой продукции

НЕ ЗАБУДЬ! Повышение температуры против нормативной - прямой путь выпуску продукции пониженного качества (таблица 61).

Таблица 61 – Этапы контрольного температурного контроля сырья и готовой продукции

| Этапы контроля | Температура (°С) в толще мяса для продукта |
|---|---|
| <u>Сырье:</u> | |
| мясо парное | не ниже 35 |
| мясо охлажденное, | от 0 до 4 |
| мясо размороженное в тушах, п/тушах, четвертинах | не ниже 4 |
| в блоках | не выше 1 и не ниже -1 |
| мясо жилованное (поступающее на посол) | не выше 12 (при созревании в емкостях до 150) |
| мясо жилованное замороженное в блоках | -5 - 8 перед измельчением -3 - 6 после измельчения |
| мясо созревшее после посола | не выше 4 |
| <u>Фарш:</u> | |
| после измельчения (куттерования и т.п.) | 12 - 15 для фарша из размороженного жилованного блока |
| или перемешивания | 16 - 18 |
| <u>Колбасные изделия:</u> | |
| после обжарки | 40 - 50 |
| после варки (запекания) | 70 - 85 |
| после запекания из условно годного сырья после охлаждения | не ниже 0 и не выше 15 |

Технология изготовления колбасных изделий

Знай! Строгое соблюдение технологических и санитарных режимов производства является гарантией выпуска высококачественной продукции (таблица 62).

Таблица 62 – Контроль технологического и санитарного режима производства

| Основные процессы | Важнейшие требования, параметры и этапы контроля |
|--|---|
| 1. Санитарная обработка сырья, инвентаря и оборудования | <p>Сырье в тушах, п/тушах и четвертинах обрабатывать водопроводной водой в установках с применением форсуночно-щеточных устройств; ножи, мусаты, и др. инструменты - в стерилизаторах; спуски, ковши, тару - форсуночно-щеточными устройствами.</p> |
| 2. Вспомогательные материалы | <p>Не реже 1 раза в 15 дней проводить бактериологический контроль смывов с технологического оборудования и инвентаря.</p> <p>Входной контроль качества каждой партии пряностей, оболочки, соевых белков, аскорбината натрия, фосфатов, казеинатов, сухого молока и др. осуществлять постоянно и результаты доводить до сведения мастеров технологов и начальников соответствующих служб и участков.</p> |
| <p>3. Замораживание сырья</p> <p>НЕ ЗАБУДЬ! Нарушение режимов размораживания сырья приводит к потерям мясного сока, ухудшению товарного вида и качества мяса, снижению его влагоемкости, а, следовательно, консистенции продукции</p> | <p>Условия их хранения должны соответствовать требованиям НТД</p> <p>Мороженое сырье в тушах, п/тушах, четвертинах размораживать способом воздушного душирования при температуре воздуха +20-2 °С и скорости движения воздуха у бедер от 0,2 до 1 м в сек.</p> <p>Продолжительность размораживания при скорости движения воздуха движения в 0,2- 0,5 м/сек составляет для:</p> <p>говяжьих п/туш массой до 110 кг - не более 30 час; свиных п/туш массой до 45 кг - не более 24 часов; бараньих туш массой до 30 кг - не более 15 часов.</p> <p>Продолжительность размораживания при скорости движения воздуха 0,5 - 1 м/сек составляет для:</p> <p>говяжьих п/туш массой до 110 кг - не более 24 час; свиных п/туш массой до 45 кг</p> |

4. Обвалка мяса
ВНИМАНИЕ!

Превышение остатка мякотных тканей на кости на 1% приводит к потерям мяса в расчете на 1 тонну в среднем на 14 кг

5. Жировка
ПОМНИ! Грубая соединительная ткань не поддается полной разработке, снижает товарный вид и вкусовые достоинства колбас.

6. Измельчение мясного сырья на волчках, скорорезках, шпигорезках
ОСОБЕННО ВАЖНО! Своевременная и правильная заточка и смена режущего инструмента – это решающий фактор выпуска колбасных изделий хорошего качества

7. Посол сырья
ЗНАЙ! Точное дозирование посолочных ингредиентов и нитрита натрия обеспечивает

– не более 18 часов; бараньих туш массой до 30 кг - не более 10 часов. Размораживание мяса считается законченным, когда температура в толще бедра к лопатки костей достигнет +1 °С Мясо жилованное, замороженное в блоках, импортного производства или жилованное отечественного производства с нарушенной упаковкой размораживать при скорости движения воздуха не более 0,6 м /сек до достижения температуры в толще (центре) блока +1°С. Остаточное содержание мякотной ткани в среднем по каждому комплекту с одной п/туши не должно превышать 8,5%

Контрольную проверку качества обвалки (содержание мякотных тканей на кости) осуществляют 2-3 раза в смену от каждой бригады.

Контроль визуальный постоянно. Удаление остатков грубых сухожилий, хрящей, кровесгустков и загрязнений обязательно.

Мясо жилованное разбирать строго по сортам:
говядину (конину) - на высший, I и II сорта;
свинину - на нежирную, п/жирную, жирную; баранину - на один сорт

Контроль визуальный постоянно. Мясо в зависимости от назначения измельчают на волчках с Д отверстий решетки: 2-6 мм, 8-12 мм, 16-25 мм. Шпик охлаждают до температуры 0-4 °С. Шпик и грудинку измельчают в соответствии с требованиями технологической инструкции. Посол мяса производят концентрированным рассолом или солью.

Сырье и соль дозируют по весу, раствор нитрита и рассол - объемно.

высокие вкусовые достоинства и хороший цвет.

Количество воды, добавляемой с рассолом, учитывают при составлении фарша, нитрит натрия используют в количестве 7,5 кг на 100 кг мясного сырья (в виде раствора концентрацией не выше 2,5 %). Нитрит натрия можно вводить при составлении фарша.

Количество добавляемых соли или рассола на 100кг мясного сырья:

| Наим. вар.колб.изд. | Норма добавления, кг | | | |
|---|----------------------|---------|------|------|
| | соли | рассола | соли | воды |
| Диетическая | 2,4 | 9,8 | 2,4 | 6,8 |
| Докторская с сорбитом | 2,1 | 8,1 | 2,1 | 6,0 |
| осиски любит. молочн.сливоч русские, шпикачки | 2,2 | 8,5 | 2,2 | 6,3 |
| остальные колбасы, сардельки | 2,5 | 9,6 | 2,5 | 7,1 |

Длительность перемешивания сырья с солью (рассолом) составляет для: мелкоизмельченного мяса 4 - 5 мин., мяса в кусках или шрота 3 - 4 мин.

Для снижения температуры: сырья при посоле сухой солью рекомендуется использование пищевого льда в количестве 5-10% к массе сырья с последующим учетом при добавлении влаги в процессе составления фарша.

Мелкоизмельченное мясо (2-6мм) посоленное концентрированным рассолом выдерживают на созревании 6-24 часов, сухой солью -12-24 час; крупноизмельченное мясо (16-25мм) - в течение 24-48 час.

В начале куттерования нежирное говяжье и свиное мясо с добавлением части холодной воды (льда), пряностей, раствора нитрита натрия (если не добавили при посоле), казеината натрия, соевого белка, сухого молока, меланжа и др., затем вводят остальную воду (лед), полужирную, жирную свинину или жирную говядину, препарат гемоглобина или кровь,

8. Составление рецептуры и приготовление фарша.
ОСНОВНОЙ ЗАКОН КОЛБАСНОГО ПРОИЗВОДСТВА:
строгое соблюдение рецептур и очередности закладки компонентов.

сливочное масло, маргарин или костный жир, аскорбинат натрия или аскорбиновую кислоту, крахмал или пшеничную муку.

Количество добавляемой воды (льда) к массе кутгеруемого мясного сырья, %:

Колбасы - говяжья, докторская, любительская, любительская, свиная, русская, столичная, телячья, обыкновенная с сорбитом; сосиски сливочные; сардельки- шпикачки -20-25; диабетическая - 15% молока + 10 - 15% воды.

Колбасы - краснодарская, эстонская, диетическая, отдельная баранья, свиная, сардельки свиные - 25 - 30.

Колбасы - молочная, отдельная столовая, чайная, сосиски молочные - 30 - 35 .

Колбасы - московская; Сосиски - любительские, говяжьи, русские, особые, сардельки - говяжьи - 35 – 40.

Для повышения вкусовых достоинств колбасы используют свежий чеснок; помол специй производят непосредственно перед изготовлением фарша. Хранение специй осуществляют в герметичной упаковке.

Для обеспечения реологических свойств (эластичности, вязкости, липкости) следует поменять воду, сыворотку крови, обрат в виде чешуйчатого льда; в случае использования жидкого обрата и сыворотки их необходимо охладить до температуры 4-8°C.

9. Шприцевание

(формование) колбасных изделий в оболочку.

Соблюдай элементарные правила: плотность набивки фарша; равномерное размещение батонов на рамках; чистоту рам и палок. **ВНИМАНИЕ!** Правильное ведение термической обработки колб, изделий исключает технологический брак (переваривание, недovar и др.), а также выпуск колбас с неудовлетворительным

Наполнять фаршем оболочки следует плотно, допуская попадание воздуха в батон. Вязку батонов и нанесение товарных отметок шпагатом вести строго по установленному образцу. Глубина в вакууме при использовании вакуумных шприцов - $0,8 \times 10^3$ Па; удалять воздух.

При навешивании на рамы батоны не должны соприкасаться друг с другом.

Продолжительность от шприцевания до термической обработки - не более 2-х часов при температуре **0-4°C**.

товарным видом.

Нарушение технологии охлаждения колбас может свести на нет все ваши усилия по изготовлению продукции **высокого** качества!

Обжарку производят в первые 15 мин, при температуре не выше 7 °С, далее **при** температуре **98-100°С**; общая продолжительность обжарки **60-140** мин. в зависимости от конструкции камеры и диаметра оболочки.

Общая продолжительность обработки сырья в измельчителях периодического действия (куттера, куттер-мешалка и др.) должна составлять 8-12 мин., в зависимости от конструкции оборудования - чем выше скорость резания, тем меньше продолжительность обработки.

Составление фарша из мороженных блоков осуществляют в строгом соответствии с действующей технологией. При этом температура в толще мяса мороженных блоков перед их измельчением должна быть (-5) и (-8 °С). При поступлении блоков с температурой ниже (-8 °С) их необходимо отеплить. Прогрев осуществляется на различных стадиях технологического цикла до достижения температуры фарша перед набивкой его в оболочку 16- 18⁰С.

Для улучшения цвета вареных колбас при машинной обработке сырья следует добавлять аскорбиновую кислоту, изоаскорбинат, аскорбинат натрия или препарат гемоглобина.

Обжарка изделий в целлофановых оболочках: диаметр 80- 90 мм - 80- 95 минут; диаметр 100- 120 мм - 120 -140 минут.

В белковых оболочках: диаметр 75 мм - 75- 80 минут; 85 мм - 100- 110минут; 100 мм - 110-125 минут.

В конце обжарки температура в центре батона 40 - 50°С, поверхность оболочки сухая и покрасневшая.

ВАРКУ колбасных изделий осуществлять насыщенным паром с температурой окружающей среды 75 - 85°С (для белкозина 73-76°С). Продолжительность процесса в черевах -

| | |
|--|--|
| <p>10. Контроль качества выработываемых колбасных изделий, подготовка к реализации, упаковка</p> <p>ПОМНИ! Это последняя возможность преградить выпуск в реализацию продукции низкого качества.</p> | <p>40 - 60 минут, синюгах, кругах, проходниках, пузырях - 90- 180 минут; в целлофане: диаметр 80- 90мм - 65 - 75 минут; 100 - 120 мм - 110 -150 минут; в белкозине: диаметр 75 мм - 80 - 85 минут; 85 мм-100-110 минут; 100 мм-120- 150 минут. В конце варки температура в центре батона 70 ± 1 °С в толще мяса -4°С Готовые вареные колбасные изделия направляют на охлаждение. Наиболее эффективным являются гидроаэрозольный и быстрый методы охлаждения колбас.</p> <p>Каждую партию колбасных изделий после окончания технологического процесса проверять органолептически, отбраковывать продукцию с технологическими дефектами и предъявлять ОПВК для оценки качества. Проверять продукцию упаковывать в тару, отвечающую санитарным нормам и обеспечивающую сохранность качества продукции при хранении и транспортировке.</p> |
|--|--|

Тема 7. МИКРОБИОЛОГИЯ МОЛОКА И МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Первые научные исследования молочнокислых бактерий были проведены Л. Пастером, результаты он опубликовал в 1857 г. С тех пор молочнокислые бактерии привлекают к себе внимание специалистов. На основе использования этих микроорганизмов создаются и развиваются крупные отрасли пищевой промышленности.

В начале 90 – х годов вышел новый Международный стандарт по номенклатуре молочнокислых бактерий. Однако, учитывая, что за последние 10 лет в стране практически не выходила справочная литература по микробиологии молока в предлагаемом лекционном курсе сохранены названия микроорганизмов применяемых в нашей стране до 90-х годов, что позволит студентам пользоваться сопоставимыми названиями бактерий в основной литературе по данному вопросу. Ниже приводится переводная таблица 2 названий основных молочнокислых бактерий в соответствии с Международным стандартом по номенклатуре.

Таблица 2. Номенклатура молочнокислых бактерий

| № | Устаревшие названия | Названия | |
|---|---|--|----------------------------------|
| | | по международному стандарту | принятые в учебнике |
| 1 | <i>Streptococcus lactis</i> | <i>Lactococcus lactis</i> subspecies <i>lactis</i> | <i>Lactococcus lactis</i> |
| 2 | <i>Streptococcus cremoris</i> | <i>Lactococcus lactis</i> subspecies <i>cremoris</i> | <i>Lactococcus cremoris</i> |
| 3 | <i>Streptococcus diacetylactis</i> , <i>Streptococcus acetoinicus</i> | <i>Lactococcus lactis</i> subspecies <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> | <i>Lactococcus diacetylactis</i> |
| 4 | <i>Streptococcus citrovorus</i> | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subspecies <i>cremoris</i> | <i>Leuconostoc cremoris</i> |
| 5 | <i>Streptococcus paracitrovorus</i> | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subspecies <i>dextranum</i> | <i>Leuconostoc dextranum</i> |
| 6 | <i>Lbm. bulgaricum</i> | <i>Lbm. delbrueckii</i> subspecies <i>bulgaricum</i> | <i>L. bulgaricum</i> |
| 7 | <i>Lbm. lactis</i> | <i>Lbm. delbrueckii</i> subspecies <i>lactis</i> | <i>L. lactis</i> |
| 8 | <i>Lbm. casei</i> | <i>Lbm. rhamnosus</i> | <i>L. rhamnosus</i> |

Тема 7.1. МИКРОФЛОРА ПИТЬЕВОГО МОЛОКА

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 непостоянно и в единичном количестве клеток. В выводных протоках и молочной цистерне количество бактерий может достигать нескольких десятков или сотен клеток в 1 см. Это микроорганизмы – комменсалы вымени. К ним относятся энтерококки, микрококки, иногда маститные 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 больше содержится в вымени микробов, 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 маститные 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 сдаивать 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 и дезинфекции перед доением концентрация микробов на коже вымени была не выше 10^3 микробов на 1 см^2 .

Подстилочные материалы из соломы и сена являются существенным источником загрязнения кожного покрова животного, а затем и молока кишечными палочками, маслянокислыми бактериями, энтерококками, гнилостными спорообразующими 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 $0,1 \text{ г}$ которого содержится от 10 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 ручном доении. Однако при смене молокопроводов всегда подсасывается наружный воздух.

Общее количество микроорганизмов в воздухе составляет 300–1500 клеток в 1 м^3 .

Содержание микробов в воздухе в течение одного дня сильно меняется. Во время операций 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 психротрофными бактериями, преимущественно псевдомонадами. Психрофильные микробы 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.

Изменение микрофлоры молока при хранении

Общий ход молочнокислого процесса в молоке. В зависимости от формы клеток молочнокислые бактерии делят на две группы: молочнокислые стрептококки и молочнокислые палочки. Эти микроорганизмы имеют также и неодинаковые физиологические признаки. По отношению к температуре различают мезофильные и термофильные молочнокислые бактерии; по характеру сбраживания молочного сахара – гомоферментативные (образуют почти одну молочную кислоту) и гетероферментативные (наряду с молочной кислотой образуют значительное количество побочных продуктов). После внесения небольшого количества молочнокислых стрептококков (петлей) в молоко при оптимальной температуре их развития (30° С) начинают размножаться бактерии. Если культура находится в состоянии полной активности (молодая), уже в самом начале процесса наблюдается максимальная скорость ее размножения. Если культура менее активная

(старая), потребуется некоторое время, прежде чем бактерии начнут размножаться с максимальной скоростью.

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, спинно-мозговой жидкости, молоке и особенно в молозиве и околоплодной жидкости.

В молоке коров находятся 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 патогенных стафилококков, маститного стрептококка, сальмонелл, кишечных палочек, возбудителя сибирской язвы и других, особенно грамположительных, микроорганизмов. Отсутствие лизоцима М в свежесвыдоенном! молоке свидетельствует о заболевании молочной железы; 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. Антител являются термолабильными, 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. 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 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 различна. 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, которые оно имеет к концу бактериальной фазы, до сотен миллионов. В остальных фазах развития концентрация микробов может увеличиться до 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 повышения кислотности будут задерживать развитие многих групп микроорганизмов, чем и определяется граница между фазой смешанной микрофлоры и следующей.

Качественный состав микрофлоры в фазе 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), термофлора (флора высоких температур). Криофлора 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 палочек *Bac. megatherium*, *Bac. subtilis* и других гнилостных микроорганизмов, т. е. процессы идут в направлении гнилостного разложения белков и отчасти разложения жира.

Мезофлора 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.

Термофлора развивается при температуре 40–45 °С. Такие условия наблюдаются в сыроделии 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 бактерий группы кишечных палочек, дольше всех выдерживающие нарастание кислотности среди немолчнокислых 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 Бактерии 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. Молчнокислые 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 молчнокислых палочек. Продолжительность молчнокислой 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, кисломолочного 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 сгустка (если он не подвергается перемешиванию) образуются отдельные островки молочной плесени (*Oidium lactis*), постепенно смыкающиеся в сплошную белую пушистую пленку. В это же время появляются дрожжи рода *Mycoderma*, участвующие в образовании пленки. Позже появляются плесени родов *Fenicillium* 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 светло-желтого или темно-бурого цвета. Слой быстро увеличивается за счет исчезающего сгустка, 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.

Интересно отметить, что плесени, развиваясь во время продолжения молочнокислой фазы, разлагают белки и подщелачивают субстрат, что на время активизирует развитие отмирающих молочнокислых бактерий. Поэтому правильнее 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.

Влияние пастеризации на микрофлору молока и сливок

При выборе и уточнении режимов пастеризации молока, проводившемся на протяжении последних десятилетий за рубежом и в нашей стране, исходили из необходимости обеспечения стойкости молока, с обязательным учетом сохранения его питательной ценности

Обеспечение гигиенической надежности пастеризации. На основании экспериментальных данных для молока, полученного от здорового стада, был выбран режим при 72° С с выдержкой 15 с (Гигиена молока, ВОЗ, 1963, П. Кэстли, 1957). Разрушение фосфатазы происходит при несколько более жестких режимах тепловой обработки, чем гибель патогенных бактерий. Поэтому в мировой практике принято определять гигиеническую надежность пастеризации по отсутствию в молоке щелочной фосфатазы. Этот принцип принят и в нашей стране. Для инактивации фосфатазы в сливках жирностью 20 и 40% требуется температура только на 1°С выше, чем для инактивации фосфатазы в цельном молоке, при той же продолжительности пастеризации (Г. П. Сандерс и Д. С. Загер, 1948). В. М. Богданов, В. Г. Геймберг и др. (1961) показали, что при режиме пастеризации 72° С с выдержкой 19–20 с в молоке остается значительно большая часть микрофлоры сырого молока, чем это установлено классическими исследованиями (эффективность пастеризации 99,99%). Поэтому они рекомендовали повышать температуру пастеризации; с учетом указанной рекомендации при производстве пастеризованного молока установлен режим 74–76° С с выдержкой 15–20 с. Необходимо отметить, что это ужесточение режима пастеризации связано не с повышением гигиенической надежности молока, а с улучшением его микробиологических показателей по общей бактериальной контаминации.

Однако в последнее время некоторыми гигиенистами в нашей стране высказываются опасения в отношении надежности не только режимов пастеризации, рекомендованных Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ), но и установленных на основании вышеприведенной работы, особенно в отношении дизентерийных микробов, выживаемость которых не исследовалась в работах Кэстли и других авторов.

Работа, проведенная ВНИМИ, ВНИИВС и ВНИИДиС (В.Г.Заруцкая и др.) показала, что дизентерийный микроб типа Зонне полностью погибает при режиме 76° С с выдержкой 20 с при внесении его в сырое молоко в количестве 20 млн./мл. Для молока с такой высокой обсемененностью дизентерийными микробами авторы считают целесообразным установить гарантийный режим 78±2° С. По-видимому, этот режим можно рекомендовать

для обработки молока в эпидемиологически опасных зонах, для промышленности же должны быть сохранены режимы предусмотренные действующей технологической инструкцией. Решающее значение в получении гигиенически доброкачественного молока имеет правильная эксплуатация пастеризационно-охладительных установок. Если после секции пастеризации на них установлен автоматический возвратный клапан, работают термозаписывающие устройства, ведется запись начала, конца работы и даются объяснения о снижении температуры в процессе пастеризации, надежность ее можно считать гарантированной.

Снижение бактериальной обсемененности и повышение стойкости молока. Эффективность снижения общей бактериальной обсемененности зависит прежде всего от состава микрофлоры сырого молока, который в свою очередь определяется условиями его получения, первичной обработки и транспортировки.

Если молоко получают в условиях строгого соблюдения санитарно-гигиенических требований, быстро охлаждают и хранят при низких температурах, то в первый день в нем содержится около 10% психротрофных бактерий, на второй – 25%. Преобладающими типами психротрофных бактерий являются *Pseudomonas* и *Achromobacter*. Количество термостойких бактерий в таком молоке не превышает 50 тыс./мл, причем термостойкие молочнокислые бактерии составляют не более 1–5% (И. фон Боккельман, 1970а,б). Психротроф-ные бактерии полностью погибают при пастеризации (Э. М. Фостер и др., 1961). Значительно снижается и общее количество бактерий, в результате чего эффективность пастеризации достигает 99,99%. Если же молоко получают в плохих санитарно-гигиенических условиях и хранят при температуре выше 7° С, в нем содержится значительное количество термостойких бактерий (Э. М. Фостер 1961). В сыром молоке, подвергавшемся длительному (до 2–3 дней) хранению при 10° С, количество термостойких бактерий достигало сотен тысяч – миллионов в 1 мл (Н. С. Королева, В. Ф. Семенихина и др., 1971). Содержание их в сыром молоке было сравнительно постоянным и составляло от 0,5 до 50% общей микрофлоры. Широкие колебания в содержании термостойких бактерий по отношению к общему количеству бактерий в сыром молоке свидетельствуют об отсутствии корреляции между этими двумя показателями: общее количество бактерий колеблется в большей мере, чем количество термостойких бактерий. Общее количество бактерий в сыром молоке составляло в среднем $1,5 \cdot 10^7$ в 1 мл. При посеве молока сразу после пастеризации обнаруживалось в среднем $1,4 \cdot 10^4$ – $1,1 \cdot 10^5$ бактерий в 1 мл. Эффективность пастеризации такого молока при режиме 75–76° С с выдержкой 15–20 с составляла 99,49%–

98,9%. Абсолютное количество бактерий, выдержавших пастеризацию, и процент оставшихся клеток по отношению к содержанию термостойких бактерий в сыром молоке по мере повышения температуры пастеризации несколько понижались, но сравнительно медленно. Это, несомненно, обусловлено тем, что именно термостойкие бактерии выживают в процессе пастеризации молока. Содержание кишечной палочки в сыром молоке колебалось в пределах от 10^3 до 10^6 в 1 мл, в среднем оно составляло 10^4 в 1 мл. Во всех пробах молока после пастеризации кишечная палочка не была обнаружена в 10 мл. Фосфатазная проба дала отрицательный результат, что свидетельствовало о гигиенической надежности исследуемого режима пастеризации.

Содержание энтерококков в сыром молоке колебалось от $7,9 \cdot 10^3$ до $9,8 \cdot 10^5$, в среднем было $4,0 \cdot 10^4$. Учитывая, что темп размножения энтерококков в молоке значительно ниже, чем кишечной палочки, содержание энтерококков может, по-видимому, в большей степени свидетельствовать об истинном фекальном загрязнении его. В процессе пастеризации содержание энтерококков в молоке снижалось довольно значительно. В 22 пробах титр энтерококков был 0,1 мл, в 2 – 0,01 мл и в 6 – 0,001 мл. Приведенные данные свидетельствуют о том, что при принятых в промышленности режимах пастеризации энтерококки полностью не погибают и, как правило, обнаруживаются в молоке сразу после пастеризации.

Проведенные нами исследования показали, что при холодильном хранении молока, отобранного в стерильную посуду сразу после пастеризации, в течение 2 суток практически количество бактерий не увеличивалось. То же самое наблюдалось в процессе хранения молока при комнатных условиях. Даже при таких неблагоприятных режимах хранения свертывание молока наступало только на 5–6 день. Следовательно, микрофлора, оставшаяся в молоке после пастеризации, сравнительно инертна в биохимическом отношении и не влияет существенным образом на его стойкость при хранении. Об этом имеются указания и американских исследователей (Э. М. Фостер и др., 1961).

Вторичное обсеменение молока после пастеризации

Основными группами бактерий, влияющими на стойкость молока и его микробиологические показатели, являются молочнокислые, несинхротрофные бактерии, бактерии группы кишечной палочки, энтерококки. Синхротрофные бактерии не обнаруживались в молоке из краника пастеризатора; после розлива в 1 мл молока содержалось 10–100 клеток этих микроорганизмов (М. Огава, К. Такемура и др., 1968). Основными источниками обсеменения

молока психротрофны-ми бактериями являются воздух, оборудование, одежда и руки работников. В остатках молока и смывных водах могут развиваться и остальные вышеупомянутые группы микроорганизмов. Проведенные нами в производственных условиях исследования (Н. С. Королева, В. Ф. Семенихина и др., 1971) показали, что количество бактерий, попавших в молоко после пастеризации, составляло 84,5%–94,9% от общей микрофлоры молока в бутылке. Данные, характеризующие изменение микрофлоры молока на отдельных этапах технологического процесса, приведены на рис. 46. Соприкасаясь с технологическим оборудованием, пастеризованное молоко, не содержащее кишечной палочки в 10 мл, обсеменялось ею, в результате чего бродильный титр достигал 10^{-1} , 10^{-2} и даже 10^{-3} мл. В случае непрерывной работы разливочно-укупорочных автоматов не происходит существенного бактериального обсеменения молока. В основном бактериальное обсеменение молока после пастеризации происходит в молокохранилищах танках и молокопроводах, если их заполнение чередуется с периодами, когда они остаются незаполненными, но не вымытыми. На ряде предприятия сложилась практика многократного заполнения танков молоком; считается, что если из танка молоко поступает на розлив, а затем танк вновь заполняется молоком, создается непрерывный процесс. На самом деле это далеко не так. Освобождение танков емкостью 5–10–20 т занимает значительное время, за которое на стенках танка, не соприкасающихся с молоком, остается молочная пленка, в которой активно размножаются микроорганизмы. Если танк после розлива остается какое-то время незаполненным, накопление микроорганизмов происходит на всей его поверхности.

Наличие сложных коммуникаций и большой объем перерабатываемого молока затрудняют обеспечение непрерывного прохождения его по ходу технологического процесса. В результате на некоторых участках (в трубах, кранах) молоко задерживается, температура его повышается, происходит развитие бактерий. При каждом последующем заполнении танков наблюдается резкое повышение общей бактериальной обсемененности и снижение бродильного титра.

В наименьшей степени обсеменяется молоко за счет тары, если мойка или иная обработка проводится надлежащим образом. Так, если на всю внутреннюю поверхность бутылки допускается не более 10 клеток бактерий, то при поступлении 500 мл молока на каждый миллилитр его придется 0,02 клетки, что составляет ничтожную величину по сравнению с обсемененностью молока. Исследования Л. Лили (1969) показали, что число

стерильных образцов наибольшее при использовании стеклянных бутылок, при использовании пакетов тетра-пак – наименьшее.

Влияние условий хранения на микрофлору пастеризованного молока

Длительность хранения пастеризованного молока определяется его первоначальной обсемененностью и температурой. Органолептические свойства молока начинают изменяться при бактериальной обсемененности 5–10 млн./мл (Дж. Д. Пунч, Дж. С. Ольсон и др., 1965; Л. Лили, 1969; Л. Лили и Кварони, 1969). Стойкость молока с низким первоначальным бактериальным обсеменением сохранялась при 5° С до 21 дня, при 7–15° – 8–12 дней, при 22–24° – 24 ч и при 27–28° – 8 ч (Л. Лили, Е. Кварони, 1969). Органолептические свойства молока в упаковке полп-пак и блок-пак начинали изменяться через 8 дней, в тетра-пак – через 10 дней. Сливки 18, 44 и 48%-ной жирности, хранившиеся при 5° С, через 6 дней были еще годны к употреблению; при 15° С они становились пригодными к употреблению уже через 2 дня (Дж. Г. Дэвис, 1969). Исследования, проведенные во ВНИМИ (Н. С. Королева, В. Ф. Семенихина, А. П. Патратий, В. П. Шидловская и др.), подтвердили, что при хранении питьевого молока микробиологические показатели ухудшаются значительно раньше, чем химические и органолептические. Молоко кислотностью 20° Т уже в момент заполнения танков по микробиологическим показателям не удовлетворяло требованиям ГОСТа. Во время хранения молока в танке при 4–6° С существенных изменений в содержании бактерий не отмечалось в течение 4–6 ч. После розлива молоко, содержащее бактерий не более 10 тыс./мл и хранившееся при температуре 2–4° С, сохраняло свои микробиологические показатели в пределах нормы после 48 ч, при температуре 8° С через 32 ч его показатели уже не соответствовали норме. При более высоком обсеменении молока его микробиологические показатели изменялись значительно быстрее.

Результаты проведенной работы показывают, что стойкость питьевого молока можно повысить, приняв соответствующие меры по снижению его бактериальной обсемененности на всех этапах технологического процесса и по поддержанию температуры хранения не выше 2–4° С.

Некоторые специалисты считают, что, применяя ужесточенные режимы пастеризации можно повысить качество и гигиеническую надежность питьевого молока. Анализ приведенных выше данных показывает, что этот способ нельзя считать оправданным и целесообразным по следующим соображениям:

- снижается питательная ценность молока;
- эксплуатируемые в промышленности пастеризационно-охладительные установки не могут работать при повышенных температурах, в противном случае снижаются их эксплуатационные характеристики и долговечность работы;
- с повышением температуры пастеризации изменяется режим работы установки, в результате чего не достигается требуемого охлаждения, что имеет решающее значение для сохранения качества молока в процессе его последующего хранения;
- но объему микрофлоры, обсеменяющая молоко после пастеризации при прохождении оборудования, значительно превышает остаточную микрофлору, поэтому ужесточение режимов пастеризации не может привести к существенному улучшению микробиологических показателей и повышению стойкости питьевого молока.

Стерилизованное молоко

Стерилизованное молоко вырабатывают тремя способами: автоклавированием в стеклянных бутылках, комбинированным способом (первая стерилизация в потоке, вторая – в бутылках), одноразовой стерилизацией с последующим розливом в асептических условиях. С микробиологической точки зрения понятие “стерилизованное молоко” не означает, что оно должно быть полностью стерильно. Чтобы при обработке большого количества молока обеспечить его абсолютную стерильность, требуется применить температуры, при которых существенно меняется химический состав и питательная ценность продукта.

Эффективность стерилизации зависит от содержания термостойких спор в сыром молоке. При искусственном обсеменении молока спорами *Bac. subtilis* на установке ВТИС было достигнуто логарифмическое снижение в 9 раз (Е. Г. Самуэльсон, С. Холм, 1966). Учитывая, что обычно в сыром молоке содержится не более 10– 100 спор/мл, практически удовлетворительной считают эффективность стерилизации между 7 и 8. Это значит, что после стерилизации остается 1 спора на 1 т молока, т. е. при розливе в 0,5-литровые бутылки в одну из 2000 емкостей попадает 1 спора. Выживание отдельных спор далеко не всегда приводит к порче продукта, так что фактически число емкостей с нестерильным продуктом крайне мало. В соответствии с современными представлениями (Г. Бартоп, Дж. Пиен, Г. Тиеулин, 1972) стерилизованное молоко должно удовлетворять следующим требованиям: достаточно долго храниться; не содержать вредных для здоровья человека микроорганизмов (патогенных и токсигенных) и токсинов; не содержать

микроорганизмов, способных размножиться после стерилизации и вызывать порчу.

Микрофлора стерилизованного молока, выработанного комбинированным способом

При производстве стерилизованного молока комбинированным способом молоко стерилизуют при 135°C с выдержкой 15–20 с, охлаждают до $20\text{--}30^{\circ}\text{C}$, затем подогревают до $65\text{--}70^{\circ}\text{C}$, разливают в узкогорлые бутылки, укупоривают их кронен-корками и повторно стерилизуют в башенном стерилизаторе при 114°C . При освоении и эксплуатации линии производства стерилизованного молока может возникнуть два порока микробиологического происхождения: прокисание и образование горечи. **Порок прокисания** характеризуется следующими признаками: в отдельных бутылках одной партии молоко свертывается, при этом часто образовывался неровный сгусток с признаками газообразования. Бутылки с испорченным молоком можно легко обнаружить и отсортировать. При микроскопировании обнаруживаются стрептококки и палочки типа молочнокислых, кислотность сгустка была 70°T и выше. Порок возникает в результате нарушения герметичности укупорки, обусловленной плохим качеством кронен-корок и их загрязнением перед укупоркой. Посторонняя микрофлора попадает в бутылку в последней секции башни, где бутылки обмываются водой при температуре, допускающей развитие микроорганизмов.

Порок горечь не сопровождается какими-либо заметными изменениями внешнего вида молока. Порок можно обнаружить лишь при употреблении молока в пищу. Исследуя причины возникновения порока, установлено, что возбудителем его являются термофильные анаэробные споровые палочки типа *Bac. stearothermophilus* с оптимальной температурой развития $55\text{--}60^{\circ}\text{C}$. Условия для их размножения создавались в промежуточной емкости, куда молоко поступало после первой стерилизации перед розливом. Споры этих микроорганизмов, оставшиеся после второй стерилизации, прорастали после того, как молоко в ящиках устанавливали плотными штабелями на складе с не регулируемой температурой. Порок проявляется летом, так как в этот период начальная температура молока в бутылках, равная примерно 50°C , сохранялась на этом уровне в течение 6–8 ч. При быстром охлаждении молока перед складированием порок не развивается, так как при этих условиях споры термофильных бактерий не могли прорасти. Исследуя причины возникновения горечи, проведён контроль большого числа проб молока путем термостатирования при 55°C . И было установлено, что при такой температуре более 50% проб молока были

нестерильными. Этот метод позволял обнаружить видимые изменения в 14,8% образцов молока (Г. Бартон, Дж. Пиен и Г. Тиеулин, 1972). Фактически же при умеренных температурах хранения продукта не наблюдается изменений внешнего вида, вкуса и рН. Это обстоятельство подтверждает высказанное ранее мнение, что при производстве стерилизованного молока важно не только соблюдать условия абсолютной стерильности, но и не допустить развития оставшихся бактерий или их спор при последующем хранении.

Микрофлора стерилизованного молока, выработанного одноступенчатым способом с последующим розливом в асептических условиях

При этом способе молоко стерилизуют непосредственным введением пара при 140–150° С или в стерилизаторах с поверхностным обогревом при 130–140° С. Затем молоко охлаждают до 20° С и разливают на линии асептического розлива в бумажные пакеты. Причины возникновения пороков микробиологического происхождения на линиях производства стерилизованного молока, укомплектованных установками ВТИС (пароконтактный метод стерилизации) и автоматами “Тетра-Пак-Асептик” для асептического розлива, были подробно изучены В. С. Лешиной (1971). Продукты с пороками характеризовались повышенной кислотностью (60–70° Т) и наличием плотного сгустка, иногда горьким вкусом, отсутствием сгустка или наличием признаков пептонизации молока. В первом случае при микроскопировании в препаратах обнаруживалась смешанная микрофлора с преобладанием молочнокислых стрептококков, во втором – наличие спорных палочек. Пороки чаще наблюдались весной и летом. В результате систематического контроля производства путем отбора молока из буферного танка в контрольную колбу и через каждые 30 мин работы по 2 пакета с каждого упаковочного автомата с последующим термостатированием образцов при 37° С были выявлены следующие наиболее типичные нарушения: режимов стерилизации; режимов мойки и дезинфекции оборудования на линии асептического розлива; герметичности в асептической части установки ВТИС или на линии асептического розлива до упаковочных автоматов; условий асептики на упаковочных автоматах, некачественная обработка бумаги. На основании данных повседневного контроля нельзя определять средний процент брака стерилизованного молока, вырабатываемого на конкретной линии, так как в этом случае количество отбираемых проб слишком мало для статистической обработки. При инкубировании 35310 образцов асептически упакованного молока

свертывание его наблюдалось в 36 пакетах, еще в 2 пакетах было обнаружено изменение вкуса и запаха (Г. -Ромагноли, Г. Бреци, 1970). Органолептические результаты согласовывались с микробиологическими, на основании чего был сделан вывод о нецелесообразности микробиологического контроля стерилизованного молока. Делаются попытки повысить стойкость питьевого молока путем его стерилизации, но с последующим розливом в неасептических условиях. По данным Энона (1969), молоко, подвергнутое УВТ-стерилизации, хранили в танках при 0°С в течение 3–4 недель, затем повторно пастеризовали, упаковывали и хранили при 0, 1, 4,5 и 5° С. При этом качество большинства образцов сохранялось более 10 недель, отдельных – до 23 недель. В Японии молоко обрабатывают при 120–135° С и упаковывают в обычные бутылки без соблюдения асептики (Р. Ханзен, 1970). Однако при использовании такой технологии требуется исключительно высокая санитарная культура производства, при которой вторичное обсеменение молока после пастеризации сводится к минимуму.

Работа, проведенная А. Эйрардом и Т. Одэт (1966), показала, что разница в сроках хранения молока, пастеризованного и стерилизованного, разлитого на обычных линиях, сравнительно невелика и не позволяет создать новый вид питьевого молока. Стерилизация оказывается совершенно неэффективной при низком уровне санитарно-гигиенической обработки оборудования и недостаточном охлаждении молока.

Тема 7.2. ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ МИКРОФЛОРЫ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Молочнокислые стрептококки, гомоферментативные молочнокислые стрептококки

Молочный стрептококк. *Str. lactis*. Форма клеток в молоке – овальные кокки величиной от 0,5 до 1 мк, соединенные попарно или в виде коротких цепочек. Хорошо окрашиваются обычными красками, красятся по Граму, неподвижны, спор не образуют. На плотных питательных средах образуют колонии: поверхностные – мелкие (диаметром до 1 мм), круглые, светлые, глубинные – чечевице-образные. Оптимальная температура развития 25–30° С, максимальная 40° С, минимальная 10° С и иногда несколько ниже. При внесении культуры петлей в 10 мл молока и при оптимальной температуре активные штаммы свертывают молоко за 10–12 ч, образуя плотный ровный сгусток. Через 18 ч кислотность сгустка достигает 80–90° Т, а через 5–7 дней – 100–125° Т. *Str. lactis* – основной компонент микрофлоры заквасок для творога, сметаны, простокваши. Он входит также в состав микрофлоры кефирного грибка. *Str. lactis* восстанавливают и свертывают лакмусовое молоко, не образуют ацетона, растут при 39° С и при наличии 4% NaCl образуют значительное количество кислоты, разлагают аргинин с выделением аммиака; не развиваются в среде, в которой содержится 6,5% NaCl и в щелочной среде (при pH 9,5). *Str. lactis* используют в заквасках как активный кислотообразователь в начале процесса сквашивания. Благодаря относительно низкому конечному пределу кислотообразования можно получить продукт со сравнительно невысокой кислотностью. Развитие *Str. lactis*, попадающих в пастеризованное молоко с оборудования, является основной причиной снижения стойкости питьевого молока..

Разновидностью *Str. lactis* является *Str. lactis* var. *maltigenes*, вызывающий образование в молоке и сливках солодового, хлебного запаха. Установлено, что хлебный запах обусловлен образованием 3-метилбутанола. Г. А. Харрисон, Е. А. Капрала и др. (1969) выявили наличие у этих микроорганизмов дегидрогеназы, обуславливающей образование 3-метилбутанола и 2-метилпропанола. Реакция эта оказалась необратимой, она ускорялась при добавлении лактозы и альдегидов.

Сливочный стрептококк *Str. cremoris*. Многие штаммы *Str. cremoris* отличаются от *Str. lactis* по морфологии клеток – они часто дают в молоке сочетание в виде цепочек. Форма колоний такая же, как и у *Str. Lactis*. Оптимальная температура развития 25–30° С. максимальная 36° С, предельная кислотность молока 110–115° С. При пониженных температурах

культивирования (15–20° С) некоторые штаммы *Str. cremoris* образуют значительное количество летучих кислот; восстанавливают и свертывают (иногда только частично) лакмусовое молоко, дают отрицательную или лишь слабоположительную пробу на ацетон, не расщепляют аргинина, при 39° С не растут и в среде с 4% NaCl не развиваются или развиваются слабо. Развиваясь в молоке, *Str. cremoris* образует сгусток, напоминающий по консистенции сметану. Это свойство *Str. cremoris* можно использовать при подборе заквасок для продуктов, характеризующихся густой консистенцией (сметана).

Термофильный молочнокислый стрептококк *Str. thermophilus*. Форма клеток в молоке – кокки, часто соединенные в длинные цепочки. По величине клетки несколько крупнее, чем клетки *Str. lactis*, что позволяет приблизительно разграничивать (по микроскопическому препарату) эти два вида при совместном развитии их в культуре. На агаре с гидролизованным молоком термофильные молочнокислые стрептококки развиваются медленнее, чем мезофильные (через 48ч), и дают более мелкие колонии – темные, зернистые, иногда локопообразные (В. М. Богданов, 1959). Оптимальная температура развития 40–45° С; свертывает молоко при 50° С. При внесении культуры петлей в 10 мл молока и при оптимальной температуре активные штаммы свертывают молоко за 12–14 ч. Предел кислотообразования отдельных штаммов *Str. thermophilus* – 100–115° Т.

Str. thermophilus не развивается при наличии в молоке 0,1% метиленового голубого, не обесцвечивает лакмусовое молоко, образует ацетон в небольшом количестве (В. М. Богданов, 1959.б, Р. Любенау-Нестле и Х. Маир-Вальдбург, 1966). В бульоне с глюкозой и 4% NaCl кислотообразование не наблюдается, а с 2% оно наблюдается только у некоторых штаммов.

Термофильные стрептококки применяют при производстве южной пачековой простокваши, йогурта, ряженки, варенца. Многие культуры отличаются способностью образовывать вязкие, иногда тягучие сгустки, но встречаются штаммы, образующие колющиеся сгустки.

Из-за сравнительно низкой энергии кислотообразования *Str. thermophilus* редко используют в чистой культуре, чаще их применяют в комбинации с молочнокислыми палочками – болгарской и ацидофильной или мезофильными молочнокислыми стрептококками. Термофильные стрептококки могут попадать в молоко и не с заквасками. По данным В. М. Богданова, В. Г. Геймберг и др. (1961), в молоке, пастеризованном при 73–76° С, значительную часть остаточной микрофлоры составляют термофильные стрептококки. Вследствие довольно низкой биохимической

активности термофильный стрептококк, содержащийся в пастеризованном молоке, по-видимому, не играет большой роли в снижении стойкости питьевого молока, а также в формировании качества ряда кисломолочных продуктов. Однако в таких продуктах, как ацидофильное молоко, при производстве которого сквашивание осуществляют при высоких температурах с участием чистых культур ацидофильной палочки, нередко возникает порок, выражающийся в потере типичности вкуса и консистенции, обусловленный развитием стрептококков. По-видимому, в данном случае причиной порока является именно термофильный стрептококк.

Энтерококки.

В группу энтерококков входят **Str. faecalis**, **Str. faecium**, **Str. liquefaciens**, **Str. zymogenes**, **Str. durans**. К ним относятся также два вида стрептококков, составляющих нормальную микрофлору кишечника крупного рогатого скота – **Str. bovis** – и лошадей – **Str. equinus** (Г.П. Калина и А. П. Калина, 1969). Форма клеток – диплококки, реже короткие цепочки, колонии – прозрачные, голубоватые, иногда мутноватые с ровными краями. Эти бактерии развиваются как при 10° С, так и при 45° С. Выдерживают нагревание до 63° С в течение 30 мин, гибнут при 85° С с кратковременной выдержкой при этой температуре. При минимальном обсеменении и оптимальной температуре свертывают молоко в течение 20–24 ч, иногда и более. Предельная кислотность 80–100°Т (В. М. Богданов, 1959). Лакмусовое молоко восстанавливают и свертывают. Развиваются при наличии в молоке 0,1% метиленового голубого, 6,5% NaCl и при рН 9,6, образуют из аргинина аммиак.. **Str. liquefaciens** (маммококк) выделяет сычужный фермент, в результате чего, молоко свертывается при сравнительно низкой кислотности, при этом образуются пептиды, придающие продукту горький вкус. В большом количестве энтерококки находятся в сыром молоке, часть из них выдерживает пастеризацию, поэтому они всегда обнаруживаются в пастеризованном молоке и молочных продуктах. При оценке качества питьевой воды и некоторых пищевых продуктов наличие энтерококков рассматривается как показатель фекального загрязнения (Г. П. Калина, А. П. Калина, 1969). Не исключена возможность применения этого теста и для характеристики санитарно-гигиенического качества молочных продуктов (Э. С. Дербинова. 1969, П. К. Полищук, 1971). Однако ценность его снижается из-за высокой термостойкости энтерококков и их способности размножаться в молоке (Н. С. Королева, В. Ф. Семенихина, 1972). Многие авторы пытались использовать энтерококки для приготовления молочных продуктов – сыров, а также лечебных кисломолочных продуктов (Л. А. Банникова и И. Н. Пятницына, 1960). За рубежом разработаны сухие молочные препараты, в

состав микрофлоры которых входят энтерококки (релактон в ЧР, лактобацillin в Англии). Н. Н. Седова (1969) установила, что энтерококки безвредны для человека и оказывают определенное профилактическое действие на работу кишечника. Исключение составляли лишь культуры *Str. faecalis* var. *liquefaciens*, при употреблении которых до 70% случаев (для отдельных штаммов) наблюдались пищевые токсикоинфекции.

Наиболее надежным признаком дифференциации является серологическая реакция. По классификации Ленсфильда все истинные молочнокислые стрептококки относятся к серологической группе N, энтерококки – к группе D.

Гетероферментативные молочнокислые стрептококки

Str. diacetylactis. Клетки расположены чаще всего в виде диплококков и коротких цепочек. На питательных средах образуют колонии: поверхностные, крупные, каплевидные, глубинные–чечевицеобразные. Установлено (Л. А. Луковникова, 1962), что при росте на плотной питательной среде, содержащей 3% агара, *Str. diacetylactis* образуют глубинные колонии в виде паучков или комочков ваты, напоминающие колонии молочнокислых палочек. Этим можно пользоваться для дифференциации *Str. diacetylactis* от молочнокислых стрептококков других видов. Оптимальная температура развития в молоке 25–30° С. *Str. diacetylactis* растет при 39–40° С, при температуре 45° С рост отсутствует. Предельная кислотность 90–100° Т.

При внесении петлей 10 мл молока активные штаммы свертывают молоко через 16–18 ч, менее активные – через 24–48 ч. Сгусток молока плотный, часто с наличием пузырьков газа. Вкус чистый, кисловатый, слегка щиплющий, иногда сладковатый. Аромат специфический, обусловленный накоплением диацетила. Лакмусовое молоко свертывают и восстанавливают. Реакция может быть нетипичной: сначала наступает порозовение и свертывание, затем более или менее быстрое обесцвечивание. Штаммы *Str. diacetylactis* сбраживают лактозу, соли лимонной кислоты с образованием CO₂, а также и диацетила и ацетоина. Большею частью разлагают аргинин с выделением аммиака, устойчивы к наличию в среде 4% NaCl. *Str. diacetylactis* вводят в закваску для творога, сметаны, простокваши. До сих пор нет единого мнения о том, относятся ли *Str. diacetylactis* к группе гетероферментативных или гомоферментативных стрептококков. По способности образовывать значительное количество молочной кислоты они приближаются к *Str. lactis*, а по способности образовывать побочные продукты брожения – к гетероферментативным стрептококкам. Ц. А. Е.

Бриггсом (1952) установлена серологическая идентичность их со *Str. lactis* и *Str. cremoris*. На близость *Str. diacetilactis* к *Str. lactis* указывают также получаемые из них мутанты, не способные сбраживать цитраты (Дж. М. Шерман, 1955). Однако В. Коллинз и Харвей (1962) установили, что в расщеплении цитратов участвуют два фермента – цитратаза и цитратпермеаза. Первый фермент превращает цитрат в уксусную и щавелевоуксусную кислоты, а второй – осуществляет транспортировку цитрата в клетку через клеточный барьер. Мутанты *Str. diacetilactis*, не расщепляющие цитрат, содержат цитратазу, но не продуцируют цитратпермеазу. *Str. lactis* и *Str. cremoris* не продуцируют ни одного из этих ферментов. Таким образом, по ферментным системам *Str. diacetilactis* существенно отличаются от гомоферментативных стрептококков. И. И. Климовский с соавторами (1969) выявил также отличия в протеолитической активности и характере продуктов протеоллиза у *Str. diacetilactis* и *Str. lactis*. У штаммов *Str. diacetilactis* была отмечена разница в способности образовывать диацетил. Многие штаммы не продуцируют диацетила, но продуцируют много ацетоина. М. И. Пнменова (1957) предложила такие штаммы объединить в отдельный вид – *Str. acetoinicus*. Введение в закваски *Str. acetoinicus* позволяет улучшить их вкус. В СССР этот микроорганизм широко используют при составлении заквасок для творога, сметаны, простокваши.

Leuc. citrovorum (*Str. citrovorus* (Хаммер, 1928) и **Leuc. Dextranicum** *Sir. paracitrovorus* (Хаммер, 1928). Клетки шарообразные, соединены в пары и цепочки. Величина клеток – как у *Str. lactis*, редко – меньше. На агаре образуют мелкие сероватые колонии, на среде с лимоннокислым кальцием – более крупные, каплевидные, окруженные зоной просветления в результате сбраживания лимоннокислого кальция. Оптимальная температура роста 25–30° С, хорошо растут и при 20–21° С; при температуре 45° С не развиваются. Молоко свертывают редко, обычно максимальная кислотность не превышает 40–50° Т. Не образуют аммиака из аргинина. Сбраживают лимонную кислоту и ее соли с образованием ацетоина, диацетила, 2-3-бутилен-гликоля, уксусной кислоты, углекислого газа.

Входя в состав микрофлоры естественной кефирной закваски. *Leuc. citrovorum* и *Leuc. dextranicum* играют большую роль в образовании вкуса и аромата кефира. В случае излишнего их развития наблюдается вспучивание.

Молочнокислые палочки, гомоферментативные молочнокислые палочки

Lbm. Bulgaricum (*Bacillus* (*Lactobacillus*) *bulgaricus*, *Therminobacterium bulgaricum* (Orla-Jensen, 1936) *Bacterium bulgaricum*.

Болгарская палочка выделена Григоровым и Коэндропом из болгарского кислого молока в 1905 г. Форма клеток в молоке – длинные и короткие палочки от 5 до 20 мк, толщиной 1–1,5 мк. Красятся по Граму, спор не образуют. При окрашивании препаратов из молока метиленовым голубым в клетках часто наблюдаются четко выраженные метахроматические зерна, иногда неравномерно окрашенные участки протоплазмы. На плотных питательных средах образуют колонии: поверхностные – более или менее крупные (диаметром 1,5–3 мм), локонообразные, светлые; глубинные – в виде кусочков ваты (“паучки”). Оптимальная температура развития 40–45° С, максимальная 60–62° С, минимальная 20° С. При внесении петлей в пробирку с молоком свертывают его при оптимальной температуре за 8–12 ч. Уже через 12–14 ч после заквашивания кислотность нередко достигает 120–160° Т, через 7 суток 200–350° Т. В молоке образуют преимущественно D (–) или DL молочную кислоту, иногда в небольшом количестве летучие кислоты.

Некоторые штаммы болгарской палочки образуют также ацетальдегид, который придает продуктам специфический вкус и аромат и антибиотические вещества, подавляющие нежелательную микрофлору (П. Риттер, 1964, Л. Начев, Ц. Никоевска, 1969, В. Боттацци, М. Бескове, 1969, Е. В. Мельникова, 1973). Болгарскую палочку в сочетании с термофильным стрептококком применяют в качестве энергичного кислотообразователя для улучшения вкуса и аромата при производстве южной и мечниковской простокваши, а также йогурта и ряженки.

Lbm. acidophilum–ацидофильная палочка. Синонимы *Bacillus* (*Lactobacillus*) *acidophilus* Moro (1900) *Thermobacterium intestinale* Orla-Jensen *a.* Winter (1936), *Bacterium acidophilum*.

В мировой литературе нет единого мнения о морфолого-культуральных и биохимических свойствах этого микроба. Впервые микроб под названием *Bacillus acidophilus* был выделен Моро из фекалий грудного ребенка в 1900 г. Если описание, данное Григоровым выделенной им болгарской палочке, более или менее соответствует современной характеристике этого микроорганизма, то микроб, выделенный Моро, не имеет ничего общего с применяемыми в настоящее время ацидофильными бактериями. Об этом свидетельствует прежде всего анализ данных об энергии кислотообразования этих микроорганизмов. Не менее разнообразны описания и других свойств ацидофильных бактерий: размеров клеток (короткие, тонкие или длинные, более толстые), формы колоний (R- или S-форма), сбраживание сахаров (способность сбраживать мальтозу или отсутствие этой способности). Такое

разнообразие взглядов, как нам кажется, можно объяснить следующими обстоятельствами.

Применение молочнокислых бактерий для приготовления кисломолочных продуктов возможно только в том случае, если они более или менее активно свертывают молоко. Бактерии, выделенные Моро и другими ранними исследователями, были не пригодны для указанной цели. Поэтому дальнейшие усилия были направлены на выделение из кишечника более активных в отношении кислотообразования микробов. Впервые такие микроорганизмы, свертывавшие молоко за 24 ч, были выделены Ретжером в 1922 г. и успешно применены ими и Н. Копеловым в клинических испытаниях. За рубежом не делалось попыток выделить более активные по энергии кислотообразования бактерии; в современной литературе они также характеризуются как сравнительно слабые кислотообразователи – свертывают молоко за 24 ч при внесении 0,5% закваски (Х. И. Клушп, 1968).

В СССР еще в довоенные годы велись настойчивые поиски ацидофильных бактерий – энергичных кислотообразователей.. Такие культуры были выделены они свертывали молоко при внесении петлей за 9–15 ч, а при внесении 3–5% – за 5–6 ч. Исследования, проведенные в 1951–1953 гг., показали, что культуры ацидофильных бактерий, активно свертывающие молоко, существенно отличаются по морфолого-культуральным и биохимическим свойствам от слабых кислотообразователей, характеристика которых почти полностью совпадает с описаниями зарубежных авторов: тонкие палочки (4–5 мк), колонии S-формы, способность к сбраживанию мальтозы и сахарозы.

В СССР из широкой группы ацидофильных бактерий, имеющих общий источник происхождения – кишечник, выделена подгруппа микроорганизмов, характеризующихся довольно определенными признаками (В. И. Верещагина, 1946; Н. С. Королева, 1960): форма клеток в молоке – длинные и короткие палочки, от 3 до 40 мк, толщиной 1 –1,5 мк, красятся по Граму; у некоторых штаммов так же, как и у болгарской палочки, наблюдаются метакроматические зерна при окрашивании препаратов метиленовым голубым: на плотных питательных средах образуют колонии: поверхностные – более или менее крупные (диаметром 1,5–3 мм), светлые, локонообразные; глубинные – в виде “паучков”. Оптимальная температура развития 37–38°С, максимальная 60– 62° С, минимальная около 20° С.

При внесении петлей в пробирку с молоком сквашивание при оптимальной температуре наступает через 10–12 ч. Предельная кислотность в молоке 180–300° Т. В молоке образуют молочную кислоту. Основным отличительным свойством ацидофильных бактерий является их

антибиотическая активность. Ацидофильные бактерии способны подавлять развитие ряда микроорганизмов, в том числе бактерий группы кишечной палочки, дизентерийной, паратифозной и других. Считалось, что бактерицидным началом молочнокислых бактерий, в том числе и ацидофильных, является молочная кислота. Однако И. И. Мечников еще в 1907 г. на основании работ Г. Д. Белоновского отмечал, что положительное действие болгарской палочки обусловлено не только молочной кислотой, но и особыми веществами, выделяемыми ею (И. И. Мечников, 1964).

Антибиотические свойства у ацидофильных бактерий впервые были обнаружены М. С. Полонской (1952). Она установила, что культуры ацидофильной палочки наряду с молочной кислотой образуют специфические вещества, оказывающие антибиотическое действие на кишечную палочку. Эти вещества термостабильны: не разрушаются даже при кипячении и проходят через бактериальные (мембранные) фильтры. В дальнейшем эти исследователи и М. П. Бибердиева (1958) выявили, что антибиотические вещества, выделяемые ацидофильной палочкой, угнетающе действуют на ряд штаммов кишечной палочки, патогенных представителей бактерий группы кишечной палочки и дизентерийных палочек, гнилостных бактерий и ряд других микроорганизмов

Ацидофильные бактерии устойчивы к неблагоприятным воздействиям внешней среды – щелочной реакции (рН 8), наличию в среде фенола, солей желчи (20%), NaCl (2%).

Несмотря на такое кажущееся обилие отличительных признаков, на практике трудно дифференцировать имеющиеся штаммы. Это объясняется тем, что свойства, характерные для ацидофильной палочки, связаны с приспособлением к условиям ее постоянного места обитания – кишечнику. На протяжении многих лет существовало мнение, что в результате культивирования ацидофильной палочки в молоке – среде, не свойственной для ее обитания, часть ее признаков может утрачиваться и штаммы нельзя отличить от коллекционных культур болгарской палочки. Поэтому некоторые авторы (А. Ф. Войткевич, 1948; С. А. Королев, 1932; Н. Копелов, 1926; Б. Менерт, 1960) считали болгарскую палочку разновидностью ацидофильной, утратившей в результате длительного развития в молоке признаки, обуславливающие возможность развития ее в кишечнике. В то же время среди штаммов, выделенных из молочных продуктов и идентифицированных как болгарская палочка, обнаруживают культуры с достаточно высокой антибиотической активностью, устойчивые к неблагоприятным условиям (М. С. Полонская, 1964; В. М. Богданов, 1957 и др.). Имеются данные, что ацидофильные бактерии, утратившие часть

свойств в результате лабораторного культивирования, попав в кишечник, могут вновь их восстановить (Н. Копелов, 1926; К. И. Кудзин, 1936; А. Шмидт-Бурбах, 1956 и др.). Производственно ценные штаммы ацидофильных бактерий применяют для приготовления ацидофильных кисломолочных продуктов, кумыса из коровьего молока.

Термоустойчивые молочнокислые палочки. Наряду с термофильными молочнокислыми палочками, вводимыми с заквасками, в кисломолочных продуктах встречаются термофильные молочнокислые бактерии незаквасочного происхождения (Н. С. Королева, 1960, 1961). Их легко обнаружить в таких продуктах, как творог и сметана, закваски для которых состоят только из молочнокислых стрептококков. Они имеют следующие морфологические, культурные и биохимические особенности. Клетки – палочковидные, размером 4–10-0,7–0,9 мк, одиночные, часто с резко выраженными зернами внутри; молодые клетки могут быть темноокрашенные, одиночные или в цепочках. Грам-положительны, спор не образуют, неподвижны, микроаэрофилы. Растут на молоке и агаре с гидролизованным молоком; на МПА роста нет. Глубинные колонии темные, желтовато-бурые, иногда с короткими отходящими нитями. При поверхностном росте колонии более крупные, локонообразные или зернистые с темным центром. При внесении петлей молоко свертывают за 8–10 ч, образуют предельную кислотность 150–220° Т. Сгусток неслизистый и слизистый, ровный, без газа. В молоке образуют в небольшом количестве летучие кислоты. Сбраживают глюкозу, галактозу, лактозу, сахарозу, мальтозу, левулезу, раффинозу, декстрин с образованием молочной кислоты. Выдерживают кратковременное нагревание в молоке до 85–90° С, иногда выше, что является одним из наиболее важных признаков, отличающих эти микроорганизмы от других видов термофильных молочнокислых палочек. Устойчивы к NaCl (до 2–3%) и желчи (до 30–40%). Некоторые штаммы отличаются значительной антибиотической активностью по отношению к кишечной палочке.

Применяемые в промышленности концентрации дезинфицирующих средств, например активного хлора, малоэффективны по отношению к термоустойчивым палочкам, что затрудняет борьбу с ними. Как нерегулируемая часть микрофлоры кисломолочных продуктов термоустойчивые молочнокислые палочки должны быть отнесены к группе технически вредных бактерий. В результате их жизнедеятельности происходит интенсивное кислотообразование, приводящее к развитию порока, – излишне кислый вкус. Иногда отдельные штаммы

термоустойчивой палочки могут вызывать тягучесть и нечистый неприятный вкус кисломолочных продуктов.

Термоустойчивые молочнокислые палочки были обнаружены в сыром молоке, поступающем на предприятия, в молоке, пастеризованном при 75° С с выдержкой 15–20 с и при 80–85° С с выдержкой 5–10 мин, на технологическом оборудовании, а также в различных кисломолочных продуктах и заквасках.

Результаты микроскопического исследования кисломолочных продуктов и заквасок свидетельствуют об обильном обсеменении их термоустойчивыми молочнокислыми палочками. Следует учесть, что методом микроскопирования удастся обнаружить палочки лишь в количестве, превышающем десятки тысяч клеток в 1 мл.

Уксуснокислые бактерии

В литературе много лет назад появились сообщения о том, что в молочных продуктах обнаружены бактерии, морфологически похожие на *Str. lactis*, но отличающиеся от них резко аэробным характером роста, подвижностью и способностью к интенсивному протеолизу молока. Долгое время эта группа микроорганизмов упоминалась как подвижные стрептококки (С. А. Королев, 1932), подвижные диплококки (В. М. Богданов, 1937), протеолитические молочнокислые бактерии (М. Р. Гибшман, 1945), 0-мукоидные формы молочнокислых бактерий (О. К. Палладина, 1941).

М. Р. Гибшман (1952), исследуя физиологические особенности этой группы микроорганизмов, пришла к выводу о принадлежности ее к уксуснокислым бактериям *Acetobacter aceti*. Уксуснокислые бактерии – подвижные перетрихп - клетки палочковидные, часто овальные, одиночные или соединенные парами либо в цепочки ; при окрашивании препаратов культур, выращенных в молоке, метиленовым голубым, клетки по морфологическим признакам часто не отличаются от молочнокислых стрептококков. Размеры клеток колеблются в пределах 0,6–2,5-0,4–0,6мк. По Граму не окрашиваются. Колонии на МПЛ и сусло-агаре маслянистые, блестящие, бесцветные или желтоватые. На жидких подкисленных средах уксуснокислые бактерии образуют пленку, слабую или более плотную, опускающуюся на дно пробирок. Аэробны, но при посеве уколом в МПЖ дают гвоздевидный рост (могут быть отнесены к факультативным аэробам). Желатин не разжижают, образуют каталазу и перекись водорода. Оптимальная температура развития 30° С. Хорошо растут при 20° С и слабо при 37–38° С. Окисляют этиловый спирт в уксусную кислоту, образуя от 5 до

9,6% уксусной кислоты. Устойчивы к спирту и уксусной кислоте. Ацидофильны. В молоке в чистой культуре практически не развиваются, так как не получают доступного источника углеводов. Совместно с молочнокислыми бактериями, которые образуют молочную кислоту, развиваются очень быстро.

По данным Л. А. Мелюзотной, и др. (1958), уксуснокислые бактерии молока способны синтезировать флавин, в результате чего на поверхности свернувшегося молока при совместном развитии в нем уксуснокислых и молочнокислых бактерий появляется оранжевое кольцо. Это является наиболее характерными признаками, позволяющими установить присутствие уксуснокислых бактерий в продуктах, а так же наличие на поверхности жидких подкисленных сред пленки, в которой при помощи микроскопирования обнаруживаются подвижные бактерии.

М. Р. Гибшман (1952) установила, что эти бактерии широко распространены среди микрофлоры молочных продуктов. В. М. Богданов и И. Н. Пятницына (1959), работая над получением кефирной закваски на чистых культурах, пришли к выводу, что уксуснокислые бактерии должны быть неизменным компонентом микрофлоры кефирной закваски, так как в результате применения закваски, не содержащей уксуснокислых бактерий, вкус кефира был нетипичным. Установлена способность уксуснокислых бактерий синтезировать витамин В₁₂ (В.М. Богданов, 1962). А. К. Максимова и Э. Е. Грудзинская (1959) отметили, что уксуснокислые бактерии угнетают развитие дрожжей в кефире и резко снижают количество образующегося спирта.

Отмечаемые многими авторами симбиотические взаимоотношения между уксуснокислыми и молочнокислыми бактериями (В. М. Богданов, 1962, М. Р. Гибшман, 1952, Л. А. Банникова, 1953, и др.) заставляют рассматривать уксуснокислые бактерии не как случайную редкую часть микрофлоры молочных продуктов, а как постоянный компонент ее. В. Н. Апульциной (1965), а впоследствии Н. А. Бавиной и И. В. Рожковой (1973) были проведены сравнительные исследования по определению количества уксуснокислых бактерий в кефирной закваске, кефире и твороге методом посевов на предельные разведения в гидролизованное молоко с рН 4,0–4,5 и обезжиренное молоко (учет по образованию оранжевого кольца на поверхности сгустка).

Наибольшее количество уксуснокислых бактерий содержится в грибковой кефирной закваске (сотни тысяч – млн./мл), в производственной закваске и в готовом кефире содержание уксуснокислых бактерий постепенно снижается (до 100–10 тыс./мл). По-видимому, это объясняется

тем, что продолжительность приготовления производственной закваски и кефира недостаточна для интенсивного развития уксуснокислых бактерий.

Результаты исследований творога свидетельствуют о связи между его качеством и количеством в нем уксуснокислых бактерий. Сравнительно немного уксуснокислых бактерий обнаруживалось в твороге из пастеризованного молока высшего сорта. В некоторых образцах творога первого сорта, выработанного из пастеризованного молока, и творога из сырого молока количество уксуснокислых бактерий достигало 6 млн/г.

Бактерии группы кишечной палочки

Бактерии группы кишечной палочки являются постоянными обитателями кишечника, но прекрасно развиваются также в почве, молоке и многих других продуктах. Бактерии этой группы бесспорные, грамотрицательные, имеют вид палочек, чаще всего коротких. В молоке и молочных продуктах в большинстве случаев обнаруживается *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*. Типичные формы *Escherichia coli* – мелкие подвижные палочки, не разжижают желатина, но разлагают пептон, образуя при этом индол. Не образуют апитил-метилкарбинола, не сбраживают сахарозы и солей лимонной кислоты. При сбраживании лактозы выделяются равные количества водорода и углекислого газа.

Enterobacter aerogenes – неподвижные палочки, образующие ацетилметилкарбинол, сбраживающие сахарозу и соли лимонной кислоты, не образующие индола. При сбраживании лактозы образуются углекислый газ и водород в соотношении 2:1. Оптимальная температура развития 38–40° С. На МПА бактерии группы кишечной палочки образуют крупные опалесцирующие колонии с гладким волнистым, иногда волокнистым краем. Колонии кишечной палочки по размеру (до 4–6 мм) и форме резко отличаются от колоний *Str. lactis* и других молочнокислых бактерий. У бактерий этой группы энергия и предел кислотообразования невелики. Молоко свертывают с образованием молочной кислоты за 1–5 суток, развивая максимальную кислотность 80° Т, редко 100° Т. Сгусток слабый, ноздреватый, вкус свернувшегося молока резкий, неприятный. Бактерии группы кишечной палочки широко распространены в молочных продуктах. Их рассматривают как санитарно-показательные микроорганизмы.

При оценке влияния бактерий этой группы на изменение качества кисломолочных продуктов наибольший интерес представляют такие свойства кишечной палочки, как способность развиваться при сравнительно кислой реакции среды (до pH 4,5–5), образовывать в молочных продуктах

газ, придавать им неприятные вкус и запах, иногда изменять консистенцию (вызывать тягучесть).

Гнилостные бактерии

В группу гнилостных бактерий входят микроорганизмы, вызывающие глубокий распад белков. При этом образуется ряд веществ, обладающих неприятным запахом, вкусом, нередко и ядовитыми свойствами. Гнилостные бактерии могут быть как аэробы, так и анаэробы, споровые и бесспорные.

К факультативно аэробным бесспорным гнилостным бактериям часто встречающимся в молоке, относятся грамотрицательные палочки *Proteus vulgaris* (протей), способные активно пептонизировать молоко с выделением газа. При развитии этих микроорганизмов в молоке кислотность его вначале несколько повышается (вследствие образования жирных кислот), а затем снижается в результате накопления щелочных продуктов. Бесспорные бактерии, например *Proteus vulgaris*, могут попадать в молоко с оборудования, из воды и других источников. При пастеризации молока *Proteus vulgaris* погибают.

К аэробным спорным бактериям относятся *Bac. subtilis* (сенная палочка), *Bac. mesentericus* (картофельная палочка), *Bac. mycoides*, *Bac. megatherium* и пр. Все они подвижны, красятся по Граму положительно, быстро развиваются в молоке, активно разлагая белки. При этом сначала молоко свертывается без существенного повышения кислотности, затем с поверхности сгустка наступает пептонизация молока. У некоторых спорных палочек (например, сенной) пептонизация молока начинается без предварительного свертывания казеина. Из анаэробных спорных гнилостных бактерий в молоке встречаются *Bac. putrificus* и *Bac. polymuxa*.

Bac. putrificus – подвижная палочка, разлагающая белки с обильным образованием газов (аммиака, углекислоты, водорода, сероводорода), *Bac. polymuxa* – подвижная палочка, образующая в молоке газ, кислоты (уксусную, муравьиную), этиловый и бутиловый спирты и другие продукты.

Высокая чувствительность к понижению реакции среды характерна для всех гнилостных бактерий. Этой особенностью определяются крайне ограниченные возможности для развития данной группы бактерий при производстве кисломолочных продуктов. Очевидно, что во всех случаях, когда молочнокислый процесс развивается активно, жизнедеятельность гнилостных бактерий прекращается. В производстве кисломолочных продуктов развитие гнилостных бактерий возможно только в исключительных случаях (в результате развития бактериофага полностью или в значительной мере остановлен молочнокислый процесс, утрачена

активность закваски и т. д.). Споры многих гнилостных бактерий могут содержаться в пастеризованном молоке. Однако практически они не играют роли при производстве и хранении этого продукта. Это объясняется тем, что основную остаточную микрофлору после пастеризации составляют молочнокислые бактерии, они же обсеменяют молоко при розливе, поэтому на фоне развития (хотя и слабого, из-за низких температур

хранения) молочнокислого процесса возможность размножения спорных микроорганизмов в пастеризованном молоке ничтожна. При производстве же и хранении стерилизованного молока споровые бактерии играют немаловажную роль. Даже незначительные нарушения режимов стерилизации могут привести к попаданию спор в стерилизованное молоко и вызвать в последующем его порчу при хранении.

Дрожжи

В основу классификации дрожжей положены различия в характере их вегетативного размножения (деление, почкование), спорообразования, а также морфологические и физиологические признаки.

По способности к спорообразованию дрожжи делят на спорообразующие и неспорообразующие. В кисломолочных продуктах из спорообразующих встречаются дрожжи родов *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Fabospora* и *Debaromyces*, из неспоровых – родов *Torulopsis* и *Candida*. С. А.

Королев (1932) разделил дрожжи, встречающиеся в молочных продуктах, по их биохимическим свойствам на три группы.

Первая группа – дрожжи, не способные к спиртовому брожению, хотя и потребляющие некоторые углеводы путем непосредственного окисления; к ним относятся виды *Mycoderma*, цветные бесспорные дрожжи *Torula*.

Вторая группа – дрожжи, не сбраживающие лактозу, но сбраживающие другие сахара; могут развиваться лишь в совместной культуре с микроорганизмами, обладающими ферментом лактазой, гидролизующей молочный сахар на моносахара; к ним относятся отдельные виды дрожжей рода *Saccharomyces*. Как показали исследования В. И. Кудрявцева (1954) и А.М. Скородумовой (1969), в кисломолочных продуктах, приготовленных на естественных заквасках, основными представителями этого рода являются дрожжи вида *Sacch. cartilagenosus*, сбраживающие мальтозу и галактозу. По мнению В. И. Кудрявцева, дрожжи этой группы могут положительно влиять на вкус и аромат кисломолочных продуктов, однако при чрезмерном их развитии возникает порок – вспучивание. Они относятся к так называемым

диким дрожжам и при производстве кисломолочных продуктов их не применяют. Однако возможно, что среди дрожжей этой группы могут быть найдены производственно-ценные культуры.

Третья группа – дрожжи, сбраживающие лактозу. Исследования А. М. Скородумовой (1969) показали, что среди дрожжей, выделенных из кисломолочных продуктов (приготовленных на естественной закваске), число дрожжей, самостоятельно сбраживающих лактозу, сравнительно невелико – из 150 штаммов – 32 (21%). Наибольший процент дрожжей, сбраживающих лактозу, был выделен из кефирных грибков и закваски (34,1%). Дрожжи, сбраживающие лактозу, были идентифицированы А. М. Скородумовой как *Fabospora fragilis*, *Saccharomyces lactis*, реже *Zygosaccharomyces lactis*. Способностью сбраживать лактозу обладают также некоторые виды *Candida* и *Torulopsis* – *Candida pseudotropicalis* var. *lactosa*, *Torulopsis kefir*, *Torulopsis sphaerica*, выделенные из кефирного грибка (В. И. Буканова, 1955).

Исследования, проводившиеся в Японии Т. Наканиши и Дж. Араи (1968, 1969), показали также, что наиболее распространенными видами лактозосбраживающих дрожжей, выделенных из сырого молока, являются *Saccharomyces lactis*, *Torulopsis versatilis*, *Torulopsis sphaerica*, *Candida pseudotropicalis*.

Для установления отношения дрожжей к сахарам культуры параллельно высевают в молочно-пептонную сыворотку, содержащую только лактозу, и на сусло, содержащее мальтозу. После выдержки при оптимальной температуре отмечают наличие или отсутствие газа.

Оптимальная температура развития дрожжей 25–30° С, что следует учитывать при выборе температуры для созревания продуктов, в состав микрофлоры которых они входят. По данным В. И. Букановой (1955) основным фактором, регулирующим развитие дрожжей разных видов в кефире, является температура. Так, повышенная температура (30–32° С) стимулирует развитие *Torulopsis sphaerica* и дрожжей, не сбраживающих лактозу. Дрожжи, сбраживающие лактозу, достаточно хорошо развиваются и при 18–20° С, однако повышение температуры до 25 и 30° С, как правило, стимулирует их размножение.

Большинство дрожжей предпочитает для своего развития кислую реакцию среды. Следовательно, в кисломолочных продуктах условия для них благоприятны.

Дрожжи очень широко распространены в кисломолочных продуктах и могут быть обнаружены почти в любом образце продукта, приготовленного на естественных заквасках. Однако дрожжи развиваются гораздо медленнее,

чем молочнокислые бактерии, поэтому в кисломолочных продуктах они обнаруживаются в меньшем количестве, чем молочнокислые бактерии.

Роль дрожжей и производстве кисломолочных продуктов исключительно велика. Обычно дрожжи рассматривают главным образом как возбудителей спиртового брожения. Но эта функция, по-видимому, не основная. Дрожжи активизируют развитие молочнокислых бактерий, витаминизируют продукты (С. Аскалонов, 1957). Дрожжи, сбраживающие лактозу и другие сахара, способны вырабатывать антибиотические вещества, активные против туберкулезной палочки и других микроорганизмов (А. М. Скородумова, 1951, 1954; В. И. Буканова, 1955).

Интенсивное развитие дрожжей незаквасочного происхождения нередко приводит к вспучиванию и изменению вкуса таких продуктов, как сметана, творог и сладкие творожные изделия. Излишнее развитие дрожжей, содержащихся в кефирной закваске при нарушении технологических режимов, также может вызвать газообразование в кефире (“глазки”) и даже его вспучивание.

Плесени

В кисломолочных продуктах (сметане, твороге, простокваше) из плесеней чаще встречается *Oidium lactis* (*Geotrichum candidum*, *Oospora lactis*). Она появляется на их поверхности сначала в виде отдельных белых пушистых колоний, затем, разрастаясь, образует сплошной пушистый налет. Клетки *Oidium lactis* – крупные с прямоугольными концами. От мицелия отделяются споры из которых развивается новый мицелий. *Oidium lactis* – аэробна, во может расти и в глубине продукта, недалеко от поверхности. Предпочитает кислую реакцию среды (рН до 3,5). Не разлагает молочного сахара, но окисляет молочную кислоту до углекислого газа и воды и быстро гидролизует молочный жир. Молочная плесень, развиваясь в кисломолочных продуктах отрицательно влияет на их вкусовые качества – вызывая прогоркание, запах и внешний вид.

Тема 7.3. Взаимоотношения между основными представителями микрофлоры цельномолочных продуктов

Характеристика основных видов взаимоотношения между микроорганизмами

Среди микроорганизмов молока распространены следующие виды взаимоотношений: **симбиоз, антагонизм и паразитизм**. **Симбиотические** взаимоотношения характеризуются взаимной пользой, которую получают два или более микроорганизмов при совместном развитии. Возможно, что при этом один микроорганизм вырабатывает вещества (аминокислоты, витамины), без которых на данной среде не может жить другой, а этот последний потребляет продукты обмена, угнетающие развитие первого. Возможны также случаи, когда каждый из симбионтов вырабатывает какое-то вещество, необходимое для другого. В понятие симбиоза входят также **синергизм** и **комменсализм**. О **синергизме** говорят, когда два вида, развиваясь в среде, вызывают в ней такие изменения, которые не может вызвать каждый из видов, развиваясь отдельно. Случаи, когда один вид микроорганизмов живет за счет продуктов обмена другого или стимулируется ими, не давая ничего другому виду, рассматриваются как **комменсализм** (“комменсал” в буквальном смысле – питающийся с одного стола). Разновидностью комменсализма когда один вид микробов подготавливает благоприятные условия для последующего развития другого, является **метабиоз**. Под **антагонизмом** понимают взаимную борьбу между двумя или несколькими микроорганизмами. Причинами антагонистической действия могут быть: конкуренция в потреблении необходимого питательного или ростового вещества; накопление продуктов обмена например молочной кислоты; изменение рН или окислительно-восстановительного потенциала в неблагоприятную сторону; выделена специфических антибиотических веществ, которые оказывают прямое или косвенное воздействие на обмен веществ других видов, или задерживают их рост, либо приводят к полной гибели. Как крайнюю степень антагонизма можно рассматривать **паразитизм**, при котором один организм развивается за счет живого вещества другого и приводит к его гибели.

Следует учитывать, что характер взаимоотношения в большой степени зависит от состава среды, в которой развиваются микроорганизмы, температуры, соотношения между микроорганизмами и другие факторов. Характер взаимоотношений можно установить только после тщательного и разностороннего исследования. Особенно трудно судить о

взаимоотношениях между микроорганизмами в такой сложной среде, как молоко.

Взаимоотношения между молочнокислыми бактериями

Взаимоотношения между молочнокислыми бактериями могут быть как симбиотическими, так и антагонистическими. Кроме того, характер взаимоотношений между одними и теми же молочнокислыми бактериями может меняться в зависимости от состава среды и условий культивирования.

Имеются наблюдения о благоприятном действии одних видов молочнокислых бактерий на другие. По данным С. А. Королева (1932), очень часто энергия смешанной культуры молочнокислых бактерий значительно выше энергии каждой из составляющих ее культур, повышение числа клеток обоих микроорганизмов в смешанной культуре *Str. lactis* и *Lbm. casei* (или – *Lbm. helveticum*) и энергии кислотообразования было установлено М. Богдановым. Это же явление зачительно позднее было отмечено П. Риттером (1964). Из культур *Str. Lactis*, выделены клеточные экстракты, которые оказывали стимулирующее действие на рост молочнокислых палочек (А. Л. Бранен, Т. В. Кинан, 1969).

В результате изучения микрофлоры йогурта (Дж. В. Петте, Лолкема, 1950, 1957) установлено, что при развитии в молоке совместной культуры *Str. thermophilus* и *Lbm. bulgaricum* кислото-образование происходит интенсивнее, чем при развитии каждой культуры отдельно. Считается, что стрептококки как бы подготавливают условия для развития молочнокислых палочек, снижая окислительно-восстановительный потенциал до величины, благоприятной для развития молочнокислых палочек. С другой стороны, молочнокислые палочки вырабатывают водорастворимое, термостабильное ростовое вещество, которое стрептококки не могут сами продуцировать. Вероятнее всего, что в состав этого вещества входит аминокислота валин (Дж. В. Петте, 1957, Дж. Дэвис, 1963). Имеются сообщения о взаимном стимулирующем действии отдельных видов молочнокислых бактерий – *Str. faecalis* и *Str. arabinosus*, молочнокислых палочек *Lbm. casei* и *Leuc. citrovorum* и т. д. Наблюдаемые между этими микроорганизмами симбиотиче-ские взаимоотношения основаны на снабжении ими друг друга необходимыми для развития веществами.

Р. С. Дехайя и М. Л. Спекк (1962) выделили стрептококки – слабые кислотообразователи, которые оказывали стимулирующее действие на сильных кислотообразователей. Стимулирующим действием обладали не только живые культуры, но и их фильтраты. Этими же авторами (1966) установлено образование пептидов. стимулирующих рост и

кислотообразование *Str. lactis* в совместной культуре их с *Lbm. casei*. Палочки вырабатывали вещества, стимулирующие рост только в присутствии стрептококков.

Возможность получения симбиозов из *Str. lactis* и *Str. cremoris* при составлении двухштаммовых заквасок для сыра показана С. Л. Котари, и др.(1970), Л. Е. Персе (1970) и многоштаммовых – для кисломолочных продуктов– Л. А. Банниковой с сотр. (1966). При этом было достигнуто повышение кислотообразования в комбинациях по сравнению с чистыми культурами на 30–50%. По-видимому, этот эффект обусловлен тем, что между микроорганизмами происходит сложный обмен продуктами. Общая закономерность их жизнедеятельности, отмечаемая большинством исследователей, состоит в том, что культуры со слабой протеолитической активностью стимулируются культурами с более высокой протеолитической активностью.

Антагонистические взаимоотношения между молочнокислыми бактериями обусловлены, по-видимому, главным образом выделением специфических антибиотических веществ. Способность штаммов *Str. lactis* вырабатывать антибиотическое вещество низин впервые была отмечена Х. Р. Уайтхедом и Дж. А. Коксом в 1933 г. Лишь 10 лет спустя над этой проблемой начали работать в Англии Мэттик, Хирш и Берридж. В чистом виде выделил низин А. Хирш (1951); была установлена его полипептидная природа. Полипептиды вырабатываемые разными штаммами, несколько отличаются по химическому составу, поэтому их принято называть низинами. Низины оказывают антибиотическое действие на все стрептококки (в том числе и на молочнокислые), включая серологические группы С и D, пневмококки, коринебактерии, актиномицеты, молочнокислые палочки, клостридии и другие спорообразующие бактерии. На бактерии группы кишечной палочки они не действуют.

При наличии в сыром молоке большого количества (до 80 – 160 тыс./мл) стрептококков, образующих низин, наблюдалось подавление молочнокислых палочек, вводимых с закваской при выработке швейцарского сыра (П. Риттер, 1964). Имеются культуры молочнокислых бактерий, чувствительные и малочувствительные к продуктам обмена антагонистов (К. М. Шэхэни, 1962). У некоторых штаммов *Str. thermophilus* выявлена способность выделять фермент низиназу, разрушающий низин (ГГ. Р. Алифакс и Р. Шевалье, 1962). Возможно, что этим в какой-то степени объясняется нечувствительность отдельных культур к низину.

Недостаточно тщательный учет наличия внутривидового антагонизма у молочнокислых стрептококков может привести к превращению

многоштаммовой закваски в одноштаммовую). По данным Е. Б. Коллинза (1961), некоторые штаммы молочнокислых стрептококков в смеси с другими культурами того же вида – становятся преобладающими, даже если они не продуцируют антибиотики. Возможно, что это связано с различиями в энергии размножения, кислотообразования, а также с различиями в устойчивости к конечным продуктам брожения, потребности в питательных веществах и пр. Так, Л. Г. Лайтбоди и Л. Дж. Минуэлл (1955) выявили способность *Str. cremoris* вытеснять *Str. lactis* из комбинированной закваски.

М. Хитаранте (1955) удалось получить хорошую закваску, состоящую из *Str. diaceti lactis* и *Str. cremoris*, выделявшего антибиотическое вещество тина низина. Это вещество подавляло в закваске рост всех бактерий, кроме *Str. diacetilactis*. Отмечено также свойство культур *Str. diacetilactis* вырабатывать антибиотические вещества, подавляющие развитие главным образом посторонних (немолочнокислых) бактерий (Р. Радич, В. Е. Сандин, П. Р. Элликер, 1969; Е. Р. Ведамуту, Б. А. Хаузер и др., 1971), а также выявлена их способность становиться доминирующим видом в заквасках, состоящих из *Str. lactis*, *Str. cremoris* и *Str. diacetilactis*. Ц. Д. Бурроу, В. Е. Сандип и др. (1970) получены мутанты *Str. diacetilactis*, неспособные вырабатывать диацетил, но сохранившие способность подавлять микроорганизмы, вызывающие порчу пищевых продуктов. Высокая энергия кислотообразования молочнокислых палочек способствует улучшению аромата, особенно при низких рН (А. К. Максимова, 1954). Такое сочетание микроорганизмов было изучено также при производстве ацидофильной простокваши (Н. А. Бавина). Получаемый продукт имел прекрасный вкус и аромат.

И. Рашич и З. Миланович (1971) установили образование диацетила в совместной культуре *Str. diacetilactis* с закваской для йогурта при 43° С. При температуре сквашивания и созревания 30–32° С образование диацетила значительно усиливалось.

Взаимоотношения между молочнокислыми бактериями и дрожжами

Имеется немало указаний на стимулирующее действие дрожжей по отношению к молочнокислым бактериям. С. А. Королев (1932) констатировал консервирующее действие дрожжей на жидкие культуры (в молоке) молочнокислых бактерий. Молочнокислые бактерии в смешанной

культуре с дрожжами сохраняли активность в течение многих месяцев без перевивок при комнатной температуре. По наблюдениям С. А. Королева, “защитное” действие дрожжей не зависит от их способности к образованию спирта. С. А. Королев указывает на следующие теоретически возможные причины “защитного” действия дрожжей:

- изменение рН среды вследствие образования щелочных продуктов и прямого потребления кислоты;

- изменение состояния белковой части молока в результате протеолиза, который вызывают дрожжи при совместном развитии с молочнокислыми бактериями;

- выделение ферментов или витаминов.

Сообщество молочнокислых бактерий и дрожжей широко распространено в природе. Оно наблюдается не только в молочных продуктах, но и в других естественных субстратах: вине и виноматериалах (Е. И. Квасников, 1960), тесте (Г. Л. Селибер и А. Л. Бычкова, 1956), силосе (М. М. Макарова, 1962), содержимом кишечника (В. В. Леонович, М. П. Бибердиева, 1964). По данным Е. И. Квасникова, устойчивость молочнокислых бактерий к этиловому спирту – основному продукту брожения дрожжей – значительно выше, чем у самих дрожжей и большинства немолчнокислых бактерий. Некоторые молочнокислые бактерии, выделенные из вина, выдерживали содержание в среде до 20–22% спирта. Молчнокислые бактерии, выделенные из молочных продуктов, были несколько чувствительнее к спирту, но все же выдерживали достаточно высокие его концентрации – до 12–18% (Е. И. Квасников, 1960). Дрожжи в свою очередь проявляют высокую устойчивость к молочной кислоте – основному продукту жизнедеятельности молочнокислых бактерий.

Естественные закваски более устойчивы к неблагоприятным условиям, чем закваски на чистых культурах. Возможно это объясняется тем, что естественные закваски, как правило, содержат дрожжи. Примером прочных симбиотических взаимоотношений между молочнокислыми бактериями и дрожжами является кефирный грибок.

Совместно с палочками типа *Streptobacterium* дрожжи могут сохраняться в молоке продолжительное время без заметного снижения количества. То же наблюдается при совместном культивировании в молоке ацидофильных бактерий с дрожжами.

Опыты по сквашиванию молока совместными культурами стрептококков и дрожжей показали, что количество дрожжей в закваске не должно превышать 50 тыс./мл. В противном случае в закваске отмечался дрожжевой привкус, иногда – газообразование. В результате длительного совместного

культивирования с дрожжами молочнокислые бактерии нередко изменяют свои морфологические, культуральные и биохимические свойства. Так, ацидофильные палочки из S-формы переходят в R-форму. При этом повышается их энергия кислотообразования и антибиотическая активность (Н. С. Королева, 1959; М. С. Полонская и др. 1958). По данным Л. А. Банниковой (1953), при культивировании молочнокислых стрептококков с молочными дрожжами существенно изменялась биохимическая активность стрептококков, повышалась энергия кислотообразования и снижалась или утрачивалась способность к образованию ацетоина и летучих кислот. Совместное культивирование с дрожжами позволяет длительное время (до 3–6 месяцев) сохранить жизнеспособность молочнокислых бактерий. Взаимоотношения между молочнокислыми бактериями и дрожжами могут быть не только симбиотическими. Описаны случаи, когда при определенных условиях (в заквасках для хлеба и силоса) молочнокислые бактерии проникают в дрожжевые клетки и разрушают их, выступая в роли антагонистов (С. А. Ковровцева, 1937, М. М. Макарова, 1962). Е. И. Квасников (1960) установил, что молочнокислые палочки проникают в дрожжевые клетки только при сравнительно высоких рН (около 6) и в средах, на которых молочнокислые бактерии испытывают недостаток в азотном питании.

В некоторых случаях угнетающее действие на дрожжи оказывают и молочнокислые стрептококки. При культивировании закваски, состоящей из стрептококков и дрожжей, сбраживающих лактозу, последние полностью исчезали через 10 пересадок.

Подавляющее действие препарата полилактона, выделенного из молочнокислых бактерий, на дрожжи типа *Candida* установлено С. Коматсу и Т. Суяма (1969).

Взаимоотношения между молочнокислыми и уксуснокислыми бактериями

Многими исследователями отмечены симбиотические взаимоотношения между уксуснокислыми и молочнокислыми бактериями и установлена высокая протеолитическая активность симбиотических культур, а также значительное продление жизнеспособности молочнокислых бактерий в присутствии уксуснокислых. По данным М. Р. Гибшман (1952), типичные уксуснокислые бактерии (выделенные не из молочных субстратов) приспособлялись к несвойственным для них условиям среды, и постепенно приобретали новые свойства. Появилась способность использовать молочную кислоту, усиливалась способность к протеолизу казеина. Не менее

сильное влияние на молочнокислые бактерии оказывают и уксуснокислые бактерии. Л. А. Банникова (1953) установила, что при совместном культивировании *Str. diacetylactis* с уксуснокислыми бактериями повышалась энергия кислотообразования *Str. diacetylactis*, но утрачивалась способность к образованию ацетоина и снижалось образование летучих кислот.

Активирующее действие уксуснокислых бактерий на молочнокислые изучено недостаточно. Возможно, что оно связано с образованием продуктов распада белка и с витаминизацией среды, т. е. по своему характеру близко к влиянию дрожжей. Л. А. Мелузовой, Н. В. Новотельновым и Д. А. Яковлевым (1958) установлено, что уксуснокислые бактерии синтезируют рибофлавин и никотиновую кислоту. При совместном культивировании с молочнокислыми бактериями эти витамины потребляются последними почти полностью.

В. М. Богданов и И. Н. Пятницына (1959) показали, что при совместном культивировании в молоке *Str. lactis* и *Streptobacterium* с уксуснокислыми бактериями в течение 3 суток при 30° С аминного азота накапливалось в 2,5 раза больше, чем при культивировании каждой культуры молочнокислых бактерий отдельно. Использование симбиотических взаимоотношений между этими двумя группами: весьма перспективно, но возможность их применения может быть ограничена изменением вкусовых свойств продукта и его консистенции в результате жизнедеятельности уксуснокислых бактерий.

Кроме того, необходимо учитывать и возможное изменение свойств молочнокислых бактерий, особенно в отношении ароматообразования. Отмечено, что уксуснокислые бактерии, развиваясь вместе с молочнокислыми, резко снижают окислительно-восстановительный потенциал, в результате чего создаются условия, не благоприятные для образования диацетила.

Взаимоотношения между дрожжами и уксуснокислыми бактериями

Дрожжи и уксуснокислые бактерии, стимулируя развитие молочнокислых бактерий, по-видимому, безразлично относятся и друг к другу.

В кефире, приготовленном на закваске, в которую входили дрожжи и уксуснокислые бактерии, не наблюдалось накопления спирта (А. К. Максимова, Э. Е. Грудзинская, 1959). При последовательных пересадках кефирных заквасок, приготовленных на чистых культурах (В. М. Богданов, И. Н. Пятницына, 1959; А. К. Максимова и Э. Е. Грудзинская, 1959), уксуснокислые бактерии вытесняли дрожжи после четырех пересадок.

Однако известно, что при культивировании кефирных грибков уксуснокислые бактерии и дрожжи составляют обязательную микрофлору закваски и ни та, ни другая группа полностью не исчезает. Иногда крайне трудно разделить эти микроорганизмы при расसेве на плотные питательные среды с низким рН. так как они образуют одну общую колонию.

Взаимоотношения между кишечной палочкой и молочнокислыми бактериями, дрожжами, уксуснокислыми бактериями

Исследования, проведенные разными авторами, показали, что кишечная палочка может не только задерживать, но и ускорять рост молочнокислых бактерий. В свою очередь молочнокислые бактерии оказывают на кишечную палочку как угнетающее, так и стимулирующее влияние.

По данным М. С. Полонской (1953), в фильтрах культуральной жидкости *E. coli* содержатся термолабильные вещества, угнетающие молочнокислые палочки – ацидофильную и болгарскую. В то же время в фильтрах культур *Lbm. acidophilum* имеются термостабильные вещества, задерживающие развитие *E. coli*. Характер и сила воздействия фильтратов в значительной мере зависят от состава среды. Так, при разведении фильтратов ацидофильной палочки гидролизованным молоком рост *E. coli* угнетался, а при разведении МПБ наблюдалась стимуляция роста.

Установлено, что если в фильтрате культуральной жидкости ацидофильных бактерий, а также в разведениях фильтрата 1:4, 1:8 (иногда и более) кишечная палочка не росла, то при совместном культивировании этих двух микроорганизмов в молоке и в гидролизованном молоке (при равном количестве посевного материала и температуре выращивания 38–40° С) клетки кишечной палочки сохранялись в культуре после трех и четырех пассажей. По-видимому, в этом случае закономерности те же, что и при совместном развитии молочнокислых стрептококков и термоустойчивой молочнокислой палочки. Это еще раз подтверждает необходимость особой осторожности при решении вопроса о характере взаимоотношений между микроорганизмами в такой сложной среде, как молоко. Исследования К. А. Мудрецово́й-Висс и Д. В. Завьяловой (1970) показали, что при производстве творога в первые часы происходит заметное размножение кишечной палочки, затем по мере снижения рН их количество постепенно снижается. Т. С. Сухова (1972) установила, что различные виды мезофильных молочнокислых стрептококков оказывают разное влияние на кишечные палочки. Среди штаммов *Str. cremoris* обнаружены довольно сильные антагонисты по отношению к кишечным палочкам; наоборот, штаммы *Str.*

lactis оказывали как угнетающее, так и стимулирующее влияние на развитие этих микроорганизмов. В среднем при совместном развитии в молоке со *Str. cremoris* количество кишечных палочек повышалось в 10 раз (реже в 100), со *Str. lactis* – в 100 раз и более. Подавляющее действие *Str. cremoris* выявлялось только в тех случаях, когда в 1 мл молока содержалось первоначально не более 1–10 клеток кишечных палочек. При более обильном обсеменении ими молока подавления не наблюдалось.

В производстве творога на конечное содержание кишечной палочки в продукте оказывали влияние также санитарно-гигиенические условия его выработки, длительность процессов сквашивания.

Т. С. Суховой (1974) установлено также изменение культурально-биохимических свойств бактерий группы кишечной палочки под влиянием совместного развития с мезофильными молочнокислыми стрептококками. В этом отношении наиболее лабильными были цитратоположительные палочки (*Citrob. freundii*), у которых менялись такие свойства, как способность продуцировать ацетилшестилкарбинол и сероводород H_2S , характер реакции с метиловым красным, способность использовать цитрат.

При производстве кефира отмечалась обратная закономерность в изменении содержания кишечных палочек: в отдельных случаях небольшое количество их можно обнаружить в молоке в момент заквашивания, а из готового продукта их уже не удастся выделить. По наблюдениям В. И. Букановой (1952, 1955) такую резкую разницу в характере развития кишечной палочки при производстве кефира можно отчасти объяснить бактерицидными свойствами отдельных образцов кефира по отношению к кишечной палочке. В этих образцах кефира всегда обнаруживались дрожжи типа *Torulopsis kefir*, сбраживающие лактозу. В тех же образцах кефира, в которых дрожжей не было, кишечная палочка выявлялась в больших количествах.

Представляют интерес данные, полученные А. К. Максимовой и Э. Е. Грудзинской (1969), о подавляющем действии на бактерии группы кишечной палочки уксуснокислых бактерий, выделенных из кефирных грибков. Возможно, что уксуснокислые бактерии также влияют на конечный результат, связанный с антибиотическим действием кефира на кишечные палочки. Эти наблюдения позволяют сделать вывод о том, что в зависимости от условий производства количество бактерий группы кишечной палочки в кисломолочных продуктах может как резко уменьшаться, так и значительно увеличиваться.

Взаимоотношения между молочнокислыми бактериями и плесенями

Взаимоотношения, складывающиеся между молочнокислыми бактериями и плесенями (*Oidium lactis*), носят примерно такой же характер, как и взаимоотношения между молочнокислыми бактериями и дрожжами. Плесени предпочитают для своего развития низкие значения рН среды, что создается в результате жизнедеятельности молочнокислых бактерий. В то же время присутствие плесеней, вызывающих протеолиз белков молока и повышение рН, благоприятно действует на молочнокислые бактерии и продлевает их жизнеспособность при совместном длительном культивировании с этими микроорганизмами. М. Антила, В. Антила и Ж. Каукка (1966), добавляя к закваске для финского кислого молока молочную плесень и дрожжи *Candida pseudotropicalis*, добились улучшения вкуса, уменьшения отделения сыворотки и повышения количества летучих кислот в готовом продукте.

Тема 7.4. Первичная микрофлора кисломолочных продуктов.

Закваски

Закваска - основная и наиболее важная часть первичной микрофлоры кисломолочных продуктов. С внесением её молоко обогащается микроорганизмами в 10-100 раз, поэтому микробиология заквасок является одним из важнейших разделов микробиологии этих кисломолочных продуктов. От качества заквасок в значительной мере зависят весь ход процесса выработки кисломолочных продуктов и качество их.

Количество компонентов, входящих в состав микрофлоры заквасок.

В мировой практике существуют две основные тенденции установления количества компонентов, входящих в состав заквасок: составление заквасок из одного штамма и из нескольких штаммов. В СССР и в странах Западной Европы почти с самого начала применения заквасок был установлен принцип составления заквасок из двух или более штаммов – многоштаммовых. Применяя этот принцип, можно создать закваску более разностороннего качества путем введения штаммов, повышающих активность, улучшающих аромат, консистенцию продукта. Кроме того, использование нескольких штаммов одного вида должно способствовать большей устойчивости закваски к неблагоприятным условиям: если под влиянием их один-два штамма утратят свою активность, сквашивание будет осуществлено остальными штаммами. В настоящее время многоштаммовые закваски применяют при производстве сыра и масла в Англии, ФРГ и других европейских странах. При производстве йогурта применяют обычно двухштаммовые закваски. В РФ многоштаммовые закваски используют для выработки сыра, масла и кисломолочных продуктов. Применение таких заквасок затрудняется сложностью их подбора с учетом взаимоотношений и возможным изменением первоначального состава микрофлоры при их пересадках в производственных условиях.

Одноштаммовые закваски до последнего времени широко применяли в Австралии и Новой Зеландии при производстве масла и сыра (Х, Уайтхед и Г. Кокс, 1933, 1935). Преимущество этого принципа состоит в том, что штаммы могут быть тщательно изучены, подобраны к условиям производства и при подборе заквасок не требуется вносить корректировки на возможные изменения в метаболизме бактерий при совместном культивировании. Однако такие закваски имеют существенные недостатки:

- невозможно сочетать в одной культуре свойства активных кислото- и ароматообразователей;

- в случае поражения такой закваски бактериофагом происходит быстрый и полный лизис культуры, что приводит к прекращению производственного процесса.

Последнее обстоятельство заставило разработать ряд мероприятий по предотвращению развития бактериофага при данном методе. За последние годы наметилось сближение этих двух направлений – подбор заквасок из двух, максимально трех штаммов, тщательно проверенных по всем своим свойствам и способности к совместному развитию в промышленных условиях

Специфические свойства продукта. При подборе культур следует учитывать специфические свойства, которые желательно получить у готового продукта. Например, составляя закваски для творога, необходимо учесть, что микроорганизмы закваски должны активно повышать кислотность в начале цикла производства, но способность их к дальнейшему кислотообразованию должна быть ограничена. Таким требованиям удовлетворяют молочнокислые стрептококки. Однако из молочнокислых стрептококков нужно выбрать культуры, которые обладали бы хорошим вкусом и ароматом. Поэтому целесообразно наряду с культурами *Str. lactis* вводить *Str. acetiienicus* или *Str. diacetylactis*. Для продуктов, в процессе производства которых предусмотрено отделение части сыворотки от сгустка (творог и пр.), подбирают культуры, образующие сгустки, легко отделяющие сыворотку. Для продуктов, в производстве которых нужно предотвратить отделение сыворотки, рекомендуется подбирать культуры, дающие при свертывании молока сгустки сметанообразной консистенции.

С целью получения продуктов с лечебными свойствами в состав закваски вводят ацидофильные бактерии, специально подобранные дрожжи и т. д. Подобным же образом учитывают свойства культур и при подборе заквасок для других кисломолочных продуктов. На необходимость подбора культур с учетом специфических свойств продуктов указывает также М. Тепли (1972).

Температурные режимы производства. При подборе культуры следует учитывать температурные режимы того или иного технологического процесса. Если процесс осуществляется при 20–30° С, то в закваске должны преобладать мезофильные микроорганизмы, но при необходимости можно вводить и термофильные; при температурах 40–45° С нужно выбирать термофильные виды.

Взаимоотношения между культурами. При подборе заквасок в специальных лабораториях устанавливают их сочетаемость. Для этого выделенные штаммы мезофильных молочнокислых стрептококков

проверяют в первую очередь на наличие среди них антагонистов. Этот метод был разработан Т. Г. Романович (1954), в дальнейшем он был развит и усовершенствован Л. А. Банниковой с сотр. (1966). Сущность метода, разработанного Л. А. Банниковой, заключается в том, что прогретые фильтраты культуральной жидкости одного штамма (по 1 мл) вносят в 10 мл стерильного обезжиренного молока с метиленовым голубым. По разнице в скорости восстановления другим штаммом метиленового голубого в молоке с фильтратом и без фильтрата выявляют наличие антагонистического действия. При отсутствии антагонистического действия разницы в скорости восстановления не наблюдается.

В дальнейшем в соответствии с методом, разработанным Л. А. Банниковой, из отобранных культур, преобладающих в данной закваске, составляют основы, проводят их органолептическую оценку и устанавливают энергию кислотообразования. Она не должна быть ниже энергии кислотообразования самого активного штамма из входящих в основу. Затем к основе добавляют культуры стрептококков – ароматообразователей, снова проводят органолептическую оценку и устанавливают наличие аромата. Удачно подобранные закваски могут в течение ряда лет сохранять свои первоначальные свойства. Сочетаемость культур термофильных молочнокислых стрептококков и болгарской палочки выявляют путем ежедневных пересевов составленных комбинаций в течение 15 дней (Н. М. Николов, 1966, Е. В. Мельникова, 1973). Если после такого длительного культивирования в закваске сохраняются оба вида микроорганизмов, считают, что между ними сложились симбиотические взаимоотношения. На производстве поведение микроорганизмов заквасок во многом зависит от микрофлоры, содержащейся в пастеризованном молоке или сливках. В свою очередь и микробы закваски могут сильно влиять на развитие посторонней микрофлоры незаквасочного происхождения. Следовательно, изучение взаимоотношений между микрофлорой заквасок и микрофлорой пастеризованного молока представляет исключительный практический интерес, так как результаты его можно использовать при подборе культур для заквасок, а также для выбора оптимального количества вносимой закваски. Проведенные исследования показали, что при применении закваски, состоящей из *Str. lactis*, в молоке накапливаются продукты их обмена в концентрациях, стимулирующих развитие термоустойчивых молочнокислых палочек. В таких случаях целесообразно снижать количество вносимой закваски с 5 до 2–3%. Г. Паткуль и М. Бутакова (1965) отметили, что подбор заквасок по их способности подавлять постороннюю микрофлору позволяет повысить их стойкость в

производственных условиях. Впоследствии И. В. Цареградская установила возможность подбора заквасок, состоящих из антагонистов по отношению к термоустойчивым палочкам. В настоящее время подбор микрофлоры заквасок по признаку подавления термоустойчивой молочнокислой палочки введен как обязательный в практику работы специальных лабораторий. Не менее важна и способность молочнокислых бактерий противостоять влиянию на них посторонней микрофлоры. В связи с этим Г. М. Паткуль (1968) предложила проверять молочнокислые бактерии на их устойчивость к фенолу – продукту метаболизма некоторых посторонних бактерий молока. В дальнейшем И. В. Цареградская, Л. А. Банникова, установили, что, если культуры подобраны по энергии кислотообразования, сочетаемости, стойкости при пересадках, они как правило, устойчивы к фенолу в используемых дозах.

Изменчивость молочнокислых бактерий в процессе их культивирования. При культивировании молочнокислые стрептококки быстро утрачивают первоначальную активность, поэтому в лабораториях обычно проводят большую работу по их проверке и отбору наиболее стойких культур для пополнения коллекций.

Еще С. А. Королев (1932 г.) отмечал, что среди многих сотен культур молочнокислых стрептококков, находившихся под его наблюдением в течение 10 лет, ему встретились лишь несколько штаммов, не изменявших быстро своих свойств. Он считал, что на подборе таких стойких культур должна базироваться работа по составлению заквасок, хотя не исключал возможности применения наряду с ними и свежeweделенных, не проверенных на стойкость заквасок. Однако это указание часто не учитывалось микробиологами; во многих лабораториях до сих пор продолжают выделять свежие штаммы и составлять на их основе закваски, которые быстро теряют свои первоначальные свойства. Л. А. Банниковой и С. Б. Задояна (1974) проведена работа, которая позволила в значительной мере объяснить факты быстрой утраты свежeweделенными культурами своих первоначальных свойств пассажной изменчивостью этих микроорганизмов.

Культуру высевают на плотную питательную среду и выделяют в чашки 100 колоний. Все колонии проверяют на энергию кислотообразования. Если на протяжении года (особенно весной) у большинства культур, выделенных из колоний, установлена близкая по величине и значительная энергия кислотообразования, считают, что культура обладает компактной популяцией и сохранит свои свойства при пассировании. Если же среди выделенных из колоний культур обнаруживается много культур с разной

энергией кислотообразования, считают, что в исследуемой культуре большой разброс клеток по данному признаку и она может быстро утратить активность в процессе пересевов.

Проведенная работа показала также возможность направленного отбора культур для заквасок и целесообразность использования немногих хорошо изученных штаммов. Путем поддерживающего отбора (выделения наиболее активных культур после рассева) можно сохранять ценные культуры молочнокислых бактерий на протяжении длительного времени.

Микрофлора заквасок для кисломолочных продуктов

В закваски для творога входят чистые культуры мезофильных молочнокислых стрептококков (*Str. lactis*, *Str. cremoris*, *Str. acetoinicus*). Подбирают культуры, сквашивающие молоко с образованием сгустка колющейся консистенции, хорошо выделяющего сыворотку. При производстве сметаны применяют закваски, состоящие из культур *Str. lactis*, *Str. cremoris*, *Str. diacetylactis* или *Str. acetoinicus*, образующих при сквашивании молока сгустки сметанообразной

консистенции, а при производстве любительской сметаны закваску мезофильных и термофильных стрептококков, которую вносят в равных количествах.

Для приготовления простокваши обыкновенной используют закваску мезофильных молочнокислых стрептококков (*Str. lactis*, *Str. acetoinicus*) с добавлением или без добавления культур болгарской палочки; для простокваши мечниковской и южной, йогурта, напитков “Южный” и “Снежок” – культуры болгарской палочки и термофильных стрептококков или симбиотическую закваску, состоящую из этих микроорганизмов.

Для украинской простокваши (ряженки) и варенца применяют закваску термофильных молочнокислых стрептококков. При недостаточно выраженной кислотности готового продукта в закваску дополнительно можно вводить культуры болгарской палочки или применять симбиотическую закваску.

При производстве ацидофилина используют культуры мезофильных молочнокислых стрептококков, ацидофильной палочки и кефирной закваски в равных количествах. Закваска ацидофильных палочек состоит из слизистых (10–20%) и неслизистых (80–90%) культур. В зависимости от местных условий эти соотношения можно изменять. Для ацидофильной простокваши применяют чистые культуры мезофильных молочнокислых стрептококков и ацидофильной палочки.

При выработке ацидофильного молока и ацидофильной пасты в качестве закваски применяют чистые культуры ацидофильной палочки (в том числе до 20% слизистых культур к общему количеству закваски), а при производстве ацидофильно-дрожжевого молока в качестве закваски используют ацидофильную палочку и дрожжи, сбраживающие лактозу и обладающие антибиотическими свойствами. При производстве кумыса из кобыльего молока используют чистые культуры болгарской и ацидофильной палочек и дрожжи, сбраживающие и не сбраживающие лактозу. Те же культуры применяют и для кумыса из коровьего молока. Закваска для диетической простокваши состоит из культур ацидофильной палочки и молочнокислых стрептококков кишечного происхождения.

Сохранение активности заквасок в лабораторных условиях

Методы сохранения молочнокислых культур основаны на снижении скорости обмена веществ организмами и отделении клеток от продуктов их обмена. Обмен веществ микроорганизмов подавляется при снижении температуры или удалении влаги. При использовании этих методов для улучшения сохранения культур добавляют лактозу, сухое молоко и пр. Неблагоприятное действие кислоты снижают, добавляя буфер, например мел, и другие соединения. Клетки от продуктов обмена отделяют центрифугированием и в дальнейшем их помещают в питательную среду, содержащую защитные вещества. Практически методы, основанные на этих двух принципах, комбинируют. Например, после выращивания клетки отделяют от культуральной среды, распределяют их в новой среде и затем высушивают. В настоящее время чистые культуры и закваски молочнокислых бактерий сохраняют в жидком, высушенном и замороженном состоянии.

Жидкие культуры и закваски. Одним из наиболее старых способов сохранения чистых культур молочнокислых бактерий является поддержание их жизнеспособности путем периодических пересевов в стерильном молоке или других питательных средах. После внесения культуры в молоко (в пробирках) его выдерживают при температуре, оптимальной для развития данного вида микроорганизмов, и по окончании свертывания молока сохраняют до следующей перевивки. Частота пересевов зависит главным образом от температуры, при которой хранят культуры между пересевами. Если культуры после свертывания молока хранят при комнатной температуре, пересевать их в свежее молоко нужно не реже, чем через 5–7 дней (С. А. Королев, 1932, А. М. Скородумова, 1963). Если культуры хранят в холодильнике при 3–4° С, то их можно пересевать значительно реже:

культуры мезофильных молочнокислых стрептококков и молочнокислых палочек – через 15–20 дней, термофильных стрептококков – через 20–30 дней.

Как правило, в процессе хранения в результате отмирания части клеток активность заквасок снижается, поэтому для восстановления первоначальной активности культур перед употреблением рекомендуется пересевать их в свежее молоко.

Для сохранения активности культур большое значение имеет своевременное прекращение жизнедеятельности микроорганизмов после сквашивания молока. Если культуры сразу после свертывания молока поместить в холодильник, то их первоначальная активность сохраняется, по крайней мере, в течение 8 дней. В то же время культуры, которые выдерживали в термостате после образования сгустка для дальнейшего созревания, часто оказывались неактивными уже через 3–4 дня хранения при 4–5° С (Е. М. Фостер, 1962). Некоторые авторы рекомендуют направлять культуры на холодильное хранение до образования сгустка (Б. Рийтер и А. Моллер-Мадсен, 1963). Добавляя к молоку мел, иногда можно сохранить культуры до 3–5 месяцев. Х. Ц. Ольсену (1959) удалось сохранять удовлетворительную активность молочнокислых бактерий при 7,5–10° С в течение 8 месяцев в молоке, содержавшем 20% глицерина, 3% поваренной соли и 30% сахарозы.

Чтобы снизить влияние качества и состава молока на молочнокислые бактерии и предотвратить изменение их свойств, за границей (США и пр.) используют среды более постоянного состава: молоко, восстановленное из сухого обезжиренного или цельного молока одной проверенной партии или молоко от коров одной фермы. Сборное молоко считается лучшим, чем молоко от одного животного, так как средний химический состав его более постоянный. Однако даже в средах с постоянным составом желательно максимальное сокращение числа пересадок культур для сохранения их первоначальных свойств.

Культуры и закваски в высушенном состоянии. Культуры молочнокислых бактерий сушат сублимацией, закваски смешиванием с крахмалом, методами распыления и сублимации (лиофлизации).

Метод смешивания с крахмалом. Сущность метода заключается в высушивании заквасок путем смешивания с предварительно высушенным крахмалом. В дальнейшем он был усовершенствован предложено высушивать закваски, смешанные с крахмалом, в вытяжном сушильном шкафу током нагретого воздуха при температуре не выше 40° С. В процессе

сушки заквасок этим методом погибает значительная часть микрофлоры и изменяются свойства микроорганизмов, входящих в состав закваски.

Метод распыления. Сущность его состоит в том, что в стерильное обезжиренное молоко с повышенным (до 16%) содержанием сухих веществ (перед стерилизацией в него добавляют сухое обезжиренное молоко) вносят 1% закваски молочнокислых бактерий. Заквашенное молоко выдерживают при температуре, оптимальной для развития данных микроорганизмов, и нейтрализуют 10%-ным раствором едкого натра до кислотности исходного стерильного молока. Нейтрализованную закваску высушивают на распылительной сушилке при температуре поступающего воздуха не выше 130° С и в зоне распыления – не выше 50° С. Сухие культуры смешивают с сухим стерильным крахмалом в пропорции 1 : 1. Закваска, полученная этим методом, при влажности не выше 4–5% может сохранять достаточно высокую активность 3 мес. и более.

Метод получения сухих заквасок из бактериального концентрата. По этому методу микроорганизмы закваски выращивают в жидкой питательной среде, основа которой состоит из сыворотки и гидролизованного молока. Для стимуляции роста молочнокислых стрептококков рекомендуется применять трехзамещенный лимоннокислый натрий и сернокислый марганец, а для стимуляции роста молочнокислых палочек – дрожжевой автолизах и смесь буферных солей.

После выращивания на этой среде клетки бактерий отделяют от культуральной жидкости центрифугированием. Полученную биомассу разводят в стерильном обезжиренном молоке, содержащем 16% сухих веществ, и высушивают на распылительной сушилке. В сухой закваске, приготовленной этим методом, после хранения на холоде в течение 6 месяцев содержатся миллиарды клеток в 1 г. При высушивании бактериального концентрата путем смешивания с крахмалом методом распыления, где часть операций производится открыто, невозможно получить абсолютно чистую культуру. Кроме того, при высушивании закваски, состоящей из разных штаммов микроорганизмов, последние по-разному реагируют на неблагоприятные условия сушки. В результате этого трудно сохранять нужные соотношения между отдельными компонентами микрофлоры. Метод сублимации. Сущность метода состоит в высушивании бактериальных клеток, находящихся в замороженном состоянии, при высоком вакууме.

В последние годы проведена работа по подбору оптимальных условий приготовления заквасок, высушенных сублимацией из бактериального концентрата. Полученный концентрат, смешанный с

защитной средой, фасуют во флаконы и высушивают при строго определенных режимах, после чего флаконы укупоривают. Подобраны условия выращивания и сушки заквасок разного видового состава микрофлоры. Выявлены основные факторы, влияющие на жизнеспособность заквасок, высушенных методом сублимации: состав среды и условия накопления клеток, способ их отделения, состав защитной среды, температура и длительность высушивания, конечная влажность (И. В. Лагода, Л. А. Банникова, 1970). Разработан метод прогноза стойкости сухой закваски путем прогрева ее сразу после выработки при 80° С в течение 30 мин. Установлено, что, если в закваске после термостатирования остается 27–38% живых клеток, она будет стойкой при хранении в течение 4–5 мес.

Исследования показали, что закваски, высушенные сублимацией, содержат 3–5 млрд. клеток в порции (0,1 г.). Применение их позволяет получать абсолютно чистую в микробиологическом отношении закваску при оживлении ее в стерилизованном молоке. В процессе хранения на холоду она полностью сохраняет свою жизнеспособность и соотношение компонентов микрофлоры в течение 4–5 мес.

Этим методом сушат также коллекционные культуры, которые можно использовать в течение ряда лет. По данным разных исследователей, выживаемость клеток составляет 40–80%, а иногда и 90% (в зависимости от индивидуальных свойств культуры и условий высушивания). Высушенные штаммы следует хранить при температуре не выше 10° С.

Культуры и закваски в замороженном состоянии. С целью полного прекращения жизнедеятельности микроорганизмов, максимального сокращения числа пересадок культур при хранении применяют быстрое замораживание их при низких температурах (–18-г–25°С). В замороженных культурах удается получать от 75 до 90% живых

клеток от первоначального количества (Э. М. Фостер и др., 1962). Эти колебания зависят прежде всего от условий замораживания, а также от возраста культур, подвергавшихся замораживанию, и рН среды. Максимальную активность культур после дефростации удавалось получить, если их замораживали в логарифмической или в начале стационарной фазы роста. Нейтрализация культуры перед замораживанием или отделение клеток от культуральной среды с последующим внесением их в молоко с рН 7 также позволяет повысить активность замороженных культур.

Коллекционные культуры можно сохранять длительное время без перевивок в замороженном состоянии при температуре –25°С. По данным Л. А. Банниковой (19536), ароматообразующие молочнокислые стрептококки в течение 6 мес выдержки при –25° С сохраняли свои свойства – способность к

кислотообразованию, накоплению летучих кислот, ацетоина, диацетила. После размораживания культуры несколько дольше свертывали молоко, но полностью восстанавливали активность уже после первой пересадки в молоко, ацидофильные культуры сохраняют антибиотическую активность в течение длительного времени при -25°C с пересевами и последующим замораживанием через 6 мес. Имеются сообщения о возможности сохранения замороженных при -30°C культур в достаточно жизнеспособном состоянии в течение ряда лет (Э. М. Фостер, 1962; Е. Воле, Дж. Моко, 1967 и др.). За последние годы в разных странах проведены исследования по получению бактериальных концентратов, замороженных в жидком азоте. В таких концентратах обычно хорошо сохраняется микробиологический состав заквасок. Они предназначены не для длительного хранения, а для непосредственного использования в производстве.

Составление и сохранение коллекций чистых культур и заквасок

Исключительно кропотливая и трудоемкая работа по выделению, изучению чистых культур и подбору заквасок молочнокислых бактерий может оказаться малоэффективной, если не будут приняты меры по длительному сохранению их. Во многих странах (США, Англия) для этой цели созданы национальные коллекции. В нашей стране в Институте микробиологии АН СССР создана общесоюзная коллекция (для всех микроорганизмов), во ВНИМИ – отраслевая (для кисломолочных продуктов) коллекция молочнокислых бактерий и микроорганизмов – вредителей молочного производства. Коллекция предназначена для снабжения культурами специальных лабораторий, выпускающих закваски для цельномолочной промышленности и научно-исследовательских учреждений.

Схему работы с заквасками на производстве

Схему работы с заквасками на чистых культурах, применяемую в производственных условиях, можно представить следующим образом.

Чистые культуры (жидкие, сухие закваски, получаемые в готовом виде из специальных лабораторий)

Лабораторная закваска (приготавливаемая в лаборатории на стерилизованном молоке)

Первичная производственная (на пастеризованном молоке, непосредственное использование в производстве).

В специальных лабораториях из чистых культур готовят сухие или жидкие закваски, которые можно классифицировать как чистые культуры. Закваски, полученные из лаборатории в сухом виде, хранят в холодильнике. По мере необходимости их оживляют и в дальнейшем поддерживают так же, как и жидкие, перевивая в пробирки со стерилизованным молоком через 10–15 дней и храня между перевивками в холодильнике. Чистые культуры используют для приготовления лабораторной закваски на стерилизованном или кипяченом (если отсутствует автоклав) молоке.

Все виды лабораторной закваски используют для приготовления первичной производственной закваски на пастеризованном молоке или, где это возможно, на стерилизованном. Кроме того, лабораторную закваску, приготовленную на активных чистых культурах, применяют непосредственно для заквашивания молока или сливок при производстве кисломолочных продуктов.

Первичную закваску для выработки продуктов используют непосредственно в производстве. На производстве не рекомендуется проводить последующие пересадки закваски, так как это приводит к загрязнению закваски и снижению ее активности. Все закваски оживляют в стерильном молоке, а затем ежедневно для приготовления лабораторной закваски в бутылочках используют разные партии.

Лаборатория чистых культур ВНИИМСа рекомендует схему использования сухих заквасок для сыров с низкой температурой второго нагревания и для мягких сыров, исключая многократные пересадки. В Польше эта схема разработана и принята также для сыроделия (Б. Хабай, Т. Рапшинский и др., 1966). В соответствии с этой схемой сухую закваску из одной пробирки вносят примерно равными порциями в 7 бутылок или колб со стерилизованным либо пастеризованным молоком, получая лабораторную (по терминологии ВНИИМСа – первичную) закваску. После свертывания закваску хранят при 5–8° С и ежедневно в течение 7 дней используют для приготовления первичной производственной (по терминологии ВНИИМСа – вторичной) закваски 1 бутылку. В день использования последней бутылки вновь готовят 7 бутылок со стерильным молоком и заквашивают их сухой культурой обязательно другой даты изготовления. Этот способ приготовления закваски принято называть трехрядным.. Применение его на сыродельных заводах способствует получению более чистой в микробиологическом отношении закваски и предупреждает развитие на производстве бактериофага, так как при этом исключается длительное пассирование закваски в производственных условиях.

Трехрядный способ можно рекомендовать и для производства кисломолочных продуктов (главным образом творога) в тех случаях, когда трудно поддерживать лабораторные закваски на стерильном молоке в пробирках.

Приготовление лабораторной закваски

Для приготовления лабораторных заквасок желательно использовать обезжиренное молоко с содержанием сомо не ниже 8%, чистым вкусом, кислотностью не выше 19–20° Т. Емкости для закваски должны быть тщательно вымыты и высушены. Молоко разливают в бутылки емкостью 1 л и укупоривают ватными пробками или специальными колпачками. При изготовлении большого количества закваски удобно пользоваться алюминиевыми бидонами емкостью 10 л.

Стерилизуют молоко при 120° С в течение 15–20 мин. Стерилизованное охлажденное молоко заквашивают рабочими культурами, строго соблюдая условия асептики.

При использовании сухих заквасок, высушенных способом сублимации, край флакона обжигают на пламени горелки, вливают во флакон 5–7 мл стерильного молока и после растворения закваски все содержимое флакона выливают в 2 л стерилизованного молока. При использовании жидких заквасок количество вносимой закваски рассчитывают в зависимости от времени, которое необходимо для получения готовой закваски. Если молоко заквашивают вечером, в конце рабочего дня, а закваска должна быть готова утром, то достаточно вносить 0,1% закваски.

Заквашенное молоко выдерживают при температуре, оптимальной для развития входящих в нее микроорганизмов, а в случае применения комбинированной закваски, состоящей из микроорганизмов с разным температурным оптимумом, – при температуре, обеспечивающей сохранение нужного соотношения между микроорганизмами. Закваску для творога готовят при температуре 26–30° С, для сметаны – при 24–26° С, обыкновенной простокваши – 30–35°, ацидофильно-дрожжевого молока – 25–30° С, закваску болгарской палочки и термофильного стрептококка – при 40–45° С, ацидофильной палочки – 38–40°.

До использования готовую закваску хранят в холодильнике или холодильной камере. Лабораторная закваска представляет собой чистую культуру или смесь чистых культур микроорганизмов. Следует отметить, что при производстве заквасок на стерильном молоке в лабораторных условиях часто образуются дряблые неустойчивые сгустки. В то же время эта закваска, внесенная в пастеризованное молоко, дает хорошие, плотные сгустки.

Поэтому не следует отбраковывать закваску на стерильном молоке из-за недостаточно плотного сгустка, если при испытании культур в пробных стаканах на пастеризованном молоке они давали удовлетворительные сгустки.

Процесс приготовления симбиотических заквасок, состоящих из термофильных стрептококков и болгарской палочки, закваски для кумыса и ацидофильно-дрожжевого молока имеет специфические особенности.

Приготовление симбиотической закваски. Симбиотическую закваску после оживления ее из сухой культивируют следующим образом. В стерилизованное молоко при температуре 43–45° С вносят стерильной пипеткой 1% симбиотической закваски. Молоко сквашивают при 43° С, сгусток образуется через 2 ч 30 мин. – 2 ч 50 мин. Сразу после образования сгустка закваску вынимают из термостата и просматривают микроскопический препарат. В поле зрения микроскопа должно обнаруживаться большое количество стрептококков и 5–10 палочек в закваске для ряженки, простокваши, варенца, 10–15 палочек – в закваске для йогурта.

Если в микроскопическом препарате обнаруживается палочек больше, чем требуется, то количество вносимой закваски при последующем пересеве снижают до 0,5–0,7%. Если количество их недостаточно, то дозу закваски увеличивают до 1,2–1,5%. Готовую закваску хранят при 3–5° С, пересевают 1 раз в неделю. Оставшуюся закваску используют для приготовления необходимого количества рабочей лабораторной закваски, которую готовят ежедневно, как указано выше. Наиболее распространенный порок, возникающий при культивировании симбиотической закваски в производственных условиях, – вытеснение стрептококков палочками и как следствие этого – потеря заквасочной активности. Это происходит потому, что на практике все лабораторные закваски готовят в течение ночи, так же поступают и с симбиотической закваской, у которой сгусток образуется очень быстро – за 2,5 ч. В результате длительной выдержки в закваске повышается кислотность и стрептококки отмирают. При таких условиях в результате двух-трех пересевов закваска становится непригодной для дальнейшего использования.

В случае необходимости из лабораторной закваски готовят производственную. Молоко пастеризуют при 92–95° С с выдержкой 20–30 мин, охлаждают до 43–45° С, вносят в него 1% лабораторной закваски и тщательно перемешивают. Сгусток образуется через 2 ч 30 мин – 2 ч 50 мин, и его сразу начинают охлаждать при перемешивании, которое производят в течение первых двух часов 3–4 раза через 15–20 мин. Кислотность готовой

закваски должна быть 80–85° Т, микроскопический препарат должен быть такой же, как и у лабораторной закваски для соответствующих продуктов..

Приготовление закваски для кумыса из коровьего молока. Технология приготовления закваски разработана Л. А. Банниковой с сотр. (1970). Закваску можно готовить из отдельных штаммов в соответствии с требуемым составом микрофлоры или из жидкой симбиотической закваски, получаемой из лаборатории. Жидкую симбиотическую закваску, состоящую из специально подобранных штаммов молочнокислых палочек и дрожжей, освежают путем пересадки в стерильное обезжиренное молоко, подогретое до 37°С, внося ее в количестве 5%. Молоко перемешивают и термостатируют при 37° С, где оно сквашивается в течение 12–16 ч. Во время сквашивания сразу после образования сгустка закваску несколько раз перемешивают. После сквашивания закваску выдерживают 4–6 ч при 18–20° С для накопления дрожжей, а затем не менее суток в холодильнике, где хранят до следующей пересадки. Вторичную и последующие лабораторные закваски готовят на стерильном обезжиренном молоке при температуре 26–28° С, внося в него 5–7% закваски. Пересадки лабораторной закваски производят через день не более 10 раз.

Производственную закваску готовят на обезжиренном молоке, пастеризованном при 92–95° С с выдержкой 20 мин и охлажденном до 26–28° С, внося в него 5–7% лабораторной закваски. Молоко перемешивают и оставляют на 6–7 ч при 26–28° С до образования сгустка кислотностью 85–90° Т. Закваску перемешивают 10–15 мин и выдерживают для развития дрожжей и нарастания кислотности до 110–115° Т (примерно 3ч). За это время ее перемешивают не менее 10 раз по 5 мин, после чего готовую закваску охлаждают. В поле зрения микроскопа при микроскопировании препаратов закваски должно обнаруживаться от 3 до 25 клеток дрожжей при большом количестве незернистых темноокрашенных палочек. При приготовлении закваски для кумыса особенно большое значение имеет ее перемешивание, цель которого интенсифицировать развитие дрожжей.

Приготовление закваски для ацидофильно-дрожжевого молока. Для приготовления лабораторной закваски в 0,5 л стерильного обезжиренного молока при температуре 37–40° С вносят 10 мл свежеприготовленной чистой культуры ацидофильной палочки и 10–15 мл смыва специально подобранных дрожжей, выращенных на картофельно-лактозном агаре при 25–30° С в течение 2–3 дней (до появления на поверхности агара обильного роста дрожжей). Заквашенное молоко выдерживают при 30–32° С до образования сгустка, который появляется через 12 ч. Полученную закваску выдерживают при комнатной температуре 12–24 ч, периодически ее

перемешивая для накопления дрожжей, а затем охлаждают до 3–5° С и хранят при этой температуре до употребления. Производственную закваску готовят на обезжиренном молоке, пастеризованном при 92–95° С с выдержкой 20–30 мин и охлажденном до 37–40°С. В молоко вносят 2–3% лабораторной закваски, перемешивают и в течение 10–12 ч сквашивают при 30–32° С. Далее поступают так же, как при приготовлении лабораторной закваски.

Приготовление производственной закваски

Для приготовления производственной закваски применяют пастеризованное молоко, хотя, как показывает практика, при использовании стерилизованного молока получается закваска более активная и чистая в микробиологическом отношении.

Производственную закваску готовят чаще всего или в ваннах длительной пастеризации (ВДП) или в специальных заквасочниках. Ванны целесообразно наполнять молоком через нижний штуцер. При этом исключается возможность попадания сырого молока. Сырое молоко может также попасть в пастеризованное из трубопроводов через нижний штуцер при недостаточно хорошо притертых кранах. Во избежание этого после наполнения молоком ванну отключают от общего трубопровода. Молоко нагревают при перемешивании до 92–95° С, после чего отмечают начало пастеризации и выдерживают его при этой температуре 20–30 мин.

По окончании пастеризации молоко охлаждают до температуры, оптимальной для развития микроорганизмов, входящих в состав закваски, и, соблюдая строжайшую чистоту (проносят край бутылки с чистой культурой над пламенем горелки или обтирают его спиртом), вносят в него лабораторную закваску. Количество закваски устанавливают в зависимости от условий производства. При внесении 5% закваски для творога сквашивание происходит в течение 5–6 ч, при внесении 1% образование сгустка длится примерно 8–10 ч. После внесения закваски молоко тщательно перемешивают и оставляют до образования сгустка. В процессе сквашивания молока необходимо поддерживать температуру, оптимальную для развития микроорганизмов данной закваски. После образования сгустка закваску охлаждают. Все операции – пастеризацию, охлаждение, заквашивание, сквашивание – производят в одной емкости. Переливание в другие емкости не допускается.

В отличие от лабораторной производственную закваску нельзя рассматривать как чистую культуру бактерий. При всей тщательности проведения пастеризации в молоке неизбежно остаются споры, которые

погибают лишь при температуре выше 100° С, а при малейшем нарушении режима пастеризации в нем остаются термоустойчивые молочнокислые бактерии. Если споровые микроорганизмы не представляют опасности и, по существу, не развиваются на фоне бурного молочнокислого процесса, происходящего при сквашивании, то молочнокислые палочки, содержащиеся в молоке даже в незначительном количестве (1 –10 клеток в 1 мл), могут отрицательно влиять на качество закваски. Поэтому закваску необходимо контролировать очень тщательно. Периодически следует проверять эффективность пастеризации молока и чистоту закваски.

Повышение активности заквасок

Имеются три основных пути повышения активности заквасок: добавление специальных веществ, стимулирующих биохимическую активность обычных, рядовых культур; получение культур, обладающих повышенной биохимической активностью; повышение микробиологической чистоты и активности заквасок совершенствованием методов их культивирования на производстве. Некоторые исследователи (М. Л. Спекк, 1962 и др.) рекомендуют молоко, предназначенное для культивирования молочнокислых бактерий, обогащать различными экстрактами растительных и животных тканей, а также гидролизатами белков. Действительно, содержащиеся в этих субстратах витамины, комплекс аминокислот и пептидов значительно повышают жизнеспособность и энергию кислотообразования молочнокислых бактерий. Однако при решении вопроса о применении добавок необходимо учитывать следующее обстоятельство. Если культуры, адаптированные к развитию в молоке, содержащем активаторы, перенести в сравнительно неблагоприятные условия, то они будут развиваться хуже, чем культуры, выращиваемые на средах без веществ-активаторов. Делаются попытки использовать вещества-активаторы непосредственно в производственных условиях. В качестве активатора применяют экстракт панкреатиновой железы в количестве 0,2%. Продолжительность сквашивания и получения готового сыра коттедж значительно сокращалась (примерно на 10%), если к молоку добавляли экстракт панкреатиновой железы (М. Л. Спекк и др. 1958).

Аналогичное действие оказывает введение в молоко одновременно с закваской небольших доз сычужного фермента.

В ЧР (Б. Гилмар, М. Тепли, 1969) разработана рецептура специальных активаторов, в состав которых входят на 500 мл дистиллированной воды: дрожжевой экстракт (10 г), кислый гидролизат казеина (15 г), энзиматический гидролизат казеина (15 г), пептон (15 г), вытяжка из

телячьего мяса (150 мл), вытяжка из телячьего сердца (150 мл), вытяжка из панкреатиновой железы (150 г), 85%-ная молочная кислота (20 мл).

Перспективно использовать в качестве активаторов молочнокислых бактерий микробов-симбионтов – дрожжей, уксуснокислых бактерий и пр. В этих случаях характер активизации несколько иной. Добавляя вещества-активаторы, вносят в среду сразу значительную их дозу. Микробы-симбионты вырабатывают те же самые вещества, но в небольшом количестве и равномерно. При этом эффект получается разный: в первом случае активность микроорганизмов резко повышается, но в отсутствие веществ-активаторов также резко падает; во втором случае активность возрастает не столь интенсивно, но проявляется в присутствии симбионтов постоянно, а иногда сохраняется и в чистой культуре после разделения с микробом-симбионтом.

В качестве примера можно привести данные, полученные при исследовании микрофлоры кефирных грибков. Установлено, что в этих грибах преобладают ароматообразующие стрептококки, которые в чистой культуре свертывают молоко медленно. Однако в присутствии дрожжей и уксуснокислых бактерий эти малоактивные бактерии прекрасно развиваются.

Известно, что кефирная закваска значительно реже теряет свою активность, чем закваска, приготовленная на чистых культурах молочнокислого стрептококка.

Улучшить качество и повысить активность закваски можно, сократив число пересадок закваски на производстве. При пересадках активность закваски снижается главным образом в результате развития в ней бактериофага. Это в свою очередь приводит к постепенному увеличению количества микроорганизмов незаквасочного происхождения – остаточной микрофлоры пастеризованного молока (преимущественно термоустойчивых молочнокислых палочек). Массовые исследования заквасок для творога и сметаны на Останкинском молочном комбинате показали, что в первичной производственной закваске термоустойчивые молочнокислые палочки сохранились исключительно редко (примерно в 1–2% закваски). При исследовании вторичной производственной закваски было установлено, что в 50% ее содержалось более 25000 клеток палочек в 1 мл и в 25% – менее 25000 в 1 мл. Палочки в количестве менее чем десятки тысяч в 1 мл уже нельзя обнаружить микроскопированием закваски, поэтому такая закваска обычно выпускается лабораторией в производство. Использование первичной производственной закваски, а там, где это позволяют условия (оснащенность лаборатории, объем производства и т. д.), и лабораторной значительно повышает их микробиологическую чистоту, активность и

исключает обсеменение молока с закваской термоустойчивыми молочнокислыми палочками.

В последние годы за рубежом при производстве сыра непосредственно в сырную ванну вносят сухие сублимированные или замороженные концентраты, что позволяет исключить процесс приготовления закваски (При этом исключается обсеменение заквасок в процессе пересадок в производственных условиях и повышается качество продукции). Однако широкое использование их затрудняется необходимостью транспортирования заквасок в специальных контейнерах, сохраняющих низкую температуру. Установлено, что замороженные культуры можно использовать и для непосредственного заквашивания молока при производстве кисломолочных продуктов – сквашенной пахты и сыра коттедж.

Источники первичной микрофлоры незаквасочного происхождения

Молоко (или сливки). Микрофлора молока (или сливок) состоит из остаточной микрофлоры после пастеризации и микрофлоры, попадающей в молоко или сливки при прохождении через оборудование. Естественно, что чем эффективнее режим пастеризации и чем ограниченнее контакт пастеризованного молока после пастеризации с оборудованием, тем меньше в нем микроорганизмов незаквасочного происхождения. Поэтому при производстве заквасок применяют пастеризацию при 90–95° С и длительную выдержку (10–30 мин) при этих температурах. При этом все операции выполняют в той же емкости, в которой проводили пастеризацию. В пастеризованном молоке, попадающем в емкости для заквашивания и сквашивания кисломолочных продуктов, могут содержаться десятки, сотни тысяч клеток в 1 мл.

Оборудование. При недостаточно тщательной мойке и дезинфекции оборудования в 1 мл смыва со 100 см² содержится до 1–50 тыс. клеток микроорганизмов. В 1 мл смыва со 100 см² поверхности чисто вымытого оборудования обнаруживаются единицы и десятки клеток. Микрофлора, обнаруживаемая на оборудовании, по составу более разнообразна, чем остаточная микрофлора пастеризованного молока. Она может состоять из представителей остаточной микрофлоры пастеризованного молока (термоустойчивых молочнокислых палочек, стрептококков кишечного происхождения и термофильных), микроорганизмов закваски (*Str. lactis*, молочнокислые палочки и дрожжи) и бактерий группы кишечной палочки (в случае недостаточно тщательной санитарной обработки оборудования). Все

эти микроорганизмы не только остаются на оборудовании, но и при наличии на нем минимального количества молока или воды активно развиваются. По наблюдениям Б. Л. Беловицкой, основным источником обсеменения молока термоустойчивыми молочнокислыми палочками при прохождении его через оборудование является молочный камень. С целью дезинфекции оборудование чаще всего обрабатывают водным раствором хлорной извести с содержанием активного хлора 200 мг/л. Установлено, что термоустойчивые молочнокислые палочки выдерживают концентрацию активного хлора до 300 мг/л и, следовательно, не уничтожаются при хлорировании оборудования. Эффективным способом уничтожения бактерий группы кишечной палочки и резкого снижения общего количества бактерий является стерилизация труб в специальных стерилизаторах или пропаривание. Практика показывает, что применяемые методы санитарной обработки оборудования не всегда достаточно эффективны. При подборе моющедезинфицирующих средств необходимо учитывать воздействие их не только на бактерии группы кишечной палочки, но и на технически важную микрофлору – термоустойчивые молочнокислые палочки и другие микроорганизмы, значительно более устойчивые к неблагоприятным воздействиям, чем кишечная палочка.

Вода. По микробиологическим показателям вода должна удовлетворять следующим требованиям: в 1 мл должно содержаться не более 100 бактерий. Титр кишечной палочки должен быть не менее 300 мл. Как правило, вода удовлетворяет этим требованиям. Однако возможны случаи, когда она становится источником обсеменения оборудования и продукции такими группами микроорганизмов, как *E. coli*, а иногда и более опасными представителями кишечной микрофлоры. Это может быть при недостаточно хорошо продуманном монтаже водопроводной сети на предприятии, когда вода из бойлера (обычно менее чистая) смешивается с холодной, поступающей непосредственно из водопроводной сети или артезианской скважины.

Наполнители. С наполнителями (сахаром изюмом, цукатами) в кисломолочные продукты попадают дрожжи и плесени. Кроме того, они могут служить источником обсеменения продуктов споровой микрофлорой и бактериями группы кишечной палочки.

Тара и упаковочные материалы. При недостаточно тщательной мойке и дезинфекции тара, например деревянные кадки для творога и сметаны, могут служить довольно обильным источником обсеменения микрофлорой, особенно дрожжами. Упаковочные материалы (пергамент, парафинированный картон, фольга и пр.) также могут служить источником

обсеменения продукции плесенью, споровыми бактериями, если эти материалы хранят в неподходящих условиях. В случаях несоблюдения режимов мойки (температуры и концентрации моюще-дезинфицирующих растворов, длительности обработки) бутылки также могут содержать значительное количество микроорганизмов, обсеменяющих в дальнейшем продукт.

Воздух. Из всей микрофлоры воздуха практическое значение в обсеменении продукции могут иметь бактериофаг и молочная плесень. При производстве стерилизованного молока роль воздуха может быть весьма ощутимой, так как попадание в пакет даже одной клетки микроорганизма может вызвать порчу продукта. Для стерилизации воздуха в особо ответственных производственных помещениях (в заквасочных отделениях целесообразно применять бактерицидные лампы БУВ-1,5 и БУВ-3 (цифра показывает радиус в метрах, на который распространяется бактерицидное действие).

Тема 7.5. Вещества, необходимые для развития молочнокислых бактерий

Из всех представителей микрофлоры молока и молочных продуктов молочнокислые бактерии проявляют наиболее высокую требовательность к наличию отдельных веществ для питания, особенно к ее белковому и аминокислотному, а также витаминному составу. Так как молочнокислое брожение является ведущим при производстве кисломолочных продуктов, то основное внимание должно быть уделено удовлетворению потребностей в питании именно молочнокислых бактерий.

Азотистые соединения и витамины

В молоке азотистые соединения представлены белками – казеином (около 85% от общего количества белков), лактоальбумином (до 13%) и лактоглобулином (около 2%), а также липопротеином оболочек жировых шариков (небольшое количество). Из небелковых азотистых соединений в молоке содержатся мочевина, креатин, креатинин, мочевая кислота, пуриновые основания, аммиак, гиппуровая кислота, аминокислоты и пептоны. Количество небелкового азота в молоке составляет около 0,05% (Г. С. Инихов, 1970). Содержание свободных аминокислот в молоке незначительно – от 0,5 до 2 мг%. Различные исследователи обнаруживали в нем аргинин, гистидин, лизин, лейцин, изолейцин, валин, глицин, аланин, глютаминовую кислоту, пролин, треонин, аспарагиновую кислоту, серии. Последние две аминокислоты присутствуют в очень небольшом количестве (Л. Дейч и Е. Самуэльсон, 1959; Р. Дж. Блок, 1951). Исследования Э. Е. Грудзинской и Н. С. Королевой (1970) также показали наличие в молоке метионина и тирозина. Р. Дж. Блоком (1951) и В. Ц. Зантом и Ф. Е. Нельсоном (19536) в безбелковой фракции обезжиренного молока обнаружены три пептида. Азотистые соединения молока служат источником питания микроорганизмов. Возможность и интенсивность развития молочнокислых бактерий зависят прежде всего от их потребностей в тех или иных источниках питания, наличия нужных веществ в молоке в свободном виде и имеющегося набора ферментов для разложения и усвоения этих веществ. Чем более выражена способность микроорганизмов к протеолизу, тем меньше влияют на микроорганизмы различные колебания в составе молока.

Требования, предъявляемые молочнокислыми бактериями к азотистому составу среды, были впервые исследованы С. Орла-Йенсенем с сотрудниками (1936). Им была установлена потребность молочнокислых

бактерий в отдельных аминокислотах и стимуляция их роста при добавлении различных естественных экстрактов (дрожжевого автолизата, печеночного экстракта и пр.). Он отметил, что потребность в дополнительных источниках азотного питания у термобактерий выше, чем у стрептобактерий и стрептококков. В зависимости от потребности в различных источниках азота С. Орла-Йенсен разделил молочнокислые бактерии на три группы:

бактерии, нуждающиеся в сложном комплексе аминокислот и витаминов (род *Thermobacterium*); бактерии, хорошо развивающиеся на цистеине и на аммонийных солях (род *Streptobacterium*); бактерии, которые могут развиваться на аммонийных солях в качестве единственного источника азота (род *Streptococcus*).

Пептоны. Добавление пептонов к молоку и молочной сыворотке усиливает рост многих штаммов молочнокислых стрептококков (*Str. lactis* и *Str. cremoris*) и некоторых палочек (Х. Уолкер, 1957). Пептоны используются молочнокислыми бактериями (Т. Дульман, 1937, 1939), однако на средах, содержащих в качестве единственного источника азота пептон, большинство молочнокислых бактерий, особенно палочек, не дает максимального роста (С. А. Королев, 1932, А. М. Скородумова, 1962).

Пептиды. Установлено, что некоторые пептиды способствуют росту молочнокислых бактерий в значительно большей степени, чем эквивалентные количества аминокислот, входящих в их состав. В то время как структурно-близкие аминокислоты могли оказывать угнетающее воздействие, если количество их в среде не было строго сбалансировано, с пептидами такого явления не наблюдалось (Б. Рийтер и А. Моллер-Мадсен, 1963). Очищенные пептиды оказывают заметное стимулирующее действие на *Str. lactis*, *Str. cremoris*, *Lbm. casei*.

По-видимому, стимулирующий эффект ферментативных гидролизатов казеина можно **Аминокислоты.** А. В. Андерсон и Р. П. Элликер (1953), изучая потребности молочнокислых бактерий в отдельных аминокислотах, показали, что большинству из них для максимального роста требовалось, по крайней мере, 16 аминокислот. По данным этих авторов, а также Б. Рийтера и Дж. Орам (1962), для *Str. lactis* и *Str. cremoris* необходимы пролин, глютамин и глютаминовая кислота, валин, метионин, лейцин, изолейцин, гистидин. Кроме того, для развития *Str. cremoris* требовались фенилаланин и аргинин.

Для развития большинства штаммов *Str. cremoris* требовался более разнообразный набор аминокислот. Лишь немногие штаммы *Str. cremoris* нуждались в цистине, триптофане, аспарагиновой кислоте, тирозине и

серине. Для всех культур *Str. lactis* и *Str. diacetylactis* и для большей части *Str. cremoris* эти аминокислоты можно было полностью исключить из среды.

В отличие от *Str. lactis*, *Str. diacetylactis* и *Str. cremoris*, ароматообразующие стрептококки *Leuc. citrovorum* и *Leuc. dextranicum* нуждались в триптофане, но лишь немногие из них требовали пролин. Потребность в остальных аминокислотах была такой же, как и у *Str. lactis*, *Str. cremoris* и *Str. diacetylactis*. Культуры *Str. lactis* var. *mal-tigenes*, придающие молоку, в котором они развиваются, солодовый привкус, нуждаются в лейцине, изолейцине и валине (Е. Х. Март, 1962). Из свободного лейцина образуется 3-метилбутанол, наличие которого и обуславливает появление солодового привкуса (Х. Лесмент, 1960, А. Моллер-Мадсен и Х. Йенсен, 1962). По данным Нур-мико (цитируется по Е. А. Ждановой и П. Ф. Дьяченко, 1962), потребность *Str. thermophilus* в аминокислотах зависела от наличия в среде кальция. Глутаминовая кислота и цистин были нужны для всех штаммов, гистидин и триптофан – лишь для очень немногих. Валин, глицин, треонин, метионин и изолейцин требовались для большинства штаммов в среде, не содержащей кальция; в присутствии же кальция они оказывали угнетающее действие на эти микроорганизмы. Влияние аспарагиновой кислоты, лейцина, аланина, тирозина и триптофана также зависело от содержания в среде кальция.

Э. С. Батиста, Р. С. Дехайя и М. Л. Спекк (1966) установили, что основными факторами роста термофильного стрептококка являются глицин и гистидин. Э. Е. Грудзинской (1970) было показано, что термофильный стрептококк при совместном развитии в молоке с болгарской палочкой почти полностью потребляет в первые часы серии, глицин, глутаминовую кислоту, аланин, тирозин, метионин и валин. Установлено, что серин угнетающе действует на развитие многих стрептококков в синтетических питательных средах. В некоторых случаях токсичность серина можно было уменьшить добавлением значительного количества аланина. То же самое наблюдалось и в отношении метионина, ингибиторное действие которого снижалось при добавлении треонина (М. Л. Спекк, 1962). Этим, вероятно, можно объяснить, почему отсутствует угнетение молочнокислых стрептококков, если молоко обогащается смесью аминокислот, содержащихся в гидролизатах белка или субстратах. Приведенные данные свидетельствуют также об исключительной важности правильного сбалансирования содержания различных аминокислот при составлении синтетических сред для развития молочнокислых бактерий.

Пуриновые и пиримидиновые основания, нуклеиновые кислоты. Развиваясь в молоке, молочнокислые бактерии испытывают меньший недостаток в аминокислотах, чем, например, в пуриновых и пиримидиновых

основаниях и нуклеиновых кислотах (Ц. Н. Хьютанен и В. Л. Вильяме, 1963). В молоке этих соединений недостаточно, поэтому при добавлении их усиливается кислотообразование молочнокислых бактерий. Особенно большой эффект наблюдался при добавлении инозина. Р. С. Дехайя и М. Л. Спекк (1962) установили, что некоторые слабые штаммы *Str. lactis* вырабатывают вещество, стимулирующее развитие сильных рас. Это вещество было идентифицировано как аденин. Чистый аденин обладал теми же свойствами и при добавлении к молоку стимулировал рост энергичных культур *Str. lactis* и *Str. cremoris*. Некоторые пуриновые основания, в частности гуанин и ксантин, могут угнетающе действовать на молочнокислые палочки (В. Боттацци, 1962). Это действие уменьшается в присутствии аденина и гипоксантина. Таким образом, аденин является, по-видимому, наиболее важным из пуринов в азотном питании молочнокислых бактерий. Активация, оказываемая на микроорганизмы заквасок экстрактом панкреатиновой железы, объясняется наличием в нем инозина, гипоксантина и аденина. По-видимому, здесь нельзя не учитывать и протеолитического действия, которое оказывает панкреатин на белки молока.

Витамины. Молочнокислые бактерии проявляют довольно высокую требовательность к наличию ряда витаминов в питательной среде. Многие микроорганизмы, например, дрожжи, уксуснокислые, пропионовокислые бактерии, способны синтезировать витамины. Молочнокислые стрептококки (*Str. lactis*, *Str. cremoris*, *Str. diacetylactis*) испытывают потребность в никотиновой кислоте, ниацине и биотине. Не требуются для этих микроорганизмов тиамин, фолиевая кислота и B_{12} . Пиридоксаль стимулирует их развитие. Рибофлавин нужен только *Str. cremoris* (Б. Рийтер и А. Моллер-Мадсен, 1963; Ц. Ф. Нивен, 1944). По данным А. Андерсона и П. Р. Элликера (1953), тиамин и фолиевая кислота все же оказывали стимулирующее действие на большинство исследованных ими штаммов стрептококков. Возможно, что такое расхождение в результате объясняется различной сбалансированностью использованных сред. Потребности молочнокислых бактерий в витаминах для роста и образования ароматических веществ различны. Так, по данным С. Анан-тарамаиаха, Ц. Анантакришна и К. Йя (1962), *Leuc. citrovorum* хорошо развивались при отсутствии тиамина, но не могли без него образовывать ацетоин. При отсутствии пантотената кальция эти микроорганизмы плохо росли, но хорошо продуцировали ацетоин. Те же результаты были получены с никотиновой кислотой. Это очень важно учитывать при выборе состава среды. С. Орла-Йенсен с сотрудниками (1936а) установил, что молочнокислые бактерии ощущают наибольшую потребность в витаминах группы В. Этот факт подтвержден также М.

Непомнящей, М. Тевелевич (1955), Я. Черна, Я. Пиковой, Я. Блатна (1972) и другими авторами. В натуральном молоке содержатся почти все витамины этой группы. Стимуляцию развития молочнокислых бактерий при добавлении к молоку дрожжевого автолизата либо растительных экстрактов можно объяснить наличием в них витаминов группы В или неизвестных факторов роста. Усиление развития молочнокислых бактерий при совместном культивировании с дрожжами, уксуснокислыми бактериями и другими микроорганизмами в какой-то степени, несомненно, связано со способностью дрожжей и уксуснокислых бактерий к синтезу витаминов.

Для большинства штаммов *Str. thermophilus* требуются рибофлавин, биотин, пантотеновая и никотиновая кислоты. Стимулирующее действие оказывали также тиамин и пиридоксаль (Б. Рийтер и А. Мол-лер-Мадсен, 1963). М. Е. Шарп (1962) установила, что для развития молочнокислых палочек большое значение имеет концентрация фолевой кислоты в среде. Для развития молочнокислых бактерий в молоке наибольшее значение как источник энергии имеет лактоза. Эти микроорганизмы предварительно расщепляют лактазу на глюкозу и галактозу. Прежде чем галактоза может быть использована организмом, она должна быть превращена в форму глюкозы (В. Е. Сандин и др., 1962). Это превращение осуществляется в результате реакций фосфорилирования, конечным продуктом которых является глюкозо-1-фосфат, подвергающийся в дальнейшем брожению по той же схеме, что и глюкоза. Молочнокислые бактерии по характеру продуктов брожения делят на гомоферментативные и гетероферментативные. Гомоферментативное молочнокислое брожение характеризуется количественным превращением сбраживаемых углеводов в молочную кислоту, выход которой достигает 98–98,6%.

Гомоферментативные молочнокислые бактерии почти не используют углеводы в конструктивном обмене, который осуществляется в основном за счет использования готовых аминокислот субстрата. Гетероферментативные молочнокислые бактерии обладают ферментами, необходимыми для прямого окисления и декарбоксилирования промежуточных продуктов брожения. Однако в их ферментной системе нет альдолазы и триозофосфатизомеразы. Поэтому они не могут проводить молочнокислое брожение по гексозодифосфатной схеме и образуют из глюкозы, кроме молочной кислоты, приблизительно в эквимолекулярных количествах этиловый спирт, уксусную кислоту, углекислый газ, а также ряд других побочных продуктов. Считается, что способность молочнокислых бактерий образовывать ферменты, свойственные лишь одному из метаболических путей (гексозомонофосфатному или гексозодифосфатному), служит

энзиматической основой для их разделения на гетероферментативные и гомоферментативные (И. И. Климовский, 1966, и др.). Однако, по-видимому, это положение может быть в дальнейшем подвергнуто корректировке. Так, Р. Нандан (1969), изучая метаболизм *Str. diacetylactis*, *Str. cremoris* и *Str. lactis*, установил, что все эти микроорганизмы способны доводить до конца декарбоксилирование пирувата и других α -кетокислот. На основании этих данных он высказывает сомнение в целесообразности отнесения этих микробов к строго гомоферментативной группе.

Наиболее ценными побочными продуктами молочнокислого брожения являются ацетоин, ацетальдегид и особенно диацетил. Существуют разные мнения об источниках, из которых получают эти вещества. Установлено, что при добавлении к среде лимонной кислоты образование диацетила и ацетоина усиливается. Однако ни глюкоза, ни лимонная кислота, добавленные к среде в отдельности, не влияют на образование диацетила. Диацетил ($\text{CH}_3\text{--CO--CO--CH}_3$) – более окисленная форма, чем ацетоин ($\text{CH}_3\text{--CHO--CO--CH}_3$). По данным А. К. Максимовой (1954), он может накапливаться лишь в закваске, обладающей слабыми редуцирующими свойствами, где не создаются условия для восстановления диацетила в ацетоин. При быстром снижении окислительно-восстановительного потенциала содержание диацетила в культуре резко падает. Кроме того, установлено, что для накопления диацетила культурами *Str. diacetylactis* необходимы определенные условия среды: присутствие в среде цитрата; pH около 4,5–4,4; температура 25° С. На образование диацетила существенно влияет режим тепловой обработки молока. Снижение окислительно-восстановительного потенциала, связанное с образованием сульфгидрильных групп – SH, приводит к уменьшению содержания диацетила в закваске (А. К. Максимова, 1954). В результате аэрации (перемешивания) закваски в процессе сквашивания усиливалось образование диацетила и создавались более окисленные условия среды. Исследования А. Свенсена (1970) показали, что в процессе развития закваски, состоящей из *Str. lactis*, *Str. cremoris* и *Leuconostoc*, в ней накапливаются диацетил, ацетальдегид, ацетон, этиловый спирт и ацетоин. Максимальное количество всех ароматических веществ в закваске обнаруживалось через 12–18 ч после сквашивания; через 18 ч образовывалось 6–10 мг/кг диацетила, через 12 ч 7–2 мг/кг ацетальдегида, через 18 и 24 ч 0,86–0,92 мг/кг ацетона, через 72 ч – 28–30 мг/кг этилового спирта, через 18 ч 161–76 мг/кг ацетона. В дальнейшем начиналось снижение их количества. Исключение составляет этиловый спирт, содержание которого продолжало повышаться за весь период наблюдения (72 ч). Как видно из приведенных данных, для закваски этого

типа преобладающим побочным веществом был ацетоин, диацетила содержалось примерно в 10 раз меньше. В. Пало и В. Кохова (1969), исследуя закваску для сквашивания сливок, установили, что ненормально высокое содержание в ней ацетальдегида и этилового спирта сопровождалось появлением пороков вкуса и аромата.

Основным побочным продуктом брожения термофильных молочно-кислых палочек (*Lbm. bulgaricum*) является ацетальдегид (И. В. Петте и Х. Лолкема, 19506, М. Шульц и Г. Хингст, 1954; Ф. Горнер, В. Пало, М. Сегинова, 1972). При этом в первые часы сквашивания йогурта накопление ацетальдегида происходит одновременно с накоплением молочной кислоты. Выдержка продукта после образования сгустка при 45° С приводила к снижению ацетальдегида через 4–5 ч. Хранение продукта после сквашивания на холоду позволяло поддерживать содержание ацетальдегида в нем на первоначальном уровне в течение 18 ч после сквашивания (Е. В. Мельникова, 1973).

Жиры и жирные кислоты

Долгое время считалось, что жир не требуется для развития молочно-кислых бактерий, так как они одинаково хорошо растут и в цельном, и в обезжиренном молоке. Однако исследования С. Е. Джиллиланда и Х. Ц. Ольсона (1963) показали, что в первые 10–12 ч развития молочнокислых бактерий в цельном молоке отмечалось более быстрое кислотообразование, чем в обезжиренном. При добавлении к обезжиренному молоку цельного или пахты в соотношении 1 : 1 ускорялось кислотообразование в этой среде. Авторы предполагают, что вещество, стимулирующее кислотообразование, содержится в липопротеиновых оболочках жировых шариков. Пастеризация не снижала стимулирующего действия. Практически заметной разницы в энергии кислотообразования молочнокислых бактерий при изготовлении заквасок на цельном и обезжиренном молоке не наблюдается. Отмечено, что в молоке, подвергнутом значительному липолизу, поверхностное натяжение снижается, в результате чего угнетается развитие молочнокислых стрептококков. Повышенная активность фермента липазы в молоке характерна для раннего периода лактации. Жир в молоке разлагается также вследствие развития липолитических микроорганизмов. В результате пастеризации молока липолитические микроорганизмы погибают и липаза инактивируется. При добавлении прогорклого молока к нормальному молочнокислый процесс замедлялся, снижалось образование аромата. Степень замедления свертывания молока находилась в прямой зависимости от количества прогорклого молока (Ф. Дж. Бэбел, 1955). В дальнейшем было

выяснено, что подавление развития молочнокислых бактерий в прогорклом молоке обусловлено не только снижением поверхностного натяжения, но и наличием в нем свободных жпр-ных кислот или их солей, часть из которых оказывает на стрептококков токсическое действие. Установлено, что каприловая, каприновая и лауриновая кислоты в количестве 0,1% угнетали развитие молочнокислых стрептококков, причем степень подавления их возрастала с увеличением концентрации этих кислот в среде. Масляная, лино-левая, линоленовая, арахидиновая и пальмитиновая кислоты в таком же количестве не оказывали угнетающего действия. При добавлении 0,5% стеариновой кислоты почти полностью прекращалось кислотообразование у *Str. lactis* (Ф. Дж. Бэбел, 1962). Имеются указания о стимуляции развития некоторых молочнокислых стрептококков и палочек олеиновой кислотой (Е. М. Фостер и др., 1961). Практически свободные жирные кислоты и их соли не влияют существенно на энергию кислотообразования молочнокислых бактерий при производстве кисломолочных продуктов, так как обычно в молоке содержится незначительное количество их. Угнетающее действие свободных жирных кислот можно снизить, внося повышенное (5%) количество закваски (Ф. Дж. Бэбел, 1955). Липазная активность молочнокислых бактерий очень мала по сравнению с другими типичными липолитическими микроорганизмами. Вряд ли она может играть существенную роль при производстве кисломолочных продуктов.

Некоторые немолочнокислые микроорганизмы молока, например *Oidium lactis*, обладают способностью активно использовать молочный жир и свободные жирные кислоты в процессе обмена веществ. При наличии на поверхности сквашенного молока слоя сливок создаются благоприятные условия для развития молочной плесени. Поэтому при культивировании кефирных грибков, где есть опасность их плесневения, целесообразнее использовать обезжиренное молоко.

Соли и микроэлементы

Содержание поваренной соли в молоке в концентрации 0,5–1,0% ускоряет развитие стрептококков, в концентрации 5% – заметно подавляет. Различную устойчивость отдельных видов стрептококков к действию поваренной соли используют для дифференциации видов. Так, энтерококки развиваются при содержании в среде 6,5% NaCl; ацидофильная и болгарская палочки – до 2% ; термоустойчивые палочки – 2–3% . Другие виды молочнокислых бактерий не могут расти при концентрации соли более 1–2%.

По данным И. Рашича, Б. Обрадовича и С. Митича (1965), присутствие пептона в среде снижает ингибирующее действие поваренной соли в

концентрации 4–6,5% на рост *Str. diacetylactis* и *Leuconostoc*. Методом замещения ионов в молоке установлено, что молочнокислые бактерии больше всего нуждаются в магнии и натрии, причем магний не может быть заменен кальцием. В результате удаления из молока железа энергия кислотообразования заквасок несколько снижалась, но при замене железа кобальтом и цинком она восстанавливалась (Б. Рийтер и А. Моллер-Мадсен, 1963). Т. Гелслоот и Ф. Хассинг (1962 г) установили, что кальций необходим для развития заквасок, содержащих в качестве ароматообразователей виды *Leuconostoc*. *Str. diacetylactis* развивался в декальцинированной среде нормально. Магний стимулировал образование диацетила культурами *Leuconostoc*, но не влиял на *Str. diacetylactis*.

При добавлении к молоку марганца устранялось сезонное влияние состава молока на развитие ароматообразующих бактерий (Т. Гелслоот, Ф. Хассинг, 1962а).

Впоследствии И. С. Йенсен, А. И. Оверби (1970) подтвердили, что, добавляя 0,24 мг Mn^{++} на 1 л молока, можно после нескольких пассажей повысить в комбинированной закваске содержание ароматообразующих стрептококков *Leuc. citrovorum*. Однако, как показали исследования Е. Андерсона и Х. Лесмента (1970), стимулирование развития *Leuc. citrovorum* при добавлении марганца приводило к раннему сбраживанию лимонной кислоты и почти полному восстановлению четырехуглеродных соединений до 2,3-бутилен-гликоля, а следовательно, к исчезновению аромата

Вещества, подавляющие развитие молочнокислых бактерий в молоке. Антибиотики.

Антибиотики могут попадать в молоко из крови животного, подвергнувшегося лечению от тех или иных заболеваний (чаще всего от мастита), при введении их в корма с целью повышения привеса. Кроме того, антибиотики вводят с целью фальсификации – приостановления нарастания кислотности.

Присутствие антибиотиков в молоке нежелательно. Даже небольшое количество их может оказывать аллергическое действие на некоторых людей, а у детей и подростков потребление молока, содержащего антибиотики, может вызвать токсический эффект. Поэтому на наличие антибиотиков в молоке необходимо обращать особенно серьезное внимание (Дж. Г. Дэвис, 1963). Американский исследователь Велг на основании обобщения статистического материала, пришел к выводу, что примерно 10% населения может давать реакцию на введение антибиотиков. Кроме того,

систематическое потребление молока, содержащего антибиотики, может привести к образованию в организме резистентных форм патогенных микроорганизмов (Р. Ц. Райт, 1961) и изменениям кишечной флоры. Международная организация здравоохранения (ВОЗ) считает недопустимым употребление в пищу молока и молочных продуктов, содержащих даже незначительное количество антибиотиков. Поэтому законодательством многих стран запрещена сдача на предприятия молочной промышленности молока, содержащего антибиотики. В СССР такое запрещение также установлено ГОСТом на молоко коровье (“Требования при заготовках”). В ветеринарии применяются пенициллин, стрептомицин, тетрациклин, бацитрацин и другие антибиотики. Эти же антибиотики обнаруживаются и в молоке (Е. Х. Март, 1961).

Одним из наиболее опасных антибиотиков при производстве продуктов с применением заквасок считается пенициллин, так как он термоустойчив и выдерживает в молоке кратковременную пастеризацию при высокой температуре (Р. Розанов, 1962). Присутствие в молоке антибиотиков крайне отрицательно отражается на тех производствах, где применяют закваски молочнокислых бактерий. Скваживание молока, содержащего антибиотики, задерживается, а иногда и полностью прекращается. По данным различных зарубежных авторов, от 1 до 63% молока, сдаваемого на молочные предприятия, содержит пенициллин в количестве 0,005 и. е./мл. При производстве масла и сыра такие дозы пенициллина в молоке не затрудняют технологического процесса, а при выработке йогурта замедляется процесс сквашивания (Р. Розанов, 1962, Т. Е. Гелслоот, 19626).

С молоком могут также выделяться и задерживать микробиологические процессы при производстве кисломолочных продуктов и сульфаниламидные препараты, применяемые для лечения животных. Антибиотики, введенные в организм животного, выделяются с молоком длительное время. Длительность выделения антибиотиков с молоком зависит от природы антибиотика, вида растворителя, места введения (Е. Х. Март, 1961, Р. Кеннон и др., 1962). Большинство авторов указывает, что во всяком случае в течение шести доек после введения антибиотика в организм животного он продолжает обнаруживаться в молоке (М. Г. Финчер и др., 1962, Е. Х. Март, 1961). В молоке, полученном от одного стада, действие антибиотиков проявляется сильнее, чем в сборном. В случае умышленного добавления антибиотиков к молоку они могут содержаться в значительном количестве и в больших партиях сборного молока. По чувствительности к антибиотикам молочнокислые бактерии можно расположить в такой последовательности: мезофильные молочнокислые стрептококки (*Str. lactis*, *Str. cremoris*)

выдерживают концентрацию пенициллина 0,1 и. е./мл, *Str. thermophilus* и молочнокислые палочки 0,01 и. е./мл. По отношению к стрептомицину, наоборот, вторая группа оказывается менее чувствительной, чем первая.

Снизить влияние антибиотиков на развитие микроорганизмов закваски можно, применив культуры, адаптированные к возрастающим количествам антибиотиков в молоке. Такие закваски создают нормальное кислотообразование при содержании в молоке пенициллина до 1 и. е./мл. Ф. Вассерфаль (1966) путем пассирования *Sir. diacetilactis* в молоке с возрастающим содержанием пенициллина получил варианты, резистентные к 2,5 и. е./мл. Однако способность к ароматообразованию у культур утрачивалась. И. Н. Пятницyna и Л. А. Банникова (1966) установили, что способность к приобретению резистентности у разных видов молочнокислых бактерий неодинаковая. Если у ацидофильных бактерий резистентность могла быть повышена в 9 и 16 раз и достигала 3,6 и. е./мл, то у термофильного стрептококка ее удалось повысить лишь вдвое (с 0,03 до 0,06 и. е./мл). Установлено также, что пенициллин адсорбируется на клетках бактерий, в результате чего концентрация его в молоке уменьшается. При повышенном количестве вносимой закваски часть клеток адсорбирует антибиотик, другая получает возможность нормально развиваться в молоке (Ф. Дж. Бэбел, 1962). Для снижения чувствительности к антибиотикам рекомендуется также добавлять ростовые факторы – экстракты, обогащенные пептидами, дрожжевой и печеночный экстракты, гидролизованное молоко (Е. Х. Март, 1962). По данным Дж. Жаск и др. (1959), молочнокислые бактерии, длительное время используемые в сыроделии, приобретают некоторую устойчивость к антибиотикам.

Моющие дезинфицирующие средства и другие химические вещества

При недостаточно тщательном ополаскивании оборудования чистой водой после мойки и дезинфекции на поверхности его могут остаться моюще-дезинфицирующие средства, влияющие на развитие микроорганизмов в молоке. Наибольшее значение в этом отношении имеют препараты, содержащие хлор и четырехзамещенные соединения аммония. Отмечаются случаи умышленного добавления моюще-дезинфицирующих средств, в частности гипохлорита, к молоку с целью предотвращения развития в нем микроорганизмов (Г. Чемберс и др., 1962). При наличии в молоке гипохлорита и четырехзамещенных соединений аммония значительно увеличивается продолжительность редуцтазной пробы. Для обнаружения моюще-дезинфицирующих средств рекомендуются химические методы,

которые более чувствительны, чем микробиологические. Так, метод обнаружения четырехзамещенных соединений аммония основан на способности двух его молекул при известном рН присоединяться к молекуле красителя, например, бромфеноловой сини (Р. Лакросс, 1962). Для контроля молока на гипохлорит применяют йодометрическую пробу (Г. Чемберс и др., 1962; Дж. Эйсес и др., 1962). Концентрацию дезинфицирующих препаратов 10^{-2} – 10^{-3} можно также определить биологическим методом с использованием *Str. thermophilus*.

Исследования Т. Сторгардса и А. Андерсона (1966) показали, что в присутствии препаратов, содержащих четырехзамещенные соединения аммония, тормозился рост всех компонентов многоштаммовой закваски. Хлорамин оказывал специфическое подавляющее действие на ароматообразующие бактерии, количество которых снижалось на 90%. Практика показывает, что при переработке молока с повышенной кислотностью и нейтрализованного разрешенными для этой цели веществами нередко замедляется сквашивание, ухудшается качество сгустка, особенно трудно готовить закваски. Специальных исследований в этом направлении не проводилось, но в литературе имеются сведения об отрицательном влиянии искусственного снижения кислотности сливок на последующее развитие в них молочнокислых бактерий, особенно *Str. diacetylactis* (Л. Лайтбоди, 1962). Ким и Хагмон установили, что пестициды в количестве до 100% не влияли на метаболизм молочнокислых бактерий или оказывали слабый эффект. Я. Янков и П. Пиева (1970) применили ДДТ, линдан, их комбинации с деделином и гербицидом 24Д. Они показали, что высокие концентрации пестицидов порядка 10000–50000% оказывали бактерицидное действие на *Str. lactis*, *Str. thermophilus* и *Lbm. bulgaricum*. При содержании 1000% наблюдалось бактериостатическое действие, выразившееся в снижении энергии кислотообразования. Низкие концентрации пестицидов (до 0,1 – 10%) оказывали стимулирующее действие на молочнокислые бактерии. Авторы приходят к выводу, подтверждающему результаты Кима и Хагмона, что пестициды в концентрации до 100% не оказывают заметного отрицательного влияния на молочнокислые бактерии.

Вещества, применяемые для консервирования молочных продуктов и обогащения вкуса. Повышенное содержание сухих веществ в молоке .

При производстве кисломолочных продуктов применяют свекловичный сахар и соль. Небольшое содержание этих веществ в продукте лишь

незначительно задерживает развитие микроорганизмов. Высокой устойчивостью к соли обладают некоторые дрожжи, что может иметь значение при хранении соленых творожных изделий. Сахар, содержащийся в творожных изделиях, в некоторых случаях интенсифицирует размножение дрожжей, вследствие чего наблюдается вспучивание продуктов. Сахар, содержащийся в значительных концентрациях, например в особой творожной массе (26%), заметно подавляет рост микроорганизмов и увеличивает стойкость продукта.

Большое влияние на развитие молочнокислых бактерий оказывает концентрация сухих обезжиренных веществ в молоке. Л. А. Банникова (1953) установила, что при повышении в обезжиренном молоке концентрации сухих веществ до 18% культуры молочнокислых

бактерий развивались значительно быстрее и достигали более высокого уровня, чем в молоке, содержащем 9% сухих веществ. Накопление кислоты в таком молоке происходило медленнее. Культивирование заквасок молочнокислых бактерий в обезжиренном восстановленном молоке с содержанием сухих веществ до 12,2% приводило к повышению в них количества ароматообразующих бактерии – *Str. diacetylactis* и *Leuc. citrovorum* (И. Йенсен, А. П. Оверби, 1970). Аналогичные результаты были получены Х. Йенсеном и З. Хорватом (1970) при выращивании заквасок для масла и йогурта в обезжиренном молоке, концентрация сухих веществ в котором была повышена путем сгущения до 14%. Однако при этом отмечались сладковатый вкус и зернистая консистенция готового продукта. Исследования, проведенные с более высокими концентрациями сухих веществ в молоке (24,36 и 42%), показали, что критической концентрацией, при которой еще отмечался хороший рост молочнокислых бактерий, была концентрация 36%. *Str. cremoris* проявлял большую чувствительность к повышенному содержанию сухих веществ, чем *Str. lactis* и *Str. diacetylactis*.

Вещества, обуславливающие естественную бактерицидность молока

Естественные ингибиторы, обуславливающие бактерицидные свойства свежесвыдоенного молока (лактенин, лактопероксидаза), обнаруживаются в молоке только в первые часы после дойки и при условии минимального содержания в нем микроорганизмов (М. Зеелеманн, 1959, Дж. Стедхаудерс и Х. А. Беринга, 1962). В результате нагревания до 82–85° С эти вещества инактивируются (К. М. Шэхени и др., 1962). Практически в сборном молоке, поступающем на предприятия, естественная бактерицидность, связанная с наличием этих веществ, не обнаруживается.

Установлено, что в сыром молоке могут находиться агглютинины (неспецифические антитела), агглютинирующие стрептококки серологической группы N (типа *Str. lactis*, *Str. cremoris* и пр.). Образование агглютининов в крови животного может быть обусловлено бактериальными антигенами, адсорбированными из кишечного канала, через легкие или кожу. Например, выяснено, что *Str. bovis*, присутствующие в большом количестве в кишечном канале жвачных животных, имеют общий антиген с *Str. cremoris*. В присутствии агглютининов в молоке нарушается нормальное деление клеток молочнокислых стрептококков. Так, отмечено, что молочнокислые стрептококки, обычно образующие в стерилизованном молоке диплококки или короткие цепочки, в сыром молоке имеют форму длинных цепочек. Показано, что ингибиторная активность молока ассоциируется с фракцией иммуноглобулина (Х. Е. Рандольф, И. А. Голд, 1968). Исследования Д. Б. Эммонза, Дж. А. Эллиотта, Д. И. Беккетта (1966) показали, что среди штаммов молочнокислых стрептококков имеются как чувствительные, так и нечувствительные к агглютинин-пам. Агглютинины к чувствительным штаммам были обнаружены в молоке и крови всех исследованных животных, хотя и в разных количествах. В начале лактации (молозпзо) их содержалось много. После первой недели лактации их количество снижалось, в самом конце – снова повышалось.

Продукты обмена микроорганизмов, развивающихся в молоке

Антибиотики, образующиеся в результате жизнедеятельности микроорганизмов, найдены в значительном количестве образцов (до 10%) молока (Ф. Косиковский, М. О. Лери, 1963). Эти вещества так же, как и естественные ингибиторы, разрушались при нагревании до 82–83° С. Х. Хаттовска (1970) обнаружила в сильно загрязненном сыром молоке микроорганизмы (микрококки и грамтрица-тельные палочки), которые выделяли термостабильные вещества, угнетающие развитие молочнокислых бактерий, их аромато- и кис-лотообразование. Эти наблюдения свидетельствуют о важности снижения микробиологической обсемененности сырого молока, предназначенного для производства заквасок и кисломолочных продуктов. С другой стороны, многие немолочнокислые бактерии, развивающиеся в сыром молоке, стимулируют развитие молочнокислых (С. А. Королев, 1932). По всей вероятности, фактор угнетающего действия продуктов обмена микроорганизмов в сборном молоке значительно меньше влияет на молочнокислый процесс, чем антибиотики и бактериофаг.

Вещества, содержащиеся в маститном молоке

Долгое время считалось, что в молоке от маститных животных содержатся вещества, угнетающие развитие молочнокислых бактерий. По данным Дж. Г. Дэвиса (1961), эти вещества разрушаются при нагревании. Другие исследователи (Ф. И. Бэбел, 1955) сообщают, что нагревание на них не действует. Добавление 10% маститного молока к нормальному задерживает рост *Str. lactis*. Х. Р. Уайтхед и Г. А. Кокс (1933) установили, что молочнокислые стрептококки не могут нормально развиваться в сыром молоке, содержащем более 5 млн. лейкоцитов в 1 мл. При нагревании молока до 49–52° С в течение 30 с угнетающее действие лейкоцитов снижается. В то же время Г. Вейс и М. Ван-Белахем (1970) показали на большом количестве исследованных проб молока, что пастеризованное сборное молоко с высоким содержанием лейкоцитов (1,2 млн./мл) является такой же хорошей питательной средой для развития и проявления биохимической активности молочнокислых бактерий, как и пастеризованное сборное молоко с низким первоначальным содержанием лейкоцитов (300 тыс/мл). Возможно, что такие разноречивые данные объясняются различиями в режимах тепловой обработки молока. Следует отметить, что ММФ установлена норма содержания лейкоцитов в выдаиваемом молоке – 500 тыс/мл.

Реакция среды

Физически действующим началом в кислых и щелочных субстратах является не просто наличие в них кислоты или щелочи, а концентрация гидроксильных и водородных ионов, рН среды может изменять активность ферментов, что в свою очередь ведет к изменению биохимической активности микроорганизмов и направления вызываемых ими биохимических превращений в среде. Различные микроорганизмы, встречающиеся в кисломолочных продуктах, по-разному относятся к реакции окружающей их среды. Молочнокислые стрептококки более чувствительны к низким рН, чем палочки. Для более активных кислотообразователей, как правило, характерна большая устойчивость к высокой активной кислотности среды. Этим объясняются и различные пределы кислотообразования в молоке у разных групп молочнокислых бактерий. У гомоферментативных молочнокислых бактерий рН среды не влияет на характер продуктов брожения. Основным продуктом брожения является молочная кислота. При развитии гетероферментативных молочнокислых бактерии реакция среды существенно влияет на выход продуктов брожения. В более кислых средах преимущественно образуется молочная кислота, в менее кислых – уксусная и молочная. А. К. Максимовой (1954) установлена зависимость между кис-

лотностью плазмы масла и содержанием в нем диацетила. Наибольшее количество диацетила образуется при рН 5,2–4,6. Для большинства плесеней и дрожжей благоприятна кислая реакция среды, характерная для кисломолочных продуктов. С другой стороны, гнилостные бактерии весьма чувствительны к кислой реакции среды, поэтому они не развиваются при производстве кисломолочных продуктов. Условия для развития гнилостных бактерий могут возникнуть только в том случае, если по каким-либо причинам замедлен молочнокислый процесс при производстве продукта или если продукты, например творог и сметану, хранят длительное время, в результате чего на поверхности их развиваются плесени и дрожжи, нейтрализующие кислоту.

Реакция среды влияет и на активность бактериофага. По данным Д. А. Яковлева (1962), бактериофаг молочнокислого стрептококка вызывает лизис только в кислой среде при рН ниже 6,5. Важное значение имеет реакция среды и для проявления действия антибиотических веществ, вырабатываемых молочнокислыми бактериями. М. С. Полонская (1952) установила, что антибиотическая активность ацидофильных бактерий усиливается при низких рН. Эта же закономерность наблюдается и для антибиотических веществ, вырабатываемых другими молочнокислыми бактериями.

Окислительно-восстановительные условия среды

Развитие микроорганизмов и их биохимическая деятельность тесно связаны с окислительно-восстановительными условиями в среде, которые зависят от соотношения в ней окисленных и восстановленных веществ. В биологических системах – культурах микроорганизмов – окисление и восстановление служат источниками энергии для всех процессов, протекающих в клетке.

При развитии любого микроорганизма окислительно-восстановительный потенциал падает, т. е. восстановительные свойства среды усиливаются (И. Л. Работнова, 1957). И. Л. Работнова рассматривает это явление как приспособление, обеспечивающее лучшие условия для развития культуры. При добавлении редуцирующих веществ, предохраняющих клетку от чрезмерного окисления, сокращается продолжительность lag-фазы и ускоряется размножение аэробов. И. Л. Работнова с сотрудниками (1957) установила, что падение окислительно-восстановительного потенциала обусловлено не только поглощением культурой растворенного кислорода, но и образованием редуцирующих веществ. Некоторые микроорганизмы выделяют редуцирующие вещества в среду, у других восстановительными

свойствами обладают только живые клетки. При производстве кисломолочных продуктов окислительно-восстановительные условия среды могут меняться под влиянием таких факторов, как аэрация (перемешивание), добавление редуцирующих веществ (например, аскорбиновой кислоты), и в результате жизнедеятельности самих микроорганизмов.

Для микроорганизмов, у которых нет необходимых систем ферментов для использования кислорода в качестве акцептора водорода, такими акцепторами могут служить аскорбиновая кислота, цистеин, глутатион, метиленовый голубой и резазурин. Метиленовый голубой и резазурин применяют для установления наличия активного процесса обмена веществ микроорганизмов в молоке. Чем больше в молоке микроорганизмов и интенсивнее обмен веществ, тем быстрее падает окислительно-восстановительный потенциал и быстрее восстанавливаются метиленовый голубой или резазурин. Процесс восстановления этих веществ сопровождается их обесцвечиванием или изменением цвета, что легко установить при визуальном наблюдении за пробами.

Резазурин по сравнению с метиленовым голубым восстанавливается при более высоком окислительно-восстановительном потенциале. Следовательно, на его восстановление и получение результата о количестве и активности микроорганизмов требуется меньше времени. Молоко как сырое, так и пастеризованное обладает определенной восстановительной способностью, уровень которой колеблется в зависимости от периода лактации, состояния здоровья животного и т. д. Молочнокислые бактерии относятся к факультативным анаэробам. Некоторые виды, например *Str. lactis*, в процессе жизнедеятельности используют свободный кислород в незначительной степени или совсем его не используют. Однако они могут развиваться и в присутствии кислорода. У ароматообразующих стрептококков отмечена обратная зависимость между редуцирующей способностью и образованием диацетила и ацетоина. Она может меняться у одного и того же штамма под влиянием условий культивирования (С. Н. Анантарамаях, 1970).

Гомоферментативные молочнокислые палочки более анаэробны. Особенно чувствительны они к кислороду в момент выделения из естественных субстратов, вследствие чего часто затрудняется получение поверхностных колоний этих микроорганизмов на плотных питательных средах. Редуцирующая активность у разных видов молочнокислых палочек неодинакова и находится в обратной зависимости от содержания в клетках флавопротеина .

Кислород почти не оказывает вредного воздействия на развивающиеся микроорганизмы, у которых протекает активный обмен веществ. У покоящихся культур чувствительность к кислороду резко возрастает. С повышением окислительно-восстановительного потенциала, что происходит при проникновении кислорода в клетку, инактивируются некоторые ферментные системы и снижается жизнедеятельность культуры. В результате удаления кислорода из культур значительно сохраняется их жизнеспособность, что используют, высушивая культуры в замороженном состоянии под вакуумом и храня их в атмосфере азота. Рекомендуется также хранить жидкие культуры в лакмусовом молоке с мелом в герметически закупоренных сосудах (Дж. Дэвис, 1963).

Для плесеней требуется кислород, так как их мицелий в основном развивается в воздушной среде и только часть его погружается в питательный субстрат. Как правило, они развиваются на поверхности кисломолочных продуктов.

Сезонные изменения молока

Осенью и особенно весной (март – апрель) часто наблюдается замедление или полная задержка сквашивания молока, изменение характера сычужного и кислотного свертывания, нарушение способности к газообразованию и ароматообразованию у ароматообразующих бактерий. Вследствие этого ухудшается качество заквасок и готовой продукции, а иногда и развиваются различные пороки. Такое резкое нарушение биохимической деятельности молочнокислых бактерий обусловлено изменениями биологических свойств молока, вызванных изменением рационов питания и периодом лактации животных. На развитие молочнокислых бактерий в весеннем и осеннем молоке влияет, по-видимому, комплекс факторов. По данным Т. Тихомировой (1961), весной изменяется аминокислотный состав молока – почти в 5 раз снижается количество необходимых для развития молочнокислых бактерий аминокислот (аргинина, валина с метионином и лейцина с фенилаланином) и примерно в 2 раза снижается общее количество свободных аминокислот. Работой Э. Е. Грудзинской и Н. С. Королевой (1970) не установлено столь резких колебаний в аминокислотном спектре молока, полученного в разное время года. Однако отмечено, что весной в пробах молока не содержалось таких важных аминокислот, как валин, фенилаланин и лейцин. В весеннее время молоко характеризуется также пониженным содержанием в нем факторов роста – биотина (Р. Давидов и Л. Круглова, 1957), никотиновой кислоты (М.

Б. Тевелевич, 1961) и др. Окислительно-восстановительные процессы протекают значительно слабее. Минеральный состав молока в весеннее время также меняется в сторону, неблагоприятную для развития молочно-кислых бактерий: содержание марганца снижается, а меди повышается, в молоке отсутствует кобальт (А. П. Корнильцева, 1965).

Весной культуры *Str. lactis* резко снижают свою энергию кислотообразования и протеолитическую активность (М. Б. Тевелевич, 1961). По данным Т. Тихомировой (1961), весной молочнокислая микрофлора продуцировала молочную кислоту в 3 раза меньше, чем зимой. И. И. Климовский и Г. А. Калинина, изучая сезонное влияние состава молока на *Str. lactis*, установили резкое падение численности бактерий и снижение кислотности в апрельском молоке по сравнению с июньским.

Еще более чувствительны к сезонным изменениям биологических свойств молока ароматообразующие стрептококки типа *Leuc. citro-vozum* и *Leuc. dextransum*, которые весной теряют способность к сбраживанию Сахаров и снижают продуцирование летучих жирных кислот (М. Р. Гибшман, 1960).

Т. Гелслоот и Ф. Хассинг (1962) отметили, что ароматообразующие стрептококки типа *Leuc. citrovorum* более чувствительны к сезонным изменениям состава молока, чем *Str. diacetylactis*. При добавлении к молоку небольшого количества марганца влияние сезонных колебаний на развитие этих культур устранялось, однако, как было указано выше, это отрицательно влияло на образование аромата. Весной крайне затрудняется поддержание коллекции чистых культур, которые часто теряют способность к свертыванию и резко меняют некоторые свойства, например, приобретают тягучесть. Потеря активности кислотообразования наблюдается не только у молочнокислых стрептококков, но и у палочек. У некоторых штаммов так и не удастся восстановить эту способность даже путем пересевов большого количества посевного материала (до 1 мл) и длительной выдержки в термостате.

Т. Тихомирова пришла к выводу, что, несмотря на низкое содержание свободных аминокислот в весеннем молоке, потребление их естественной микрофлорой значительно ослаблено. Возможно, что в весенний период это обусловлено биологической неполноценностью молока, влияющей на нормальный обмен веществ микроорганизмов. Установлено, что во все периоды года в молоке содержатся вещества, подавляющие развитие молочнокислых бактерий. При принятых в промышленности режимах пастеризации эти вещества сохраняются, а при стерилизации разрушаются. Поэтому активность культур и чувствительность их к сезонным изменениям

нельзя устанавливать на стерилизованном молоке. Факторы роста, имеющиеся в молоке, летом и осенью позволяют молочнокислым бактериям развиваться в присутствии ингибиторов. Зимой и весной из-за недостатка факторов роста труднее преодолевать угнетающее действие ингибиторов. Дж. Чулак и Л. Минуэлл (1951 а, б) выделили культуры молочнокислых стрептококков, чувствительные и нечувствительные к сезонным изменениям состава молока. М. Б. Тевелевич также установила, что среди штаммов *Str. lactis* имеются культуры, малочувствительные к сезонным изменениям свойств молока. Эти культуры отличаются способностью усваивать необходимые им факторы роста (рибофлавин и биотин) из неполноценного весеннего молока, накапливать никотиновую кислоту в процессе своего развития. В биологически неполноценном молоке протеолитическая активность этих культур не снижается. Следовательно, сезонные изменения состава молока не оказывают заметного влияния на интенсивность обмена веществ у этих микроорганизмов.

Культуры, мало чувствительные к изменениям состава молока, были выделены весной, и, по-видимому, это их свойство является следствием приспособления к неблагоприятным условиям. При производстве кисломолочных продуктов на направление микробиологических процессов влияют также технологические свойства молока (скорость образования и характер кислотного и сычужного сгустка, скорость отделения сыворотки и т. д.), обусловленные его физико-химической характеристикой. Весной, а иногда и осенью технологические свойства молока резко отличаются от технологических свойств молока, получаемого зимой и летом. С изменением кислотно-щелочного равновесия в сторону уменьшения кальциевых солей ухудшаются сычужная свертываемость молока и обработка зерна при производстве сыра (Т. Тихомирова, 1962). Технологические

свойства молока имеют не менее важное значение и при выработке кисломолочных продуктов. Задержка процесса коагуляции сгустка и отделения сыворотки при изготовлении творога не только нарушает ритмичность работы предприятия, но влечет за собой и более серьезные последствия, в частности замедление технологического процесса.

Замедление технологического процесса обычно сопровождается развитием посторонней микрофлоры, менее требовательной к условиям среды. Так, в случае плохого отделения сыворотки при производстве творога кислотность готового продукта, как правило, повышается вследствие развития термоустойчивых молочнокислых палочек. Уменьшить влияние сезонных изменений состава молока на развитие и биохимическую деятельность молочнокислых бактерий можно разными путями. М. Р.

Гибшман (1960) рекомендует при культивировании ароматообразующих молочнокислых бактерий в весеннее время добавлять к молоку 0,05–0,2% препаратов, богатых факторами роста (дрожжевой автолизат, гидролизаты и т. д.). Однако при большом объеме производства этот способ активации молочнокислых бактерий может вызвать значительные трудности. М. Б. Тевелевич (1961), Дж. Чулак и Л. Минуэлл (19516) предлагают использовать специально подобранные культуры, не чувствительные к сезонным изменениям состава молока. Применение малочувствительных культур в заквасках для масла дало хорошие результаты.

Особого внимания в этом направлении заслуживают результаты работы Л. А. Банниковой и С. Б. Задояна по получению культур, сохраняющих гомогенность популяции на протяжении всего периода года. Весьма целесообразно также применять симбиотические закваски, в состав микрофлоры которых входили бы компоненты, снабжающие молочнокислые бактерии недостающими им факторами роста и регулирующие азотный обмен этих микроорганизмов. Как правило, па развитие симбиотических культур сезонные изменения свойств молока не влияют так сильно, как на развитие чистых культур. Нами при производстве кефирных заквасок и кефира не наблюдалось нарушений сквашивания, обусловленных сезонностью.

Физические факторы. Температура.

Температура – один из наиболее мощных физических факторов, влияющих на развитие микрофлоры при производстве кисломолочных. Сущность большинства технологических приемов сводится к регулированию мнкроонологических процессов путем установления определенных температурных режимов. В зависимости от температурных режимов и характера их воздействия на микрофлору технологические приемы, применяемые при производстве кисломолочных продуктов, можно группировать следующим образом:

тепловая обработка молока: цель ее – уничтожение по возможности большей части микрофлоры и подготовка молока (улучшение его химического состава для развития микроорганизмов, а также физических свойств получаемых сгустков) для проведения сквашивания; сквашивание и созревание: в этом случае создают условия, способствующие развитию микрофлоры заквасок в нужном направлении и получению продукта с определенными заданными свойствами; охлаждение и хранение продуктов: цель их – создание условий, при которых прекращается развитие по

возможности всей микрофлоры и сохраняются физические и химические свойства готового продукта и его органолептические показатели.

Тепловая обработка молока и сливок

Остаточная микрофлора молока и сливок после пастеризации. Для приготовления кисломолочных продуктов используют преимущественно пастеризованное молоко, причем режимы пастеризации устанавливают значительно более жесткие, чем при производстве питьевого молока, с учетом целого ряда технологических требований. В связи с этим необходимо выявить основные группы микрофлоры пастеризованного молока и возможное влияние каждой из этих групп на качество кисломолочных продуктов при совместном развитии с микроорганизмами закваски.

При оценке роли микрофлоры пастеризованного молока, предназначенного для производства кисломолочных продуктов, необходимо учесть, что молоко после тепловой обработки не охлаждают, а заквашивают и выдерживают длительное время при температуре сквашивания. Как правило, эта температура достаточно высокая (от 18–20 до 45–50°C). При такой температуре могут развиваться не только микроорганизмы, вносимые с заквасками, но и какая-то часть остаточной микрофлоры пастеризованного молока. В результате этого в основном увеличивается количество только тех микроорганизмов, которые способны выдерживать интенсивное нарастание кислотности в процессе сквашивания молока. Споровая протеолитическая микрофлора и маслянокислые бактерии в этих условиях не развиваются. В производстве кисломолочных продуктов наибольшую роль могут сыграть такие представители остаточной микрофлоры пастеризованного молока, как молочнокислые бактерии. Молочнокислые стрептококки типа энтерококков развиваются в молоке медленно и не могут влиять на изменение кислотности продукта, так как предел их кислотообразования часто бывает ниже предела кислотообразования микрофлоры заквасок.

Между тем основной порок этих продуктов – излишняя кислотность, возбудителем которого являются представители остаточной микрофлоры пастеризованного молока – термоустойчивые молочнокислые палочки. У этих микроорганизмов предел кислотообразования в молоке значительно выше, чем у *Str. lactis*. С точки зрения сохранения качества питьевого молока эта группа не могла интересовать исследователей как технически вредная, хотя на значение молочнокислых палочек, выдерживающих пастеризацию, для сыроделия указывали первоначально С. А. Королев (1932), а в дальнейшем – Дж. Г. Франклин и М. Е. Шарп (1962).

Количество молочнокислых палочек как в сыром, так и пастеризованном молоке по отношению к общему объему микрофлоры невелико и часто не превышает 25–250 клеток в 1 мл. Обычными методами исследования не удается выявить труппу молочнокислых палочек в остаточной микрофлоре пастеризованного молока. Эти палочки не растут на питательных средах, применяемых при исследованиях молока (МПА, среда из сухого питательного агара). Даже на такой богатой питательной среде, как агар с гидро-лизованным молоком, не всегда удается добиться роста этих микроорганизмов. Температура 37° С, принятая в стандартной методике для определения общего количества бактерий в молоке, также не является для них оптимальной.

Термоустойчивые палочки удалось обнаружить в молоке, пастеризованном при 75° С с выдержкой 15–20 с и при 80° С с выдержкой 15–20 с. Нередко эти микроорганизмы обнаруживаются в молоке, предназначенном для заквасок, и в молоке, пастеризованном при 90–95° С, но недостаточно выдержанном при этих температурах. В молоке, пастеризованном при 75–80° С, наибольший удельный вес занимают терmostойкие молочнокислые стрептококки, палочек же значительно меньше. В результате пастеризации при 85–90° С погибает основная масса стрептококков и в молоке остаются преимущественно термоустойчивые палочки.

При повторной пастеризации, иногда применяемой на некоторых предприятиях, молоко или сливки, как правило, обогащаются термоустойчивыми молочнокислыми палочками. После прохождения молока через технологическое оборудование количество их в среднем составляет 2500–25000 клеток в 1 мл; общее количество посторонних микроорганизмов (преимущественно молочнокислых стрептококков) составляет от 50 до 500 тыс. клеток в 1 мл. Принятые в промышленности режимы пастеризации исключают возможность выживания в процессе пастеризации бактерий группы кишечной палочки. Если эти микроорганизмы обнаруживаются в молоке, отобранном непосредственно из пастеризатора, значит, имеются какие-то технические или организационные неполадки в работе пастеризационных установок. Обычно наличие бактерий группы кишечной палочки в молоке после пастеризации является следствием вторичного обсеменения его при прохождении через технологическое оборудование. В молоке, предназначенном для производства кисломолочных продуктов, нормальным можно считать содержание кишечной палочки 10–30/мл (титр 0.1–0,3 мл). Однако в 1 мл молока нередко содержится 100 и более клеток.

Влияние тепловой обработки молока и сливок на дальнейшее развитие молочнокислой микрофлоры. В. М. Богданов установил, что в

молоке, подвергнутом различной термической обработке, молочнокислые бактерии развиваются по-разному: лучше всего в стерилизованном молоке, хуже – в молоке, пастеризованном при низких температурах (55–60° С). П. Ф. Дьяченко отметил, что при нагревании до 55–60° С резко понижается дисперсность коллоидной системы молока. С. А. Королев объясняет торможение развития молочнокислых бактерий в молоке, пастеризованном при низких температурах, изменением состояния частиц казеина, их укрупнением, вследствие чего белок становится менее доступным для питания бактерий. Е. А. Богданова (1966) установила, что при повышении температуры пастеризации с 74 до 90° С дисперсность белковых частиц увеличивается. В результате тепловой обработки изменяется не только величина частиц казеина, но и химический состав молока. Благоприятное влияние тепловой обработки на развитие молочнокислых бактерий обусловлено снижением окислительно-восстановительного потенциала, разрушением альбумина молока с образованием пептидов и свободных аминокислот и других ростовых факторов (Э. М. Фостер, 1952). Кроме того, в результате пастеризации разрушаются лактенины – вещества, подавляющие рост микроорганизмов в альбуминной сыворотке (Т. Сторгардс, 1963). Имеются данные о том, что лучше всего развиваются некоторые виды молочнокислых бактерий в молоке, которое подвергнуто пастеризации при 90° С и к которому добавлено небольшое количество молока, стерилизованного в автоклаве (Дж. Е. Оклер и А. Портман, 1959). Стимулирующее действие стерилизованного молока приписывается наличию в нем муравьиной кислоты, образующейся из лактозы при стерилизации. В то же время в одном стерилизованном молоке молочнокислые бактерии развивались хуже, чем в смеси пастеризованного и стерилизованного молока. Это объясняется тем, что при стерилизации полностью разрушаются факторы роста, необходимые для молочнокислых бактерий.

В. Грин и Дж. Йежески (1957) установили, что с повышением температуры и увеличением продолжительности тепловой обработки молока изменяется характер воздействия молока на развитие в нем молочнокислых бактерий. Они наметили несколько зон стимуляции и торможения развития культур заквасок в молоке. Эти исследователи считают, что

первая зона – стимуляции (62–72° С с выдержкой 30–40 мин) – обусловлена несколькими факторами: снижением окислительно-восстановительного потенциала; разрушением термолабильных ингибиторов; частичным гидролизом белков молока; денатурацией сывороточных белков.

Вторая зона – угнетения ($72\text{--}90^\circ\text{C}$ с выдержкой 15–45 мин) – обусловлена избыточной концентрацией цистеина с сопутствующим возрастанием количества токсических сульфгидрильных групп.

Третья зона – стимуляции (60°C с выдержкой 180 мин и 120°C с выдержкой 30 мин) – совпадает с уменьшением количества сульфгидрильных групп в результате дальнейшего нагревания. Четвертая зона – угнетения (120°C с выдержкой более 30 мин) – обусловлена снижением питательной ценности молока в результате разрушения белков и других его составных частей. Р. Свартлинг и С. Мукерджи (1966) провели аналогичную работу по исследованию температур пастеризации в большем диапазоне, но с меньшей выдержкой, что более соответствует режимам, применяемым при производстве кисломолочных продуктов. Наибольшее угнетение испытывали молочнокислые бактерии в молоке, пастеризованном при $60\text{--}70^\circ\text{C}$ с выдержкой 20 с. В молоке, пастеризованном при $70\text{--}80^\circ\text{C}$ с выдержкой 120 с, при $80\text{--}95^\circ\text{C}$ с выдержкой 20 с и при 100°C с выдержкой 180 с наблюдалась стимуляция молочнокислых бактерий. Х. К. Франк (1969) пришел к выводу, что длительная высокотемпературная обработка молока, применяемая при производстве йогурта, позволяет устранить влияние на микрофлору нерегулируемых факторов, связанных с режимами кормления, периодом лактации, породой животных и др.

Влияние тепловой обработки молока и сливок на качество получаемых сгустков. Этот вопрос не имеет прямого отношения к микробиологии, но поскольку в производственных условиях причиной получения недостаточно плотных или вязких сгустков чаще всего считаются закваски, необходимо коротко на нем остановиться. По характеру получаемых сгустков кисломолочные продукты (за исключением творога) можно разделить на две группы: продукты с ненарушенным сгустком (простокваша, ряженка, кефир, вырабатываемый термостатным способом, и т. д.); продукты с нарушенным сгустком (кефир резервуарный, напитки “Южный”, “Снежок”, сметана и пр.). В производстве продуктов с ненарушенным сгустком требуется получение плотных сгустков, а в производстве продуктов с нарушенным сгустком – наличие определенной вязкости. Для продуктов обеих групп нежелательно отделение сыворотки в процессе хранения. Т. Строгардс (1963) исследовал влияние тепловой обработки на консистенцию йогурта, содержащего 3% жира (закваска *Lbm. bulgari-cum* и *Str. thermophilus*). Молоко в течение 30 мин нагревали при 60 , 63 , 70 , 75 , 80 и 95°C . Максимальная вязкость сгустка и минимальное отделение сыворотки в процессе хранения были получены после тепловой обработки молока при $75\text{--}85^\circ\text{C}$. При этом частично скоагулированные

сывороточные белки включаются в сгусток, который образуется при коагуляции казеина под действием кислоты, в результате этого сгусток становится более плотным. Однако при повышении температуры до 95° С качество сгустков не улучшалось. В этом случае наблюдалась слишком резкая денатурация сывороточного альбумина и других составных частей молока. Т. Е. Гелслоот и Ф. Хаспинг (1969) подтвердили, что сгустки лучшей консистенции получают из молока, подвергнутого нагреванию в танке с 60° до 80–85°С (примерно за 40 мин). Х. Григоровым (1966) установлено, что такая длительная выдержка молока при 85° С влияет на состояние не только сывороточных белков, но и казеина, который коагулирует при рН выше его изоэлектрической точки. В результате молоко, обработанное при высоких температурах, свертывается быстрее.

Обработка молока в стерилизаторе Шторха при 134° С не давала таких хороших результатов, как пастеризация при 80–85° С в течение 30 мин, но оказалась лучше по сравнению с пастеризацией при 90° С в течение 15 с, обработка в стерилизаторе “Альфа-Лаваль” при 150° С в течение 2 с приводила к полному осаждению сывороточных белков (Т. Сторгардс, 1963). В результате обработки молока, гомогенизированного при давлении 10 МПа и температуре 100–103° С без выдержки удалось получить болгарское кислое молоко, которое могло храниться 72 ч без отделения сыворотки (П. Чернев, 1972). В производстве йогурта в промышленных условиях молоко пастеризуют в танке при 85° С в течение 15 мин или при 80° С в течение 30 мин, либо на пластинчатых пастеризаторах при 90–95° С с последующей выдержкой 2 мин. В. В. Глазачев (1960), исследуя влияние различных режимов тепловой обработки на качество сгустков обыкновенной простокваши, пришел к выводам, близким к результатам, полученным Т. Сторгардсом. Сгустки, лучшие по консистенции, получались из молока, пастеризованного при 85–87° С без выдержки; при нагревании до 76–78° С требуется выдержка в течение 30 мин.

При подготовке молока для выработки кефира резервуарным способом наиболее рациональными признаны режимы пастеризации молока при 85–87° С с выдержкой 5–10 мин, при 90–92° С с выдержкой 2–3 мин (В. И. Шершнева и А. Н. Беляев, 1962). Установлено, что лучшая консистенция продукта получается в том случае, если происходит почти полная (около 95% от их общего содержания) денатурация сывороточных белков (Т. Сторгардс, 1963). На практике часто возникает необходимость установить, достаточен ли применяемый режим пастеризации для получения продукта нужной консистенции. С этой целью можно использовать простую пробу: готовый продукт (кефир, простоквашу) фильтруют через бумажный фильтр. Фильтрат

нагревают до 90–95° С; если после этого он остается прозрачным, значит режим тепловой обработки обеспечивает денатурацию сывороточных белков; если же после нагревания в фильтрате выпадают хлопья белка, делают вывод о необходимости повышения температуры или увеличения длительности пастеризации.

Сливки, предназначенные для производства сметаны, рекомендуется пастеризовать при 85–87° С с выдержкой от 15 до 20 с. При такой обработке достигается хорошая гидратация белков и получается сметана с густой, плотной консистенцией (В. В. Глазачев, 1960).

Температурный режимы сквашивания и созревания

Влияние температурных режимов сквашивания и созревания на развитие микроорганизмов закваски. Как правило, при выборе основных параметров технологического режима производства того или иного кисломолочного продукта учитывают оптимальную температуру развития применяемых микроорганизмов. Так, для продуктов, приготовляемых на заквасках мезофильных бактерий (*Str. lactis*, *Str. acetoinicus* и пр.), устанавливают температуры 25–30°С, близкие к оптимальным для развития этих микроорганизмов. При использовании термофильных бактерий (*Str. thermophilus*, *Lbm. bulgaricum* и т. д.) молоко сквашивают при 40–45° С. Сложнее выбирать температурные режимы при использовании смешанных заквасок, в которые входят микроорганизмы с разными температурными оптимумами развития. Известно, что с изменением температуры сквашивания при культивировании кефирных грибков усиливается развитие какой-то одной группы микроорганизмов за счет подавления других. Чем сложнее состав микрофлоры используемой закваски, тем труднее установить закономерность развития входящих в нее микроорганизмов под влиянием температуры. Совместное развитие микроорганизмов разных видов существенно влияет на их свойства и в том числе на отношение к температурам. Температурные границы роста микроорганизмов, развивающихся в чистой культуре, значительно уже, чем в совместной. Естественно, что с изменением температуры в сторону, более благоприятную для роста одного из микроорганизмов, ослабляется развитие другого микроорганизма.

При производстве кисломолочных продуктов, в закваски для которых входят термофильные стрептококки и термофильные молочнокислые палочки, культивируемые совместно, процесс кислотообразования регулируют количеством вносимых заквасок, а также температурой сквашивания и охлаждения. Так, по данным Дж. Петте (1957), полученным

при исследовании йогурта, с повышением температуры сквашивания с 37 до 50° С количество палочек по сравнению со стрептококками увеличивается в 3 раза. То же самое происходит при увеличении количества вносимой закваски с 0,1 до 5,0% (считается, что первоначальное соотношение между палочками и стрептококками в закваске примерно одинаковое).

Созревание кисломолочных продуктов проводят с целью дальнейшего накопления микроорганизмами закваски продуктов обмена (ацид-дофильно-дрожжевое молоко, кефир, кумыс) или с целью придания продукту необходимой консистенции (сметана). Созревание первого типа (биохимическое) почти полностью зависит от деятельности микроорганизмов и в некоторой степени от физических изменений продукта (например, повышение растворимости углекислоты при низких температурах). Чаще всего созреванию подвергают продукты, в которых происходит смешанное брожение – молочнокислое и спиртовое. По мере снижения температуры после сквашивания замедляется активное кислотообразование, но создаются условия для накопления продуктов обмена той части микрофлоры, которая медленнее развивается (дрожжи, уксуснокислые бактерии и пр.).

Влияние температуры сквашивания и созревания на развитие микрофлоры пастеризованного молока и сливок. Температуры сквашивания и созревания существенно влияют на развитие микрофлоры пастеризованного молока незаквасочного происхождения и прежде всего – термоустойчивой молочнокислой палочки. Обладая высоким температурным оптимумом развития в чистой культуре, этот микроорганизм способен развиваться совместно с другими и при сравнительно низких температурах. Однако наблюдается совершенно четкая закономерность интенсификации развития термоустойчивой молочнокислой палочки по мере повышения температуры при производстве различных кисломолочных продуктов. При выработке кефира применяют низкие температуры сквашивания (18–20° С) и еще более низкие температуры созревания. В таких условиях термофильные палочки, входящие в состав кефирной закваски, развиваются плохо. При микроскопировании кефира они почти не обнаруживаются. Однако выдержка образцов кефира при 30–40° С приводит к резкому усилению деятельности палочек, количество которых нередко достигает 40–60% от всей микрофлоры. Этим можно объяснить излишнее нарастание кислотности кефира при повышенных температурах сквашивания и созревания. Творог вырабатывают при 30–32° С. Эти температуры вполне благоприятны для размножения термоустойчивых молочнокислых палочек. Как показали исследования динамики микробиологических процессов, происходящих при производстве творога, в первые 2–3 ч после сквашивания количество

молочнокислых палочек невелико и заметным образом на повышение кислотности они не влияют. Через 4–5 ч после заквашивания количество молочнокислых палочек увеличивается, и с этого момента начинается интенсивное нарастание кислотности, чему способствует также медленный синерезис сгустка и недостаточно быстрое и эффективное охлаждение.

В производстве любительской сметаны приняты высокие температуры сквашивания: от 47° С в начале процесса до 40–37° С в конце. Указанные температуры оптимальны для развития термоустойчивых молочнокислых палочек, в результате чего в любительской сметане эти палочки развиваются весьма интенсивно. Чтобы ограничить их деятельность в производственных условиях, снижают количество вносимой закваски и сокращают продолжительность сквашивания, а также интенсивно охлаждают готовый продукт в момент фасовки. Такие же меры применяют при производстве закваски термофильного стрептококка для южной простокваши и ряженки. При недостаточно эффективном охлаждении готовой закваски и длительной ее выдержке термоустойчивые молочнокислые палочки в ней иногда развиваются настолько интенсивно, что составляют до 50–60% всей микрофлоры. С целью интенсификации технологических процессов часто повышают температуры сквашивания. При этом молоко сквашивается при более низкой кислотности и, следовательно, быстрее. Кроме того, температуры порядка 40°С являются оптимальными для действия сычужного фермента, что имеет большое значение при производстве творога. Однако нельзя забывать о том, что с повышением температуры сквашивания возможна интенсификация развития

термоустойчивых палочек и, следовательно, резкое нарастание кислотности продукта. Поэтому при повышенных температурах необходимо исключительно внимательно следить за точным соблюдением режима технологического процесса (температуры и продолжительности сквашивания, созревания, охлаждения) и эффективностью охлаждения готового продукта. Температура и длительность технологического процесса определяют интенсивность и конечное содержание в кисломолочных продуктах и уксуснокислых бактерий, входящих в закваску только при производстве кефира, в остальных же случаях являющихся посторонней микрофлорой.

Нарушения температурных режимов сквашивания и созревания в ходе технологического процесса и их влияние на развитие микрофлоры.

На производстве часто приходится сталкиваться с резкими отклонениями температурных режимов от установленных инструкцией, в результате чего нарушаются длительность сквашивания, характер

образующегося сгустка и качество получаемого продукта. Температурные режимы чаще всего нарушают во время пуска предприятия или при освоении продукции нового вида. В результате активность микроорганизмов, вводимых с заквасками, резко снижается или излишне интенсифицируется, и в связи с этим нельзя получить продукт с заданными свойствами. Так, на Останкинском молочном комбинате при освоении производства простокваши на линиях, предназначенных для выработки кефира, наблюдалось постоянное замедление процессов сквашивания в термостате. Температура молока в момент заквашивания и температура в термостате поддерживались всегда постоянными. Однако проверка температурных параметров в заквашенном молоке на протяжении всего технологического процесса показала, что из-за большой протяженности трубопровода, идущего от емкости, где заквашивают молоко до разливочной машины, заквашенное молоко быстро охлаждалось (разность температур достигала 12–15°C), вследствие чего, естественно, замедлялось сквашивание.

Недостаточное охлаждение термостатных камер при производстве кефира в летнее время неизбежно приводит к возникновению таких пороков, как излишнее нарастание кислотности (вследствие развития палочек), образование глазков и броженного сгустка (в результате развития дрожжей и ароматообразующих бактерии). В период запуска предприятия нередко приходится сталкиваться с таким явлением, как вспучивание кефирной закваски в ваннах длительной пастеризации. При нормальном состоянии кефирных грибков и грибковой закваски это может быть вследствие пропускания пара через вентили в водяную рубашку. Если одновременно в одной емкости молоко сквашивают, а в другой пастеризуют, то при плохой работе вентиля пар попадает в первую емкость и сквашиваемое молоко нагревается. При достаточно высокой кислотности молока (50–60° Т) сгусток в нижних слоях молока коагулирует и всплывает на поверхность. Создается впечатление, что закваска вспучилась, хотя при микробиологических исследованиях не обнаруживается какой-либо значительной интенсификации жизнедеятельности газообразующих микроорганизмов. Этот дефект можно устранить, установив дополнительные вентили на трубопроводах для подвода пара к ваннам. Кроме того, молоко для закваски целесообразно пастеризовать только после сквашивания предыдущей партии заквасок и подачи холодной воды в водяную рубашку ванны, заполненной готовой закваской.

Температурные режимы охлаждения и хранения кисломолочных продуктов

Кисломолочные продукты, за исключением творога и сметаны, не подлежат длительному хранению. Температуры охлаждения и хранения их выбирают такими, чтобы приостановить по возможности все микробиологические и физико-химические процессы в продукте. Сведения о микробиологических процессах, происходящих при хранении кисломолочных продуктов, крайне ограничены. В иностранной литературе имеются данные о микрофлоре, обнаруживаемой в процессе хранения сыра коттедж – продукта с более высоким рН, чем творог. Эта микрофлора представлена главным образом немолочнокислым психротрофным бактериями родов *Pseudomonas* (70,6%), *Achromobacter* (7,9%), *Flavobacterium* (0,7%). Бактерии группы кишечной палочки составляют около 10%, дрожжи – 0,8% (В. Д. Шульце и Дж. Ц. Ольсон, 1960). При низких температурах хранения порча этого продукта обусловлена главным образом развитием гнилостных процессов. В кисломолочных продуктах вследствие низкого рН обычно создаются условия, неблагоприятные для развития гнилостных микроорганизмов.

Почти все кисломолочные продукты, предназначенные для быстрой реализации, хранят при 8–10° С. При этой температуре значительно подавляется развитие молочнокислых бактерий и сопутствующее ему нарастание кислотности. Однако при малейших нарушениях режимов хранения (повышении температур) в результате развития “диких” термоустойчивых палочек прежде всего излишне повышается кислотность продуктов. Этот порок может возникать также и в том случае, если продолжают развиваться молочнокислые палочки, вводимые с заквасками (ацидофильная и болгарская). При температуре хранения выше 10° С в кисломолочных продуктах могут развиваться дрожжи, вызывающие вспучивание, и уксуснокислые бактерии, которые влияют на изменение вкуса и консистенции продукции.

На поверхности кисломолочных продуктов уже на второй день хранения часто появляются колонии молочной плесени *Oidium lactis*, которая в дальнейшем покрывает пушистым налетом всю поверхность продукта. Особенно часто это наблюдается при хранении простокваши, кефира, сметаны и творога. Л. А. Лыгцевой (1968) установлено постоянное присутствие в твороге как свежеработанном, так и после хранения микрококков, споровых и бесспорных палочек, дрожжей и плесеней. Однако ввиду отсутствия количественной характеристики этих групп (за

исключением микрококков, которые достигали значительных величин) и данных о способности их развития в твороге (особенно гнилостных палочек) трудно сделать вывод о роли этих микроорганизмов в порче творога. Исследованиями, проведенными во ВИИМИ, установлено, что в процессе хранения кисломолочных продуктов, вырабатываемых в производственных условиях по установленной технологии, при 6–8° С в течение 5–7 дней происходило некоторое отмирание полезной микрофлоры, введенной с заквасками. Так, в 1 мл кефира содержание микрофлоры на протяжении 7 суток хранения составляло:

| Микроорганизм | В момент выработки | После хранения |
|---|--------------------|----------------|
| Мезофильных молочнокислых стрептококков | 600 млн. | 250 млн. |
| Ароматообразующих | 82 млн. | 45 млн. |
| Термофильных молочнокислых палочек | 1 млн. | 1 млн. |
| Дрожжей | 200 тыс. | 125 тыс. |
| Уксуснокислых бактерий | 10 тыс. | 10 тыс. |

Из приведенных данных видно, что содержание микроорганизмов до и после хранения находилось в пределах одного порядка. Следовательно, отмирание микроорганизмов можно признать не существенным.

Количество молочнокислых бактерий в ряженке, простокваша и ацидофилине на протяжении 7 суток хранения при 6–8° С также существенно не снижалось и составляло в среднем $6,0 \cdot 10^8$ /мл сразу после выработки и $2,5 \cdot 10^8$ /мл в конце хранения.

Содержание в твороге посторонней микрофлоры (энтерококков, коагулазоположительных стафилококков, липолитических микроорганизмов и дрожжей) за этот период снижалось соответственно с 10^4 до 10^3 – 10^2 мл, плесеней – с 10^3 до 10^2 – 10^1 мл. Во всех кисломолочных продуктах содержание бактерий группы кишечной палочки после хранения снижалось в 10–100 раз. Повышение кислотности сверх установленной технической документацией не наблюдалось при хранении кефира, ряженки, простокваши (мечниковской и южной). Однако кислотность около 30% исследованных образцов к концу хранения находилась на грани этих требований. При хранении ацидофилина излишнее повышение кислотности отмечалось уже к концу одних суток его хранения.

Наиболее обесценивающим показателем, по которому образцы кисломолочных продуктов снимались с хранения, являлось ухудшение в процессе хранения вкуса, вызванное ферментативными процессами – липолизом и протеолизом, а также связанное с особенностями упаковочного материала и изменением консистенции (образование глазков, старение сгустка). Так, у кефира, разлитого в стеклянные бутылки, первые признаки ухудшения консистенции и вкуса (слегка нечистый, иногда дрожжевой) появлялись после 3–4 сут хранения при 6–8° С. Кефир, разлитый в бумажные пакеты, приобретал посторонний привкус уже через 1–2 суток. Сроки сохранения качества кисломолочных продуктов в значительной мере определялись качеством исходного продукта и условиями хранения. Так, при температуре 2–4° С длительность хранения увеличивалась на 1–2 суток.

При длительном хранении замороженного творога количество бактерий группы кишечной палочки, стафилококков и сальмонелл снижается значительно медленнее, чем в твороге, хранящемся при положительных температурах. Количество нежелательных микроорганизмов при –18° С уменьшается медленнее, чем, например, при –10° С. В результате длительного хранения творога при температуре выше –10° С происходят необратимые физико-химические изменения продукта, вследствие чего пищевое и товарное качество его снижается.

Механические воздействия

Механические воздействия, применяемые при производстве кисломолочных продуктов (гомогенизация, перемешивание, перекачивание), могут как прямо, так и косвенно воздействовать на микроорганизмы. Данных о прямом влиянии гомогенизации на микрофлору молока или сливок в литературе нам найти не удалось. По нашим наблюдениям, гомогенизация может оказать существенное косвенное влияние на состав микрофлоры продукции, подвергаемой гомогенизации, если гомогенизация предусмотрена после пастеризации. Дело в том, что оптимальные температуры, установленные для гомогенизации, как правило, ниже температур пастеризации: для сливок 60–70° С, для молока 50–60°С (В. Вайткус, 1960). Если производительность гомогенизатора превышает производительность пастеризационной установки, то после пастеризатора устанавливают промежуточную емкость для накопления продукта (чаще сливок) перед гомогенизацией. В этом случае продукт длительное время (2–3 ч) находится в промежуточной емкости при температуре около 50° С. При этой температуре создаются условия для развития в сливках оставшихся после пастеризации термоустойчивых молочнокислых палочек, которые в

дальнейшем значительно влияют на качество получаемого продукта. Поэтому с точки зрения микробиологии проведение гомогенизации после пастеризации нельзя признать целесообразным.

Принято считать, что плотность сгустков кисломолочных продуктов обусловлена исключительно деятельностью заквасок. Однако наблюдения в производственных условиях показывают, что в результате применения заквасок, подобранных с учетом их консистенции и способности к образованию вязких сгустков, не всегда можно получить продукты с повышенной плотностью (любительская сметана и пр.). Так, при производстве любительской сметаны с использованием одной и той же комбинации заквасок наблюдались значительные расхождения в консистенции готового продукта. Иногда причиной этого были нарушения режимов гомогенизации, что легко установить микроскопированием продукта. Т. Строгардс (1963) подчеркивает, что при правильном сочетании гомогенизации и тепловой обработки значительно улучшается консистенция кисломолочных продуктов. Аналогичные выводы при производстве йогурта были сделаны Б. Гилмаром (1972) и П. Черновым (1972). Советскими исследователями оптимальное сочетание тепловой обработки и гомогенизации молока установлено при производстве кефира.

При перекачивании закваски и готовых кисломолочных продуктов возможно обсеменение их посторонними микроорганизмами, если насосы моют недостаточно тщательно. При тщательном уходе насосы можно применять в производстве кисломолочных продуктов как для подачи закваски в ванны для заквашивания, так и для перекачивания готового продукта. Это подтверждается многолетним опытом работы с заквасками на Останкинском комбинате и заводе имени Горького (Москва), и на других предприятиях, где закваску транспортируют насосами.

Степень перемешивания сгустка при резервуарном способе влияет на консистенцию готового продукта. Т. Сторгардс (1963) указывает, что наилучшие результаты можно получить, если сквашенное молоко обрабатывать только до тех пор, пока не получится полностью гомогенный, вязкий продукт. При более грубой обработке снижаются стабильность сгустка и усиливается отделение сыворотки. При чрезмерно осторожном перемешивании в продукте наблюдалось наличие комочков и отделение сыворотки. Исключительно большое значение имеет правильный выбор режимов перемешивания при производстве кефира.

Тема 8. МИКРОБИОЛОГИЯ РЫБЫ И РЫБНЫХ ПРОДУКТОВ

Производство пищевых продуктов, особенно рыбных, требует соблюдения высокой санитарной культуры на всех этапах технологического процесса. Кулинарные и копченые изделия имеют ограниченные сроки хранения, поэтому микробиологический контроль этих продуктов носит чисто профилактический характер и должен способствовать улучшению санитарного состояния производства, а, следовательно, сохранению качества готового продукта и профилактике пищевых заболеваний.

В настоящее время нет единых методических указаний и рекомендаций по микробиологическому исследованию кулинарных, копченых рыбных продуктов и вспомогательных материалов. Нет литературы, которая характеризовала бы присущую рыбе микрофлору и ее изменение в зависимости от процессов обработки и условий хранения.

Тема 8.1. ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ.

В пищевой, особенно рыбной, промышленности наибольшую опасность представляют микробы, вызывающие гниение, т. е. глубокое расщепление белка, сопровождающееся образованием дурно пахнущих продуктов.

Количество и жизнедеятельность микробов зависят от условий существования (питания, температуры, влажности).

По характеру питания микробы делятся на автотрофные, питающиеся минеральными веществами, и гетеротрофные, питающиеся готовыми органическими соединениями. Гетеротрофные микробы делятся на сапрофиты (метатрофы), разлагающие органические вещества в природе и вызывающие порчу пищевых продуктов, и паразиты (паратрофы), развивающиеся в теле других организмов и питающиеся сложными органическими веществами. К группе паразитов относятся разнообразные возбудители заболеваний человека и животных.

По типу дыхания микробы делятся на аэробы, развивающиеся только при доступе кислорода воздуха, и анаэробы, не нуждающиеся в кислороде воздуха. Анаэробные микробы подразделяются на облигатные, для которых кислород вреден, и факультативные, которые могут жить как при доступе воздуха, так и без него. Температура является одним из наиболее важных факторов, влияющих на жизнедеятельность микробов.

По отношению к температуре микробы подразделяют на три группы мезофилы, психрофилы и термофилы.

Большинство микробов, находящихся в стадии активного размножения (вегетативная стадия), погибает при температуре около 70°C за 1–5 мин. Споры некоторых бактерий выдерживают кипячение в течение нескольких часов. Во влажной среде споры бактерий погибают при 120°C через 20–30 мин, а в сухой – при $160\text{--}170^{\circ}\text{C}$ через 1–2 ч. Споры большинства дрожжей и плесеней менее устойчивы к воздействию высоких температур, чем споры бактерий и быстро погибают при нагревании до $65\text{--}80^{\circ}\text{C}$.

Влияние температуры на жизнедеятельность микробов обуславливает возможность хранения пищевых продуктов (рыба, мясо и др.) при пониженных температурах, замедляющих размножение микробов и угнетающих деятельность ферментов. Наблюдения показывают, что количество микробов, погибших при замораживании продуктов, нередко достигает 80–90% от их первоначального содержания. Микроорганизмы, оставшиеся в живых, вначале инактивируются холодом, но при дальнейшем хранении охлажденного или замороженного продукта при температуре не ниже минус 8°C их жизнедеятельность постепенно восстанавливается. Губительно действуют на микробы повторное замораживание и оттаивание продукта.

Большое влияние на жизнедеятельность микробов оказывает влажность среды. В результате высушивания продукта останавливается развитие многих видов содержащихся в нем микробов, так как при отсутствии воды они не могут питаться. Так, минимум содержания влаги в среде обитания для развития бактерии составляет 30%, а для многих плесеней – около 13%. Споры некоторых плесневых грибов сохраняют способность к прорастанию при отсутствии влаги в течение нескольких лет.

Жизнедеятельность микроорганизмов зависит также от реакции среды; наиболее благоприятной для большинства бактерий является нейтральная или слабощелочная, а для плесневых грибов и дрожжей – слабокислая реакция среды. Оптимум концентрации водородных ионов (рН) для патогенных бактерий находится в пределах от 7,0 до 7,6, для грибов и дрожжей от 3 до 6,0. С повышением температуры реакция среды изменяется, так как диссоциация кислот усиливается. Изменяя реакцию среды, можно подавлять или стимулировать развитие микробов, что имеет большое практическое значение.

Большинство бактерий мало чувствительны к изменениям концентрации раствора хлористого натрия в пределах от 0,5 до 3%. Ряд морских бактерий, адаптированных к морской воде, содержащей

приблизительно 3,5% хлористого натрия, весьма чувствительны как к более низким, так и к более высоким его концентрациям. Существуют бактерии, которые адаптировались к среде с высокой концентрацией хлористого натрия (около 29%). Такие микроорганизмы называются галофилами, или солелюбивыми. Многие гнилостные бактерии прекращают свое развитие при 10%-ной концентрации хлористого натрия в сред. Микроорганизмы постепенно приспосабливаются к соленой среде, особенно если находятся в ней длительное время.

Галофильная микрофлора присутствует во многих пищевых продуктах и может вызывать их порчу. По данным Д. Ишиды к другим, галофилы могут развиваться при низкой концентрации хлористого натрия в условиях низких температур. Однако неизвестно, все ли галотолерантные бактерии обладают этой способностью.

Некоторые патогенные микроорганизмы более чувствительны к действию крепких растворов хлористого натрия, чем сапрофитные, а палочковидные более чувствительны, чем кокки. Пленчатые дрожжи развиваются даже в 24%-ных растворах хлористого натрия.

Эффективность воздействия ультрафиолетовых лучей на микробы зависит от дозы облучения. Под действием ультрафиолетовых лучей через несколько минут погибают не только вегетативные формы бактерий, но и споры, для уничтожения которых требуется энергии в 4–5 раз больше. Ультрафиолетовое излучение используют для борьбы с болезнетворными микробами (в воде, воздухе, на предметах обихода), а также микробами, вызывающими порчу продуктов.

Тема 8.2. МИКРООРГАНИЗМЫ, НАИБОЛЕЕ ЧАСТО ВСТРЕЧАЮЩИЕСЯ В РЫБЕ И РЫБНЫХ ПРОДУКТАХ.

На поверхности рыбы часто обнаруживаются спорообразующие и бесспорные палочки, микрококки, сарцины и некоторые обитающие в воде дрожжи и плесени. Преобладают психрофилы – *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Proteus vulgaris*, бактерии группы кишечной палочки и др.

Pseudomonas – гнилостные палочковидные неспорные грамотрицательные подвижные с полярными жгутиками аэробные бактерии, образующие на мясопептонном агаре бесцветные, просвечивающие или полупрозрачные колонии. Культуры могут быть окрашенными или бесцветными. Многие штаммы психрофильных бактерий начинают отмирать уже при 37° С. Рост бактерий задерживается при рН ниже 5,5 и при содержании хлористого натрия более 5-8%

Ряд представителей *Pseudomonas* (флуоресцирующие бактерии) изменяют цвет среды – вызывают ее позеленение или побурение.

Отличительным признаком *Pseudomonas* и *Achromobacter* среди других грамотрицательных бактерий является их отношение к антибиотикам (пенициллину, стрептомицину и хлорамфени-колу). Между собой *Pseudomonas* и *Achromobacter* различаются по их отношению к тетрациклину и пенициллину.

К числу главных возбудителей порчи рыбных продуктов при холодильном хранении относятся *Ps. putrefaciens*, *Ps. fragi*, *Ps. fluorescens*.

Achromobacter – аэробные грамотрицательные, неспоровые, за небольшим исключением неподвижные, не окрашивающие среду, короткие, толстые или кокковидные, одиночные или соединенные в пары или короткие цепочки палочки, образующие сероватые или серовато-белые непрозрачные колонии на агаре. Большинство из них чувствительны к пенициллину, окситетрациклину и малочувствительны к хлортетрациклину, чувствительны к углекислоте, относительно устойчивы к облучению. Многие виды обладают способностью расщеплять белки. Почти все они – сапрофиты, свободно живущие в морях на ракообразных, рыбах и моллюсках.

Pseudomonas и *Achromobacter* являются главными возбудителями порчи белковых продуктов при хранении на холодильнике. Порча может быть вызвана как протеолитическими, так и не протеолитическими формами бактерий.

Бактерии группы кишечной палочки имеют санитарно-показательное значение, относятся к условно-патогенным микроорганизмам.

Escherichia coli – наиболее типичный представитель фекальных бактерий, всегда находится в кишечнике здоровых людей, животных и насекомых, представляет собой короткие подвижные полиморфные грамотрицательные палочки и является факультативным аэробом. Спор не образует. Оптимальная температура роста 37° С. Колонии бывают гладкой или шероховатой формы.

Escherichia aerogenes (coli-aerogenes) – факультативные аэробы. Среди них встречаются холодоустойчивые мезофильные (психротроф-ные) бактерии, которые хорошо растут при 1,5° С (а некоторые при минус 1,5°С). Однако для большинства бактерий этой группы оптимальная температура роста около 37 С. Психротрофные *Coli-aerogenes* при инкубации в течение 48 ч при 43° С не развиваются. Поэтому при дифференцировании рекомендуется выращивать их на твердом скошенном агаре при 43+;0,1°С в течение 24 ч. Не растущие при этой температуре бактерии принято относить к психротрофным *Coli-aerogenes*.

Бактерии группы кишечной палочки различаются лишь по давности выделения из кишечника во внешнюю среду. *E. coli* отличается от других представителей этой группы тем, что не обладает способностью использовать цитрат в качестве источника углерода вместо глюкозы.

Бактерии группы Proteus – факультативные анаэробные грам-отрицательные палочки являются сапрофитами, живут в воде и почве и часто встречаются в разлагающихся остатках животного и растительного происхождения. Участие протей в гнилостных процессах начинается с разложения полипептидов. Культуры протей обычно зловонны. Колонии многих штаммов способны образовывать на влажной поверхности твердой питательной среды тонкий, серый ползущий (вуалеобразный) рост. О-форма – неподвижные клетки, лишенные жгутиков и образующие мелкие изолированные колонии.

Температурные границы роста бактерий группы протей лежат в пределах от 10 до 40° С! Нагревание при 60° С в течение 2 мин не убивает бактерий группы протей. Нагревание при 80° С в течение 5 мин губительно для микроба. Замораживание даже с последующим оттаиванием не убивает бактерии группы протей. *Proteus vulgaris* - подвижная, полиморфная, бесспорная, грамотрицательная палочка. Оптимум температуры роста 37° С, хорошо растет и при комнатной температуре. Попадая на белковые продукты при благоприятных условиях, вызывает их порчу.

Proteus – условно патогенный микроорганизм. Пищевые токсикоинфекции, вызванные микробами группы протей, возникают преимущественно при употреблении рыбных и мясных блюд, особенно измельченных.

Энтерококки (фекальные стрептококки) располагаются в парах в виде диплококков; концы, обращенные наружу, часто заострены, бывают окружены общим светлым ареолом, спор не образуют, в жидких средах составляют короткие цепочки. Обнаруживаются в воде, почве, пищевых продуктах. Основным источником является кишечник человека. Часто образуют скопления, напоминающие скопления микрококков. Хорошо растут при 22–40° С. Выдерживают нагрев до температуры 60° С и концентрацию поваренной соли 6,5% [63]. Рост фекальных стрептококков отмечается в среде с концентрацией хлористого натрия более 20%. Практически бывает достаточно определения стабильных признаков (рост в среде, содержащей 40% желчи, и в среде с рН 9,6–10,2 свидетельствует о принадлежности к группе энтерококков). Довольно широко распространены в воде, почве и пищевых продуктах. Особенностью энтерококков, отличающей их от других

стрептококков, является высокая устойчивость к воздействиям различных факторов. В ряде стран (Франция, США и др.) энтерококки наряду с кишечной палочкой официально приняты как санитарно-показательные микроорганизмы для воды. Энтерококки устойчивы к кислой среде (порог их роста колеблется в пределах от 3–3,5 до 12 и более).

Энтерококки выживают при замораживании и холодильном хранении различных продуктов, тогда как *E. coli* и другие коли-

формы не выдерживают обработки холодом. Это свидетельствует о том, что присутствие энтерококков может быть хорошим показателем для оценки фекального загрязнения, особенно в замороженных продуктах.

Сальмонеллы (Salmonella) – это небольшие грамтрицатгльные подвижные палочки с закругленными краями. Спор не образуют. Располагаются поодиночке, редко в виде коротких нитей. На агаре образуют небольшие круглые колонии. Оптимальная температура роста 37° С, реакция среды слабощелочная (рН 7,2-7,4).

Сальмонеллы – факультативные анаэробы и, следовательно, могут размножаться при ограниченном доступе воздуха. На поверхности продукта в обычных условиях его хранения размножение сальмонелл подавляется аэробами. Обладают сравнительно высокой степенью устойчивости к воздействию различных факторов внешней среды. По данным Д. Георгала, самая низкая температура, при которой сальмонелла растет, минус 7° С. В замороженной рыбе с 10%-ным заражением сальмонеллами, последние выживали при минус 17,8° С в течение года. Сальмонелла длительное время переносит низкие температуры, во льду сохраняется неделями и даже месяцами.

При температуре минус 18°С отмирание бактерий группы сальмонелла, как и других, протекает медленнее, чем при минус 10° С или более высокой. Замораживание и оттаивание губительно действует на них. В 29%-ном растворе хлористого натрия при температуре 6–12°С *S. paratyphi* остаются жизнеспособными до четырех, а *S. enteritidis* до восьми месяцев.

Сальмонеллы чувствительны к тепловой обработке. При температуре 60–65° С гибнут через 30–60 мин. Быстро гибнут под действием света, особенно ультрафиолетовых лучей, более чувствительны к облучению, чем стафилококки, и менее чувствительны, чем бактерии группы кишечной палочки.

Среди разнообразных микроорганизмов, вызывающих токсикоинфекции у людей, бактерии рода сальмонелла занимают значительное место. Известны случаи передачи сальмонеллезов при употреблении копченой рыбы, в частности сига.

Анаэробные спорообразующие. Наиболее характерны для рыбы следующие представители.

Clostridium sporogenes – крупные подвижные палочки с закругленными концами, расположенные одиночно, реже короткими цепочками. Споры овальные, превышают диаметр палочки. Выдерживают нагревание при 100°C в течение 1–2 ч. Оптимальная температура роста *Cl. sporogenes* 37° С, но может расти при 50°C. Разлагает белок с образованием сероводорода, не патогенна.

Cl. putrificum – тонкие, длинные, подвижные палочки; расположены одиночно, иногда цепочками, грамположительные, образуют крупные шарообразные или слегка овальные споры, располагающиеся на конце клетки. Разлагает белки в анаэробных условиях с выделением большого количества газа. Оптимум температуры роста 35–37° С, строгий анаэроб.

Cl. perfringens – крупные, довольно толстые, иногда искривленные, неподвижные палочки с резко обрезанными или слегка закругленными концами, располагающиеся одиночно и парами, грамположительные. Споры овальные, расположенные центрально или субтерминально, в свежих культурах встречаются редко.

В старых культурах клетки довольно полиморфны. Оптимальная температура роста *Cl. perfringens* 35–37° С. Устойчивость спор к нагреванию при 100°C у разных типов различная (от 8 до 90 мин). По наблюдениям Ю. Пивоварова, 15 выделенных штаммов выдерживают кипячение в течение 1 ч и более. *Cl. perfringens* – патогенный анаэроб–возбудитель газовой гангрены, встречается в почве, в воде, в разлагающихся продуктах. В пищевых продуктах *Cl. perfringens* размножается только при температуре 18–20° С и выше.

После хранения в течение 6–8 ч по мере увеличения общего бактериального обсеменения размножение *Cl. perfringens* замедляется, а затем прекращается. В продуктах, зараженных после термической обработки, интенсивно размножается ввиду уничтожения сапрофитной микрофлоры и образует токсин. При этом органолептические свойства продукта не изменяются. При 10 и 15%-ной концентрации поваренной соли *Cl. perfringens* не размножается. Видимо пороговой является концентрация хлористого натрия 8% при температуре, близкой к оптимальной для этого микроорганизма. Споры сохраняются при 20%-ной концентрации хлористого натрия до 30 суток.

Опыты по выживанию и спорообразованию *Cl. perfringens* в свежей и соленой сельди показали, что увеличение жирности и концентрации хлористого натрия действуют неблагоприятно на развитие *Cl. perfringens*.

Устойчив к концентрациям сахара до 20%. Нитриты и нитраты почти не влияют на размножение *Cl. perfringens*. Задержка роста наблюдается в растворах, содержащих нитрат в количестве 10 мг% и выше. Коптильная жидкость слабо влияет на размножение *Cl. perfringens*. Сочетание коптильной жидкости с другими факторами предотвращает размножение *Cl. perfringens* в готовых копченых изделиях. Наиболее благоприятны для развития рН 5,0 – 8,0 и температура 45 – 46° С. При низких температурах (2 – 4° С) рост *Cl. perfringens* не выявляется. Выживаемость бактерий вида *Cl. perfringens* при замораживании зависит от того, в каком состоянии (активном или пассивном) они находились до замораживания.

В настоящее время известно шесть типов *Cl. perfringens*: А, В, С, D, Е, F. Чаще встречаются и лучше изучены пищевые токси-коинфекции, вызываемые *Cl. perfringens* типа А.

Cl. botulinum – строгий облигатный анаэроб. Палочки с закругленными концами, подвижные, образующие крупные овальные субтерминальные или терминальные споры, которые приобретают вид теннисных ракеток. Микробы подвижны, при доступе воздуха подвижность ослабевает. Молодые клетки окрашиваются грамположительно, а через четверо-пятеро суток – грамотрицательно.

Оптимум роста при 35–37°С и рН 4,8–8, но растет и при 55° С; *Cl. botulinum* выделяет сильный бактериальный яд – токсин. В настоящее время известно 6 типов возбудителей ботулизма: А, В, С, D, Е, F. Для организма человека представляют опасность микробы типов А, В, Е и F. Большая часть спор способна выдерживать нагревание при 100° С в течение 2–3 ч .

Возбудители ботулизма – строгие анаэробы и поэтому быстро развиваются внутри крупных кусков рыбы, в ветчине, колбасе или в консервах. Споры *Cl. botulinum* в замороженном состоянии сохраняются и после прорастания способны вырабатывать токсин.

По данным многих авторов, большую опасность в отношении ботулизма представляет рыба. При исследовании К. Матвеевым более 1000 экземпляров свежей и соленой красной рыбы возбудители ботулизма были обнаружены в 1,9–14% образцов. Это объясняется различием в санитарных условиях обработки, транспортировки и хранения рыбы. Возбудители ботулизма, оставшиеся в продукте после термической обработки, могут размножаться в нем в процессе остывания и образовывать токсин.

Во время хранения на холодильнике при 4°С и ниже образование токсина не происходит. В пищевых продуктах с плотной консистенцией возможно гнездное накопление токсина. Сравнительно редкие случаи ботулизма у людей объясняются тем, что сочетание условий,

благоприятствующих размножению палочки ботулинуса в пищевом продукте, встречается редко.

Аэробные спорообразующие. *Bac. subtilis* (сенная палочка) – подвижная палочка с закругленными краями, располагающаяся одиночно или длинными цепочками, иногда называемыми стрептобациллами .

Образует овальные споры. Оптимальная температура роста 37–50° С. На агаре образует зубчатые колонии сероватого цвета. Активно расщепляет азотистые соединения с выделением аммиака.

Bac. mesentericus (картофельная палочка) – палочки с закругленными концами, располагающиеся одиночно, парно или короткими цепочками, перетрихальноподвижные, грамположительные. Образует овальные споры, располагающиеся в любой части клетки. Оптимальная температура роста 36–45° С. На агаре растет в виде тонких, сухих, морщинистых колоний. При разложении белка образует большое количество сероводорода.

Bac. mycoides (грибовидный) – толстые длинные палочки, располагающиеся одиночно или в цепочках, подвижные, грамположительные. Образует овальные споры разной величины. На агаре дает ветвящиеся колонии, напоминающие мицелий гриба. При разложении белка выделяет аммиак. Оптимум температуры роста 30° С.

Bac. cereus – аэробная подвижная грамположительная палочка, по морфологическим и культуральным признакам напоминающая *mycoides*. Быстро образует центральные споры.

Двухсуточная культура на 25–50% представлена спорами, которые выдерживают прогревание при 105–125° С в течение 10–13 мин. На агаре растет в виде плотных, круглых, выпуклых, преломляющих свет, воскоподобных колоний. *Bac. cereus* принадлежит к микроорганизмам, устойчивым как к температурам от 5 до 70° С, так и к другим консервирующим факторам. По данным Л. Прокоповой, может расти в средах, содержащих до 12% хлористого натрия, при рН от 4,6–6,0 до 11,0. Большое количество жира и сахара в среде, а также температура 4–6° С тормозят размножение *B. cereus*. В ряде стран Европы и в Японии отмечаются случаи пищевых отравлений, вызванные *Bac. cereus*.

Bac. megatherium – толстые, длинные, подвижные, грамположительные палочки, расположенные одиночно, цепочками и в виде нитей. Образует овальные или продолговатые споры, располагающиеся эксцентралью. Прорастание спор полярное; оптимум температуры роста 35° С, хорошо растут при 45–50° С. На агаре образует слизистые выпуклые колонии и большое количество сероводорода.

Стафилококки – грамположительные, небольшие клетки шаро-

видной формы, примерно одинаковой величины. Образуют круглые с ровными краями колонии белого, желтого или золотистого цвета. Оптимальная температура роста 37° С. Стафилококки устойчивы к действию физических и химических факторов, выдерживают нагревание при 70° С в течение 1 ч.

Термическая обработка пищевых продуктов вызывает гибель стафилококков лишь при условии достаточной ее интенсивности и продолжительности – при температуре 75–80° С отмирают лишь через 20–30 мин, а в некоторых случаях требуется прогрев продукта даже при 85° С. Известно, что стафилококки выдерживают нагревание при 100° С в течение 35 мин (консервы в масле). Стафилококки по максимальной и минимальной температуре роста отличаются от микрококков. Хотя стафилококки не растут при 0° С, они устойчивы к холоду и выживают длительное время в замороженных средах. Размножение стафилококков задерживается при понижении рН среды до 6,2 или повышении ее до 7,4. Стафилококки устойчивы к высокой концентрации хлористого натрия (до 10% и более). Хорошо переносят высушивание.

Стафилококки широко распространены в природе, их можно найти на коже человека, в воздухе, почве и на других объектах. Отдельные виды патогенны для человека. Г. Гоббс отмечает, что в носоглотке здорового человека коагулазоположительные стафилококки составляют 30–60%, на руках 15–20% от всего количества бактерий. В большом количестве стафилококки содержатся в гнойничках и нарывах и легко передаются человеком. Стафилококки, особенно золотистые, вырабатывают экзотоксин. Некоторые штаммы образуют энтеротоксин, вызывающий острый гастроэнтерит. По данным Д. Моссея и других, для образования токсина, вызывающего отравление, требуется минимум 600 тыс. коагулазоположительных стафилококков на 1 г продукта. Некоторые микроорганизмы, например, *Proteus vulgaris*, *Esch. coli*, *Pseudomonas* молочнокислые, задерживают рост стафилококков.

При санитарно-микробиологических исследованиях учитывают только типичные коагулазопозитивные штаммы стафилококков.

Тема 8.3. ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНАЯ ОЦЕНКА РЫБЫ

Гигиена первичной обработки и консервирования рыбы. Методы обработки и хранения рыбы меняются в зависимости от места и способа лова, количества и вида рыбы и имеющихся технических возможностей. Следует избегать воздействия на рыбу прямых солнечных лучей, механических повреждений в процессе лова, транспортировки, выгрузки и

обработки.

Внутренние органы рыбы необходимо удалять как можно быстрее и полностью, чтобы предупредить действие ферментов и микроорганизмов, содержащихся в желудке и кишечнике.

Если быстро провести потрошение невозможно, то пойманную рыбу необходимо промыть, охладить в тающем льду или в холодной воде и хранить при постоянной температуре.

Заморозка рыбы почти полностью замедляет размножение бактерий. Однако некоторые психрофильные микроорганизмы сохраняют жизнедеятельность благодаря защитному действию жиров и протеинов и могут впоследствии привести к порче рыбного продукта.

В процессе обработки, разгрузки и продажи рыбы на рынке особое внимание следует уделять предупреждению контаминации патогенной микрофлорой или заражения вследствие прямого или косвенного контакта с крысами, птицей, домашними животными и т. д. Дальнейшая контаминация микроорганизмами возможна на различных стадиях обработки, а также в результате размножения энтеропатогенных кишечных палочек.

Обработка рыбы включает такие методы, как охлаждение, заморозка, консервирование, посол, копчение, вяление, а также производство кулинарных продуктов. Все технологические процессы рыба должна проходить быстро, с тем чтобы избежать ненужного повышения температуры. Для обеспечения наименьшего загрязнения полуфабриката необходимо осуществлять мероприятия по улучшению санитарного состояния помещений и технологического оборудования в соответствии с существующими правилами.

Охлаждение и филетирование. Поступающую в продажу рыбу, в виде тушек или филетированную, по возможности хранят при температуре около 0°C. Несмотря на то что существуют машины для изготовления филе, немалая часть рыбного филе до сих пор делается вручную. В таких случаях рекомендуется помещать обрабатываемую рыбу в лоток с холодной проточной водой. Блоки филе должны быть вымыты и упакованы вместе со льдом или заморожены. Не следует использовать лотки с непроточной водой комнатной температуры, поскольку такая практика ведет к размножению огромного количества бактерий, заражающих рыбное филе.

Механизированное филетирование – в целом более приемлемый технологический процесс, но многие машины трудно сохранять чистыми. Чтобы избежать накопления остатков рыбы, слизи и сопутствующих им микроорганизмов, машины приходится часто мыть, чистить и

дезинфицировать. В некоторых странах для увеличения срока хранения охлажденной рыбы разрешается применять антибиотики.

Заморозка и дефростация. Обычно при заморозке и холодном хранении рыба почти не загрязняется микроорганизмами. Вместе с тем, когда эти процессы должным образом не налажены и не контролируются, качество рыбы может ухудшаться, например из-за изменений в тканях.

Замороженную рыбу обычно оттаивают при комнатной температуре, или в нагретом воздухе, или в теплой воде. Однако если процесс оттаивания проходит без тщательного контроля, то рыба в процессе размораживания может оказаться зараженной быстро размножившимися бактериями. Обычно это мезофильные (в основном вызывающие протухание рыбы) бактерии, которые быстро заражают последующие партии рыбы.

При замораживании и холодном хранении погибают различные паразиты рыб. Поэтому рыбу из районов, не благополучных по гельминтозам, необходимо при первой же возможности замораживать.

Посола применяют часто при изготовлении тех рыбных продуктов, которые употребляют в пищу без кулинарной обработки. Несмотря на то что высокое содержание поваренной соли в большинстве рыбных продуктов препятствует размножению бактерий, для некоторых видов рыбной продукции требуется тщательная термическая обработка.

Концентрация поваренной соли, равная 9–10 %, подавляет размножение всех известных вызывающих пищевые отравления бактерий, за исключением *Staphylococcus aureus*. Вместе с тем соленая рыба портится в результате развития галофильных бактерий и галофильных плесневых грибов из родов *Sporonema* и *Oospora*. Оба возбудителя попадают на рыбу из соли, использовавшейся для посола. Однако с этими видами микроорганизмов легко бороться путем хранения продукта в холодильных камерах.

Если предусмотрена ферментация соленого рыбного продукта, то ее следует тщательно контролировать с тем, чтобы предупредить размножение нежелательных, способствующих порче продукта микроорганизмов.

Копчение. Главная цель копчения заключается не в сохранении рыбы, а в придании ей определенного вкуса, запаха, цвета. Коптят рыбу как целую, так и потрошеную. Обычно перед копчением ее выдерживают в соленом растворе. Наиболее распространен метод холодного копчения, при котором рыбу подвергают дымовой обработке при температуре 15–30 °С, и горячего копчения, когда температура обрабатываемой рыбы достигает 90 °С. В процессе копчения микрофлора рыбы существенным образом изменяется, преобладают грамположительные коринобактерии и микрококки.

Большинство перечисленных микроорганизмов содержится в рыбе, в соли или в емкостях для посола.

Копченая рыба при хранении портится вследствие протеолитической деятельности этих микроорганизмов, хотя химическое окисление жиров в этом отношении также может играть значительную роль. Кроме того, копченая рыба подвергается порче в результате заражения плесневыми грибами, в том числе видами *Penicillium* spp., и другими микроорганизмами.

В копченой рыбе обнаруживают такие вызывающие пищевые отравления бактерии, как *Staphylococcus aureus*, *Cl. botulinum*, *Cl. perfringens*. При достаточно низком содержании соли они могут развиваться и вырабатывать токсин независимо от того, законсервирован продукт в вакууме или

нет. Употребление продукта в пищу без предварительной термической обработки может вызвать заболевание людей. Соль и копчение подавляют обычную микрофлору, вызывающую порчу рыбы, но *Cl. botulinum* и некоторые другие бактерии нередко сохраняют способность размножаться. Такие рыбные продукты становятся высокотоксичными при сохранении хороших органолептических свойств, так как некоторые продуцирующие токсин типы *Cl. botulinum* непротеолитичны (тип E).

Вяленая и сушеная рыба. Хотя высушивание и подавляет жизнедеятельность микроорганизмов, вызывающих пищевые отравления, однако действие этого процесса на микрофлору ограничено. Опасность может представлять и вторичное заражение другими болезнетворными микробами, особенно при вялении на открытом воздухе. В процессе вяления рыбу нельзя класть на землю, необходимо обратить внимание на условия хранения готовой продукции и упаковочный материал. Экономически оправданна механическая технология вяления и сушки рыбы.

Маринады. Консервантами в маринадах являются кислота и соль. Для предупреждения развития бактерий, вызывающих пищевые отравления, pH продукта должен быть ниже 4,5. Однако даже при этих условиях бактерии способны выживать в маринадах, поэтому их подвергают термической обработке. Важно не допускать повторного заражения.

Консервы представляют собой изделия, стерилизация которых достигается за счет тепловой обработки, что позволяет увеличить продолжительность сохранения их качества. Гарантируемый срок хранения консервов достигает 1 года при температуре от -3 до $+25$ °C.

В консервируемом продукте содержится микрофлора мяса рыбы, которая вносится с добавочными продуктами и пряностями, а также во время переработки. Поэтому продукт следует стерилизовать сразу же после

герметизации, что позволит уничтожить микроорганизмы и их споры (например, *Cl. botulinum*, *Cl. perfringens*, *Cl. sporogenes*, *Bac. subtilis*, *Bac. cereus* и др.).

Пресервы представляют собой изделия из свежей или замороженной пресноводной рыбы или их частей, из которых после пропаривания, проваривания или жарения или без предварительной обработки приготавливают продукт с настоем, соусами, кремами или готовят желе. Хорошо сохраняется продукция после термической обработки (температура внутри консервной банки не должна превышать 100 °С) в воздухо непроницаемом сосуде.

Как правило, споры родов *Clostridium* и *Bacillus*, а также некоторые термоустойчивые кокки, лактобациллы, дрожжи и плесневые грибы могут выдержать пастеризацию, однако в 1 г изделия их содержится 10^4 . Размножение микробов подавляется также добавлением 0,9 % уксусной кислоты.

Икра. Консервируют ее солью. Микрофлора состоит из психрофильных микробов. В икру они попадают после смерти рыбы. Кроме того, в икре обнаруживаются кокки, бактерии группы кишечных палочек, а также дрожжи и плесневые грибы.

Не исключается обсеменение икры *Cl. botulinum*, *Cl. perfringens* и другими патогенными микроорганизмами, выделяемыми из пресноводных рыб. На процесс созревания икры большое влияние оказывают кокки.

Психрофильные микробы вызывают интенсивный процесс гниения с образованием сероводорода и аммиака, а кокки – нежелательное брожение. В герметически закупоренных банках с икрой брожение вызывает бомбаж. Заплесневелая икра имеет зеленоватый оттенок и спертый, неприятный запах.

Сырая рыба. Рыбу, предназначенную для употребления в сыром виде, запрещается вылавливать из водоемов с недопустимым уровнем загрязнения сточными водами и другими контаминантами. Она должна отвечать требованиям гигиены на всех стадиях лова, транспортировки, хранения и обработки. Особое внимание следует уделять профилактике вторичного загрязнения. Такую рыбу после вылова немедленно доставляют потребителю.

Рыбный фарш приготавливают из тщательно отделенного от костей и деструктированного мяса свежельвленной рыбы. Процесс изготовления включает грубое или тонкое измельчение, фасовку фарша в соответствующие емкости (полиэтиленовые пакеты), а также замораживание.

Вследствие сильного измельчения и высокого содержания влаги фарш представляет из себя хорошую питательную среду для бактерий. Поэтому во

время переработки рыбу следует постоянно охлаждать и после завершения обработки сразу же замораживать. В исключительных случаях для уменьшения содержания микробов фарш перед замораживанием варят.

При производстве и хранении рыбного фарша необходимо учитывать следующие микробиологические показатели.

Сальмонеллы Не обнаруживаются в 25 г

Шигеллы То же

Коагулазоположительные стафилококки Не обнаруживаются в 10 г

Клостридии, восстанавливающие сульфит То же

Кулинарные изделия. В результате тепловой обработки рыбных кулинарных изделий значительно снижается общая обсемененность продуктов, однако обработка менее эффективно действует на клостридиальную и стафилококковую микрофлору, вызывающую тяжелые пищевые заболевания. Эффективность ее зависит не только от температуры, но и от длительности процесса, содержания в продукте влаги и жира, толщины слоя продукта, качества и количества введенных наполнителей и других факторов.

С учетом специфики технологии приготовления, характера и уровня бактериальной обсемененности все кулинарные изделия условно подразделены на шесть групп.

Группа 1 включает изделия, подвергаемые термической обработке, – обжарке, варке, запеканию с последующим охлаждением и упаковкой в ящики и коробки (жареная, печеная, отварная рыба, рулеты, шашлыки, котлеты, пирожки, пончики, кулебяки, чебуреки и др.), в пакеты и коробочки (рыбные палочки, рыбная соломка и др.); колбасные изделия (колбасы, сосиски, фаршированная рыба, зельц и др.).

Группа 2 включает желированные продукты (рыбный студень, заливная рыба), изготовление которых связано с применением ручных операций, что может способствовать вторичному обсеменению готовой продукции.

Группа 3 объединяет рыбу и нерыбные объекты морского промысла в заливках (маринаде и соусах). Технология приготовления этих изделий также включает ручные операции. На качество этих изделий влияет микрофлора соусов и заливок.

Группа 4 объединяет пастообразные изделия и измельченные слабосоленые продукты (паштеты, пасты, рубленая сельдь, крилевые, селедочные и другие рыбные масла и др.); технология их приготовления включает перемешивание и куттерование. Поскольку эти изделия не подвергаются вторичной термической обработке, они могут быть

значительно обсеменены микрофлорой.

Группа 5 изделия многокомпонентного состава (рыбный плов, салаты морской капусты и др.). К этой группе отнесены быстрозамороженные блюда (рыбная солянка, рыба отварная с гарниром и др.).

Группа 6 - замороженные полуфабрикаты (котлеты, пельмени и др.).

Рыбные полуфабрикаты и готовые кулинарные изделия оцениваются как доброкачественные в санитарно-микробиологическом отношении в том случае, если их обсемененность не превышает установленных предельно допустимых показателей.

Санитарно-гигиенические правила при производстве рыбных продуктов. Не допускается скопления слизи и рыб.

Допустимые нормы бактериальной обсемененности для рыбных полуфабрикатов и готовых кулинарных изделий

иных остатков вместе с сопутствующими им бактериями на оборудовании и других поверхностях. Микроорганизмы могут попадать в рыбные продукты на различных стадиях их производства:

- возможно обсеменение микрофлорой рыбы-сырца на стадии лова, транспортировки, хранения и первичной обработки;
- загрязнение рыбных продуктов микроорганизмами вследствие недостаточно эффективной технологической обработки;
- возможно микробное загрязнение рыбных продуктов после тепловой обработки на стадиях расфасовки и упаковки продуктов в тару;
- источником загрязнения рыбных продуктов может быть и окружающая среда, способствующая размножению определенных видов бактерий.

После тепловой обработки чаще всего продукт загрязняется микроорганизмами с рук рабочих, производящих расфасовку и упаковку продукции в тару. Обычно таким путем в пищевые продукты попадает *Staphylococcus aureus*, а иногда также *Streptococcus*, *Salmonellae*, *Shigellae*, *Escherichia coli* и др.

Патогенная микрофлора может попадать из сырья в готовую продукцию, если она проходит через рук одного и того же рабочего или через одно и то же оборудование. Источником загрязнения служат также воздушные фильтры, дренажные устройства, плохо очищенное оборудование и др.

Высокое санитарно-гигиеническое качество рыбной продукции возможно лишь при правильно налаженном контроле санитарного состояния поступающего сырья и вспомогательных материалов, технологического

процесса (особенно операции термообработки), инвентаря, оборудования, тары, помещений, производственной территории и др.

Тема 8.4. РЫБА КАК ИСТОЧНИК ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БОЛЕЗНЕЙ ЧЕЛОВЕКА

Согласно литературным данным и нашим многолетним исследованиям, пресноводная рыба, выловленная из водоемов, загрязненных неочищенными сточными водами и органическими веществами, может быть обсеменена патогенной и условнопатогенной микрофлорой. У такой рыбы, как правило, отсутствуют признаки заболевания, но она является носителем микробов.

Известно, что рыбы могут быть переносчиками возбудителей азиатской холеры человека, чумы свиней, рожистой, туберкулезной и кишечной палочек, сальмонелл, лептоспир, *Cl. botulinum*, *Cl. perfringens*, различной кокковой микрофлоры и др.

При определенных условиях патогенные микроорганизмы, попадая из окружающей среды в кишечник, могут проникать еще при жизни рыб в другие внутренние органы и мышцы. Это явление отмечается у недоброкачественной рыбы, а также у травмированной, больной, подвергнутой отравлению и снулой, хранившейся при комнатной температуре (18–20 °С) свыше 6 ч.

Употребление такой рыбы в сыром, вяленом, копченом виде, а также после плохой термической обработки с последующим длительным хранением продукта при комнатной температуре может привести к заболеваниям рожей, холерой, чумой, лептоспирозом и др. Особенно опасны для здо-ррвья людей микроорганизмы и их токсины, содержащиеся в рыбе и рыбных продуктах.

Токсикоинфекции возникают при употреблении в пищу продукта, содержащего в 1 г более 10^6 клеток живых токсигенных бактерий. К рыбным токсикоинфекциям относятся заболевания, вызываемые бактериями группы кишечной палочки, сальмонеллами, *Vac. cereus*, *Cl. perfringens*, типичными представителями рода протей.

Возникновение пищевых интоксикаций связано с употреблением в пищу продуктов, содержащих энтеротоксины, выделяемые некоторыми видами микроорганизмов (коагула-зоположительные стафилококки, *Cl. botulinum*). При этом микроорганизм, продуцировавший этот токсин, в продукте может отсутствовать, например после термообработки.

В последние годы все чаще начали появляться сообщения о пищевых токсикоинфекциях, обусловленных условно-патогенной микрофлорой, которая постоянно встречается в водоемах и рыбе. Связывают это со

многими обстоятельствами, в частности с нарушением экологических соотношений внутри бактериальных ассоциаций, с изменением сложившегося баланса между нормальной микрофлорой в организме человека, с уменьшением уровня естественного иммунитета, с широким применением антибиотиков, к которым многие условнопатогенные бактерии устойчивы.

Доказана возможность возникновения пищевых токсикоинфекций, обусловленных бактериями родов *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Hafnia*, *Vibrio parahaemolyticus*.

Следует помнить, что при антисанитарных условиях хранения рыбы в холодильниках в ней может обильно размножаться различная психрофильная микрофлора, способная вызывать заболевания людей.

Большинство паразитов пресноводных рыб является непатогенными для людей. Однако некоторые гельминты, паразитирующие в организме рыб на промежуточной стадии своего метаморфоза, могут вызывать заболевания (описторхоз, дифиллоботриоз, метагонимоз, диоктофимоз и др.). Заражается человек при поедании сырой, полусырой, свежемороженой, термически плохо обработанной инвазированной рыбы.

Большинство связанных с потреблением рыбы гельминтозов человека характеризуется ограниченным географическим распространением. Главными факторами являются навыки и традиции питания населения в районах обитания этих паразитов. В таблице 16 приведены общие сведения о болезнях человека, источником возбудителей которых служат пресноводная рыба и раки.

Отравления людей могут быть вызваны рыбой и рыбопродуктами, содержащими различные неорганические вещества (соли свинца, меди, цинка, мышьяка, соединения фтора и т. д.) или органические химические соединения (пестициды и гербициды, применяемые в сельском и лесном хозяйствах), а также могут возникать вследствие употребления в пищу некоторых видов рыб, которые в определенные сезоны года вырабатывают биотоксины (ихтиотоксины). Например, в период нереста ядовиты икра, молоки и печень усача, окуня, линя, пеляди, щуки, угря, когака из семейства карповых.

Возбудитель болезни широко распространен в природе, однако лишь спорадически передается водными организмами.

браконьеры для отравления рыбы, содержится сильный яд пикротоксин (по своему действию близок к стрихнину). Доза семян кукольвана в 2,4 г смертельна для человека.

Неспецифические отравления возникают в результате ядов,

образующихся при использовании рыбы, подвергшейся бактериальному разложению. Интоксикация происходит за счет биогенных аминов, гистамин которых в большом количестве накапливается в пищевых продуктах. Подобные заболевания возникают после употребления в пищу консервированного тунца, жареной скумбрии, сардин и других видов рыб с темным мясом.

В результате бактериального разложения белка гистидин может быть декарбоксилирован до гистамина. К большой группе микробов, как мезофильных, так и психрофильных, образующих гистамин, относятся представители рода *Proteus*, *E. coli*, *E. freundii*, *Cl. perfringens*, *Achromobacter histominus*, *Bac. aminophilus*, *Aerobacter aerogenes* и виды *Hafnia*. Декарбоксилизацию гистидина могут производить также кислотоустойчивые микроорганизмы (например, *Lactobacillus buchneri* и *Lb. brevis*). Интоксикация возникает при употреблении в пищу кислых изделий из рыбы, например маринадов.

Большой практический интерес представляет влияние температуры хранения рыбы на образование гистамина. Известно, что декарбоксилирование при повышенных температурах (17–20 °С) протекает сравнительно быстро. У рыб, которых хранят при 5 °С, через 10 сут содержится только 0,2–0,3 мг гистамина. Этот процесс при наличии большого количества свободного гистамина несколько ускоряется.

Относительно количества гистамина, необходимого для возникновения заболевания, в литературе имеются противоречивые данные. Однако учитывая, что действие гистамина зависит от восприимчивости организма человека и других различных факторов (например, усиление действия гистамина за счет сапонины картофеля), продукты с концентрацией гистамина свыше 300 мг/кг считаются непригодными в пищу.

Одной из опасных болезней людей, связанной с употреблением рыбы, является гаффская (синонимы – юксовая, сартландская). Несмотря на более чем полувековую историю проявления этой болезни, этиология ее остается невыясненной. Установлено, что причиной возникновения болезни служат ядовитые рыбы. Известно более 30 видов пресноводных рыб, которые при употреблении их в пищу могут быть причиной заболевания людей.

Появление ядовитых рыб зарубежные и отечественные ученые объясняют загрязнением водоемов сточными водами. Некоторые исследователи считают, что токсичность рыб возникает при поедании склероции спорыньи непосредственно или в составе ила и донного детрита, а также в результате отравления рыб токсинами сине-зеленых водорослей. Фито-токсическую природу гаффской болезни наиболее подробно изучили

ученые Института гидробиологии АН УССР и предложили методы ее определения.

Таким образом, природа заболеваний, связанных с употреблением рыбы, является самой различной и входит в сферу профессиональных интересов не только ветсанэкспертов, но и санитарных врачей и всех, кто связан с производством, переработкой и реализацией пресноводной рыбы.

Тема 9. МИКРОБИОЛОГИЯ ХЛЕБОПЕКАРНОГО, МАКОРОННОГО И КОНДИТЕРСКОГО ПРОИЗВОДСТВ.

МИКРОБИОЛОГИЯ ХЛЕБОПЕКАРНОГО ПРОИЗВОДСТВА

Общая характеристика сырья и стадий производства

Основным сырьем хлебопекарного производства являются: мука пшеничная и ржаная, вода, дрожжи, соль.

В качестве *дополнительного сырья* используются сахар, жиры, яйца, патока, солод, ферментные препараты, молочная сыворотка, молоко, изюм, мак, орехи, варенье и другие пищевые добавки.

Стадии технологического процесса складываются из подготовки сырья, замеса теста, брожения теста, разделки, формования, расстойки заготовок, выпечки хлеба, охлаждения, хранения и транспортировки.

Муку просеивают и очищают от металлических примесей на складе. Соль и сахар растворяют в воде и хранят в виде сахарно-солевого раствора концентрацией 65 - 70%, в котором содержание соли составляет 2 - 2.5% от массы сухого сахара. Такой раствор удобен в хранении, так как не кристаллизуется при комнатной температуре.

Компоненты - улучшители (молочные продукты, жиры, яйца и др.) должны иметь сертификаты качества. Яйца моют и дезинфицируют в трехсекционной ванне и освобождают от скорлупы. В качестве улучшителей используют ферментные препараты грибного и бактериального происхождения: амилоризин, амилосубтилин, содержащие амилолитические и протеолитические ферменты, фосфатазу, декстриназу. Ферментные препараты существенно улучшают качество хлеба при очень незначительном расходе (десятые - сотые доли процента от массы муки). Они способствуют интенсификации брожения, созревания теста, увеличению объема, пористости хлеба, улучшению вкуса и аромата изделий, сокращению расхода дрожжей на 20%, удлинению срока хранения.

Дрожжи и закваски готовят в дрожжевом отделении, расположенном над тестомесильным отделением. Затем все компоненты подаются через дозирующее устройство в тестомесильные машины. При замесе теста все компоненты смешиваются в однородную массу, в которой начинаются физические, коллоидные и биохимические процессы, в результате которых тесто разрыхляется и созревает.

9.1.2. Характеристика микрофлоры. Возбудители брожения теста

Микрофлора хлебопекарного производства делится на полезную и вредную. К *полезной* относятся дрожжи и молочнокислые бактерии, применяемые для приготовления теста. *Вредной* является микрофлора, поступающая с сырьем и вызывающая нарушение технологического процесса, снижение качества и порчу продукции.

Возбудителями брожения теста являются **дрожжи**.

Роль дрожжей заключается в разрыхлении теста. Дрожжи сбраживают сахара муки и мальтозу, образующуюся из крахмала, с выделением спирта, углекислого газа. Побочные продукты брожения - уксусный альдегид, бутиловый, изобутиловый, изоамиловый спирты, органические кислоты (молочная, янтарная, винная, щавелевая) создают вкус и аромат хлеба.

При производстве пшеничного хлеба применяют *Saccharomyces cerevisiae*, ржаного - оба вида дрожжей, но преобладают *Saccharomyces minor*.

Saccharomyces cerevisiae - спорообразующий верховые дрожжи семейства сахаромикетов. Клетки крупные, круглой и овальной формы. Спорообразование происходит только в условиях голодания. На сусле - агаре образуют колонии круглой формы, диаметром 0.5 - 1 см, выпуклые, желтоватого цвета. Поверхность колоний бывает гладкой блестящей и складчато-шероховатой, бугристой. Оптимальная температура брожения 28 - 30°C; pH - 4.5 - 5.0; кислотность 10 - 12°Н. Неустойчивы к высокой концентрации сахара, соли, спирта в концентрации 12 - 14%.

Saccharomyces minor - специфичны для ржаного теста. Клетки мелкие - 3 мкм, круглой формы, характерны фигуры почкования по 3 - 7 клеток. На сусле - агаре образуют мелкие круглые колонии диаметром 4 - 6 мм выпуклые с гладкой блестящей поверхностью сероватого - белого цвета. Оптимальная температура развития 25 - 28°C. Повышение температуры до 32 - 35°C угнетает их. Отличаются кислотоустойчивостью, менее требовательны к источникам витаминного и азотного питания, более спиртоустойчивы.

Большую роль в хлебопечении играют **молочнокислые бактерии**. Эти микроорганизмы осуществляют молочнокислое брожение в полуфабрикатах, в результате которого повышается кислотность, что способствует набуханию и пептонизации муки, особенно ржаной, повышаются вязкость и газодерживающая способность теста. Молочнокислые бактерии участвуют в создании вкуса и аромата ржаного хлеба за счет накопления летучих органических кислот, спиртов, карбонильных соединений (альдегидов), способствуют лучшему разрыхлению теста за счет газообразования.

В хлебопечении используются следующие виды молочнокислых бактерий:

Lactobacillus delbrueckii - термофильные гомоферментативные палочки длиной 5 - 9 мкм, располагаются поодиночке и попарно. На плотной питательной среде образуют колонии круглой формы, выпуклые, беловатого цвета. Оптимальная температура 48 - 50°C. Используются при выведении жидких дрожжей.

Lactobacillus plantarum - мезофильные гомоферментативные палочки средних размеров, располагаются поодиночке и короткими цепочками. Образуют колонии средней величины, куполообразные, беловатого цвета. Оптимальная температура 30 - 35°C. Постоянно встречается в заквасках.

Lactobacillus brevis - мезофильные гетероферментативные бактерии. По морфологии это - короткие толстые палочки, располагаются поодиночке или короткими цепочками. Оптимальная температура 30°C. Развиваются в сочетании с палочкой плантарум.

Lactobacillus fermenti - мезофильные гетероферментативные бактерии. Морфологически это - мелкие палочки, располагаются поодиночке и короткими цепочками. Оптимальная температура 37 - 40°C.

9.1.3 Микроорганизмы, используемые в производстве хлеба из пшеничной и ржаной муки

Микроорганизмы, используемые в производстве хлеба из пшеничной муки

Для производства пшеничного хлеба применяют прессованные и сушеные дрожжи, а также полуфабрикаты (жидкие дрожжи и жидкие пшеничные закваски), изготавливаемые на хлебозаводах. Хлебопекарные дрожжи должны быть устойчивыми к высокой концентрации соли до 3 - 4%, сахара, должны развиваться при температуре 28 - 30°C, при оптимальном значении рН 4,5 - 5, обладать высокой бродильной активностью (мальтазной и зимазной).

Прессованные дрожжи применяют для производства сдобных и булочных изделий из муки высшего и первого сортов. Используют в виде дрожжевого молока с содержанием прессованных дрожжей 500 - 600 г \ л.

Сушеные дрожжи предварительно размачивают в мучной суспензии и активизируют.

Жидкие дрожжи применяют для производства хлеба из пшеничной муки высшего, первого и второго сортов, ржано-пшеничного. Особенно рекомендуются, если мука имеет пониженные хлебопекарные свойства, так как обладают высокой мальтазной активностью. Жидкие дрожжи готовят на хлебозаводах по следующей схеме: пшеничную муку второго сорта заваривают горячей водой, добавляют ферментные препараты для осахаривания. Происходит гидролитическое расщепление крахмала до мальтозы и далее до глюкозы. Осахаренную заварку заквашивают дельбрюкковской палочкой разных штаммов: 30, 31, 30-1, 30-2, Ленинградский-76 и оставляют при температуре 48 - 52°C. Молочнокислые бактерии размножаются, сбраживают глюкозу с образованием молочной кислоты. Кислотность полуфабриката повышается, создаются благоприятные условия для развития дрожжей, подавляется посторонняя микрофлора. Затем добавляют дрожжи, они размножаются, а жизнедеятельность молочнокислых бактерий прекращается. Таким образом, жидкие дрожжи представляют собой активную культуру дрожжей, выращенных на мучной заварке, осахаренной и заквашенной термофильными молочнокислыми бактериями. Соотношение молочнокислых бактерий и дрожжей составляет 30:1.

Жидкие пшеничные закваски - это активная культура дрожжей, выращенных на осахаренной мучной заварке, заквашенной мезофильными молочнокислыми бактериями гомоферментативными (палочка плантарум) или гетероферментативными (палочки бревис, ферментум). Образующиеся кислоты способствуют улучшению вкуса и аромата хлеба.

Микроорганизмы, применяемые для производства хлеба из ржаной муки

Ржаной хлеб готовят на жидких и густых заквасках, которые представляют собой смеси культур дрожжей и молочнокислых бактерий. Соотношение молочнокислых бактерий и дрожжей составляет 80:1, т.е. молочнокислые бактерии более важны для созревания ржаного теста. Обычно используют смесь гомо- и гетероферментативных культур молочнокислых бактерий.

Жидкие закваски готовят на осахаренной жидкой среде из ржаной муки, в которую вносят смесь гомо- и гетероферментативных молочнокислых бактерий и оба вида дрожжей (*S. cerevisiae*, *S. minor*). Преобладают дрожжи *S. minor*, которые отличаются высокой кислотоустойчивостью, но меньшей бродильной активностью.

Густые закваски характеризуются тем, что применяют только дрожжи *Saccharomyces minor* трех штаммов 12\17, 7, Чернореченский, а также смесь из *L. plantarum* и *L. brevis*.

В заквасках и в тесте из ржаной муки дрожжи и молочнокислые бактерии составляют симбиоз и активность их возрастает, а высокая кислотность ржаного теста препятствует развитию тягучей болезни.

Микроорганизмы - вредители хлебопекарного производства.

Источниками посторонней микрофлоры являются сырье, вода, воздух, технологическое оборудование, тара, персонал.

Микрофлора муки состоит преимущественно из микрофлоры зерна, поэтому количественный и качественный состав микрофлоры муки зависит от степени зараженности зерна, способов помола и очистки. Общая бактериальная обсемененность составляет 2 - 3 млн. КОЕ \ 1 г, но варьирует в зависимости от содержания влаги, качества помола, продолжительности хранения и др. В микрофлоре муки преобладает травяная палочка (*Erwinia herbicola*). Это - грамотрицательные неспорообразующие палочки, факультативные анаэробы. Не должно быть кокковых форм бактерий, которые развиваются при повышенной влажности муки.

В микрофлоре муки нормируется содержание спорообразующих бактерий, особенно *Bac. subtilis*. При наличии до 200 спор \ 1г мука оценивается как высококачественная; 200 - 400 спор - удовлетворительного качества; до 1000 спор - сомнительного качества; свыше 1000 - плохого.

В муке встречаются также молочнокислые бактерии, уксуснокислые палочки, ложные дрожжи, споры плесневых грибов.

Микроорганизмы не развиваются, если влажность муки не превышает 14%, они находятся в состоянии анабиоза. При увлажнении муки микробы активизируются и вызывают порчу муки.

Виды порчи муки:

- прокисание, вызываемое молочнокислыми бактериями;
- прогоркание, которое вызывают плесневые грибы и некоторые бактерии, продуцирующие протеолитические и липолитические ферменты;
- плесневение - развивается при высокой влажности муки, опасно возможностью накопления афлотоксинов;
- самосогревание, наблюдаемое при влажности муки более 20%.

Источниками посторонней микрофлоры являются и другие виды сырья. Наиболее опасные микроорганизмы могут попасть из яиц, в которых возможно присутствие сальмонелл. По российскому законодательству разрешается применение только куриных яиц. Яйца водоплавающих можно использовать для смазки поверхности изделий.

Болезни хлеба:

1. *Тягучая болезнь хлеба.* Возбудителем является сенная палочка (*Bac. subtilis*), продуцирующие мощные амилолитические и протеолитические ферменты. Они вызывают гидролиз крахмала с образованием декстринов, гидролиз белков, в результате чего мякиш становится вязким, тягучим. Оптимальная температура развития этих бактерий 35 - 40°C, поэтому заболевание как правило возникает в теплое время года. Сенная палочка чувствительна к кислой среде и при pH 4,8 - 4,5 не развивается.

Меры профилактики: быстрое охлаждение хлеба до 10 - 12°C; подкисление теста путем добавления уксусной, пропионовой, сорбиновой кислот; введение в закваски молочнокислых бактерий, обладающих антагонистической активностью (ацидофильная палочка). Заболевший хлеб уничтожается.

2. *Меловая болезнь* - характеризуется появлением на корке и в мякише белых сухих, похожих на мел, включений, хлеб приобретает неприятный запах. Порок вызывают термоустойчивые дрожжи.

3. *Пигментные пятна* - характерно появление на корке и в мякише пятен желтого, красного цветов. Хлеб непригоден к употреблению. Возбудителями являются грамотрицательные пигментообразующие бактерии (чудесная, синегнойная, флуоресцирующая палочки), которые развиваются при температуре не менее 25°C, повышенной влажности и малой кислотности хлеба. Для профилактики необходимо тщательное соблюдение санитарно-гигиенического режима.

4. *Пьяный хлеб* - возникает при заражении муки токсинами гриба рода фузариум. Это происходит, если зерно находится в поле при температуре 0 - 5°C. Для предотвращения порока производится проверка зерна (не допускается перезимовавшее и морозобойное зерно).

5. *Плесневение* - возникает при плотной укладке хлеба, при повышенной влажности более 70%, при температуре 25 - 30°C. Споры плесневых грибов попадают из воздуха, с тары, с рук и одежды персонала. Плесени вызывают

распад углеводов, белков и жиров с появлением неприятного вкуса и запаха; возможно накопление микотоксинов.

Микробиологический контроль хлебопекарного производства

Контроль сырья.

Мука - подвергается органолептическому контролю. При наличии изменений производится микробиологическое исследование с определением общей бактериальной обсемененности, количества спор бацилл (суспензию муки подвергают пастеризации при температуре 95 - 97°C, охлаждают и высевают в чашки на мясо-пептонный агар).

Для определения зараженности спорами бактерий применяют метод лабораторных выпечек (апрель - октябрь). Образцы заворачивают во влажную бумагу и помещают в термостат при температуре 37°C с целью активизировать развитие спор. Затем хлеб разрезают и проверяют на наличие тягучей болезни.

Ферментные препараты - каждую партию контролируют на зараженность спорами бактерий методом пробных выпечек.

Контроль полуфабрикатов - производят определение количества дрожжей, молочнокислых бактерий в 1 г, их соотношение, активность молочнокислых бактерий, постороннюю микрофлору.

Жидкие дрожжи: 1 г полуфабриката помещают в пробирку с 9 см³ воды, встряхивают и дают отстояться в течение 10 - 15 мин. Из верхнего слоя суспензии готовят препараты "Раздавленная капля", в которых определяют количество дрожжевых клеток, процентное содержание почкующихся дрожжей и содержащих гликоген, волютин. Подсчет производят в камерах Горяева. Количество дрожжевых клеток должно составлять 90 - 120 млн \ 1 мл.

Не допускаются спорообразующие бактерии; их выявляют методом накопительных культур: пробу жидких дрожжей вносят в стерильное сусло и прогревают при 80°C в течение 10 мин с целью уничтожения вегетативных форм бактерий, затем пробирки помещают в термостат при 37°C на одни сутки. Рост бацилл характеризуется помутнением сусла и подтверждается микроскопированием мазков, окрашенных по Граму.

Тесто: производят определение газообразующей способности дрожжей, также определяют количество и активность молочнокислых бактерий. Для анализов используют микрогазометрический прибор Елецкого, подсчет клеток осуществляют в камерах Горяева, активность молочнокислых бактерий выявляют путем проведения теста с индикатором. В смесь теста с водой добавляют метиленовую синь и помещают в термостат при температуре 40°C. Время обесцвечивания окраски свидетельствует об активности молочнокислых бактерий: при высокой активности смесь обесцвечивается в течение 25 мин, при средней - в течение 35 - 50 мин, при низкой - свыше 50 мин.

Контроль готовой продукции.

С целью контроля санитарного состояния производства берут смывы с поверхности изделий для обнаружения кишечных палочек в качестве индикатора фекального загрязнения. Содержание спорообразующих бактерий определяют косвенным методом.

Вопросы для самопроверки

1. *Какое сырье используется в хлебопекарном производстве?*
2. *Перечислите основные стадии технологического процесса.*
3. *Какие виды дрожжей используют в хлебопечении?*
4. *Какова роль дрожжей в хлебопекарном производстве?*
5. *Какие молочнокислые бактерии используют в хлебопечении?*
6. *Какие микроорганизмы и полуфабрикаты применяют в производстве пшеничного хлеба?*
7. *Какие болезни хлеба Вам известны?*
8. *Какие микроорганизмы и полуфабрикаты применяют в производстве хлеба из ржаной муки?*
9. *Какие микроорганизмы являются вредителями производства?*
10. *Как контролируют микробиологическое состояние сырья, полуфабрикатов и готовой продукции?*

МИКРОБИОЛОГИЯ МАКАРОННОГО ПРОИЗВОДСТВА И КРУПЫ

1.2.1 Характеристика микрофлоры сырья и основные стадии технологии. Виды микробной порчи макаронных изделий

Основным сырьем в макаронном производстве является мука пшеничная, вода, улучшители (яйца, меланж, яичный порошок), некоторые добавки: томатная паста, овощные пюре.

Технологический процесс состоит из подготовки сырья, замеса теста, формовки и разделки сырых изделий, сушки, упаковки, транспортировки, хранения. Подготовка сырья проводится так же, как и в хлебопекарном производстве. Замес теста производят при температуре 30 - 40°C, при которой возможно размножение микроорганизмов, которое продолжается при формовке и разделке сырых изделий. Макароны сушат нагретым воздухом при температуре около 50°C. Многие микроорганизмы при этом погибают. Технологический процесс идет на поточных, полуавтоматизированных и автоматизированных линиях, что ограничивает поступление микробов.

Все микроорганизмы в макаронном производстве являются вредными и имеют только отрицательное значение. Источниками микрофлоры служат мука, вода, улучшители, воздух, оборудование, персонал.

Мука - может содержать много микроорганизмов. Наиболее опасными являются гетероферментативные молочнокислые бактерии, вызывающие вспучивание и прокисание макарон.

Яйца, меланж, яичный порошок и другое сырье должно соответствовать микробиологическим нормативам ГОСТа.

Видами микробной порчи макаронных изделий являются:

Вспучивание - характеризуется появлением на поверхности бугорков, а на разломе - пустот. Вызывается гетероферментативными молочнокислыми бактериями, образующими кислоты и газы. Предотвращение порока заключается в соблюдении режима сушки.

Окраска - характеризуется образованием на макаронах полос фиолетового цвета. Возбудители - дрожжи рода *Candida*, продуцирующие пигмент.

Прокисание - связано с развитием молочнокислых бактерий.

Снижение качества изделий и пороки возникают при использовании сырья низкого качества с высокой бактериальной обсемененностью. Развитию пороков способствует длительное пребывание теста при температуре 30 - 40°C.

Влажность макарон должна быть 11-13%. При повышении влажности наблюдается прокисание и плесневение макарон. Плесневение вызывают грибы родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*. Возникновению порчи способствует хранение при относительной влажности воздуха выше 65% в плохо вентилируемых помещениях, а также увлажнение упаковки. Макароны с явлениями плесневения и прокисания непригодны к употреблению.

9.2.2. Микробиологический контроль макаронного производства.

Мука - определяют гетероферментативные молочнокислые бактерии.

Яйца и меланж проверяют на свежесть в овоскопах. Меланж подлежит использованию сразу после размораживания.

Вода - контролируют на соответствие требованиям ГОСТ.

Воздух - изучают микрофлору каждые две недели. Общая бактериальная обсемененность не должна превышать 500 КОЕ/ м³, споры плесеней не допускаются.

Технологическое оборудование - визуально контролируют качество мойки, микроскопируют последнюю промывную воду, в которой не должны определяться микроорганизмы. Поверхность протирают стерильным тампоном, на котором не должно быть остатков сырья, полуфабрикатов, при микроскопировании не должно быть микроорганизмов.

9.2.3 Микробиология крупы

Микрофлора круп состоит в основном из микроорганизмов зерна. Уровень микробной обсемененности зерна имеет значительные различия в зависимости от условий выращивания, способа обработки, сроков и условий хранения.

Количество микроорганизмов зерна (пшеницы, проса, ячменя, риса, овса, гречки) от нескольких тысяч до миллионов клеток в 1 г, однако, качественный состав микрофлоры довольно однообразен. Преобладающими микроорганизмами являются бактерии (до 80 % и более), спор плесневых грибов около 7% , дрожжей еще меньше. Бактериальная микрофлора представлена в основном травяной палочкой *Erwinia herbicola*. Это грамотрицательная неспорообразующая аэробная палочка, которая составляет постоянную микрофлору зерна. Встречаются также микрококки, молочнокислые бактерии, споробразующие аэробные палочки, среди которых преобладают бациллы картофельно-сенной группы.

В грибной микрофлоре обнаруживаются главным образом *Alternaria*, *Cladosporium*, меньше содержится аспергилловых и пеницилловых грибов, имеются также дрожжи и актиномицеты.

Микрофлора различных круп по качественному составу близка к микрофлоре зерна, но количественно меньше. Большое влияние на объем микрофлоры оказывает предварительная обработка зерна (шелушение, очистка, шлифовка), а также технология производства крупы. Крупы, изготовленные из зерна, подвергнутого гидротермической обработке (пропаривание), содержат в 10-100 раз меньше микроорганизмов, чем из непропаренного.

При хранении круп в них снижается число бактерий, в основном за счет отмирания травяной палочки. В опытах по хранению различных круп при температуре 14-16°C и относительной влажности воздуха 70-75% через год в них сохраняется 10-15% бактерий, преимущественно спорообразующих. Количество плесеней в тех же условиях хранения почти не изменяется. Если же крупа хранится при той же температуре, но при 80% влажности воздуха, то через 4-6 месяцев в ней значительно увеличивается число плесневых грибов, в основном пенициллов и аспергиллов. Особенно интенсивно плесени развиваются на крупе, изготовленной из пропаренного зерна. Накопление плесеней вызывает ухудшение качества круп, что связано со способностью плесеней разлагать белки, жиры, крахмал и сбраживать сахара с образованием кислот. Кроме того, в крупе могут накапливаться микотоксины, вызывающие отравления.

Хранить крупы следует в сухих отапливаемых помещениях с хорошей вентиляцией при температуре 15-18 °С и относительной влажности воздуха не выше 75%.

Вопросы для самопроверки

- 1. Перечислите сырье и стадии технологии в макаронном производстве.*
- 2. Какова роль микроорганизмов в производстве макарон?*
- 3. Укажите источники микрофлоры и условия, способствующие их развитию.*
- 4. Как производят контроль микрофлоры в макаронном производстве?*
- 5. Какие микроорганизмы обнаруживаются в зерне и крупе?*

6. Какие факторы влияют на состав микрофлоры крупы?
7. Как изменяется микрофлора круп при хранении?
8. Как влияют микроорганизмы на качество крупы?

МИКРОБИОЛОГИЯ КОНДИТЕРСКОГО ПРОИЗВОДСТВА

9.3.1. Характеристика сырья и стадий технологии.

Выпускают следующие группы кондитерских изделий: шоколад и шоколадные изделия, сахаристые продукты (карамель, драже, ирис, конфеты), пастило-мармеладные изделия, мучные изделия без крема (галеты, крекер, печенье, вафли) и с кремом (пирожные, торты, рулеты).

Применяют разнообразное сырье: сахар, молоко, сливки, сгущенное молоко, сливочное масло, яйца, меланж, яичный порошок, мука, какао-бобы, крахмал, патока, мед, кофе, фрукты, ягоды, орехи, ароматические вещества, пищевые кислоты, желирующие и красящие вещества и др.

Производство шоколада включает обработку какао-бобов, приготовление сахарной пудры, шоколадной массы, формовку шоколада. Важным этапом является обработка какао-бобов, которая состоит из сортировки, ферментации, обжарки. Ферментация происходит при выдерживании бобов в кучах, накрытых листьями, в течение 4-7 суток. Происходят микробиологические и биохимические ферментативные процессы, бобы согреваются до 43-45°C. На поверхности бобов развиваются дрожжи, молочнокислые, уксуснокислые, гнилостные бактерии. Сахара сбраживаются с образованием спирта, молочной, уксусной кислот, которые пропитывают бобы. Дубильные вещества бобов окисляются и появляется специфический аромат, цвет бобов становится коричневым. После ферментации бобы сушат и обжаривают при температуре 150-170°C в течение 10-15 мин. Оболочка какао-бобов становится хрупкой, легко отделяется от ядра, уменьшается содержание влаги. При обжарке большая часть микроорганизмов погибает. Затем производится дробление какао-бобов с образованием крупки, размол крупки с получением какао-порошка.

Сахарную пудру получают путем дробления сахара и просеивания через сита. Затем все компоненты смешивают в смесителях и направляют на вальцовочные машины, далее на шоколадформирующие машины на формование. Отлитый в формы шоколад охлаждается и направляется на заверточные машины.

Производство конфет, глазированных шоколадом, заключается в приготовлении конфетных масс, формовании, отделке, глазировании, завертке и упаковке.

Производство карамели включает приготовление сиропа, начинок, разделку и подготовку карамельной массы, отделку, завертку и упаковку.

Сироп готовят на сиропных станциях, затем перекачивают в вакуум-аппараты для уваривания при 160°C. Карамельная масса охлаждается до 60°C и подается вместе с разогретой начинкой на катально-начиночную машину, затем в калибровочную машину и на формование. Готовая карамель охлаждается, отделяется, затем следует завертка и упаковка. В производстве применяют фруктово-ягодные, ликерные, помадные, молочные и другие начинки.

Источники микрофлоры и ее состав

Источниками микрофлоры являются: сырье, полуфабрикаты, технологическое оборудование, персонал, вода, воздух. Технологический процесс направлен на угнетение и уничтожение микроорганизмов, так как происходит достаточно быстро и при повышенной температуре. Некоторое количество устойчивых микроорганизмов сохраняется. Вторичное инфицирование происходит в процессе упаковки и хранения.

Сахар содержит разное количество микроорганизмов. При стандартной влажности 0, 15% обнаруживается несколько десятков КОЕ в 1г, при повышенной влажности содержание микробов возрастает до нескольких десятков тысяч КОЕ в 1г. Для кондитерского производства наиболее опасны осмофильные дрожжи, спорообразующие аэробные и анаэробные палочки, вызывающие брожение и прокисание фруктовых пюре, варенья, повидла, джема. Вредителями являются термофильные газообразующие бактерии и лейконосток - слизиобразующие бактерии, вызывающие ослизнение сиропов, фруктовых соков.

Молоко, сливки всегда содержат значительное количество микроорганизмов. Обнаруживаются молочнокислые, гнилостные, маслянокислые бактерии. Из патогенных микроорганизмов могут быть возбудители туберкулеза, кишечных инфекций, бруцеллеза, стафилококки, вызывающие отравления, сальмонеллы. При термической обработке молока, шоколадной массы, сливочных начинок микроорганизмы погибают. При изготовлении крема микроорганизмы могут сохраниться.

Микрофлору сгущенного молока составляют в основном спорообразующие бактерии, могут быть осмоустойчивые стафилококки, микрококки, разлагающие жир и белки, в результате возникает прогорклый вкус и запах, осмофильные дрожжи, вызывающие брожение и разжижение молока.

Сладкосливочное масло содержит 10^5 КОЕ в 1 г и больше при длительном и неправильном хранении. Пороки масла: штафф, кислый вкус, горечь, прогорклый вкус и запах, вызываемые бактериями рода *Pseudomonas*, молочнокислыми бактериями, плесневыми грибами, дрожжами рода *Candida*.

Яйца, меланж, яичный порошок могут содержать различные микроорганизмы: гнилостные бактерии, плесени, сальмонеллы. Яйца водоплавающих разрешено применять только для смазки выпекаемых изделий. Меланж необходимо перерабатывать в течение 2-3 часов после размораживания.

Мука может содержать значительное количество микроорганизмов, которые описаны ранее.

Фруктово-ягодные полуфабрикаты (пюре, варенье, повидло) готовят из фруктов и ягод, которые содержат на поверхности множество разных бактерий, плесеней, дрожжей. При изготовлении полуфабрикатов (варке) большинство микроорганизмов погибают. Наименее стойкими в хранении являются пюре из ягод. Ягоды моют, ошпаривают, протирают и добавляют консерванты (сернистая кислота, натриевая соль сорбиновой кислоты). В пюре происходит спиртовое, уксуснокислое, молочнокислое брожения, позднее развиваются плесени, что свидетельствует о порче пюре. Повидло более стойкое за счет высокого осмотического давления и отмирания микроорганизмов при уваривании. Порча связана с молочнокислым брожением и плесневением.

Микробиологическая порча кондитерских изделий.

Мармелад, пастила, сливочная помадка относятся к малостойким изделиям, так как содержат 22-24% влаги. Порчу вызывают осмофильные дрожжи, вызывающие брожение, в результате которого возникают трещины, деформация изделий, изменение вкуса. При повышенной влажности воздуха может возникнуть плесневение. Для предотвращения порчи добавляют консерванты в массу и пропитывают ими пергамент для заворачивания.

Карамель, шоколад, конфеты являются стойкими в хранении за счет высокой концентрации сахара, низкой влажности, твердой консистенции. Может происходить порча карамельных начинок (брожение, прогоркание), вызываемая молочнокислыми и гнилостными бактериями.

Некоторые сорта конфет могут портиться за счет высокой влажности (сливочная помадка, глазированная шоколадом, или с ликерной начинкой). В них возникает брожение и происходит деформация изделий.

Предотвращение порчи: контроль за качеством сырья, соблюдение санитарно-гигиенического режима на производстве.

Кремовые изделия относятся к скоропортящимся продуктам. Микроорганизмы попадают в крем с сырьем, с рук персонала, из муки в заварной крем. Может происходить прокисание крема. В крем могут попасть золотистые стафилококки, патогенные кишечные бактерии, что чревато возникновением отравлений и инфекций.

Профилактика: проверка рук кондитеров на наличие воспалительных процессов, соблюдение санитарно-гигиенического режима, хранение при температуре 2-6°C, соблюдение сроков реализации.

Микробиологический контроль кондитерского производства.

Осуществляется контроль сырья, полуфабрикатов и готовой продукции.

Контроль сырья и полуфабрикатов - определяют все микробиологические показатели на соответствие нормативам ГОСТ, САНПиНа. Во всех видах сырья определяют кМАФАнМ, БГКП, сальмонеллы. Дополнительно определяют золотистый стафилококк.

Муку проверяют по органолептическим показателям и при наличии изменений производят микробиологическое исследование.

Сахар - определяют количество аэробных и факультативно- анаэробных термофильных бактерий, вызывающих плоскокислую порчу с выделением сероводорода; количество слизиобразующих бактерий рода *Leuconostoc*, дрожжей и плесеней.

Яйца, меланж, яичный порошок - определяют все нормируемые показатели. Яйца просматривают на овоскопе и при наличии изменений производят микробиологическое исследование. Определяют БГКП, сальмонеллы.

Анализ какао-бобов производят по требованию санитарной инспекции. Определяют КМАФАнМ, БГКП, сальмонеллы.

Фруктово-ягодные продукты - осуществляют определение общей бактериальной обсемененности, количества дрожжей и плесеней.

Контроль готовой продукции.

Шоколад и шоколадные конфеты анализируют по требованию санитарной инспекции. Определяют кМАФАнМ, БГКП, сальмонеллы.

Кремовые изделия - вначале делают мазки из подогретого крема. Мазки обезжиривают и фиксируют смесью спирта с эфиром в соотношении 1:1 и окрашивают по Граму. При микроскопировании обращают внимание на наличие стафилококков и грамотрицательных палочек. Микробиологический анализ производят на соответствие нормативам ГОСТ.

Вопросы для самопроверки.

1. *Какое сырье используют в кондитерском производстве?*
2. *Перечислите основные стадии технологического производства.*
3. *Как производится подготовка какао-бобов?*
4. *Как изменяется микрофлора при подготовке какао-бобов?*
5. *Какие кондитерские изделия подвергаются порче и почему?*
6. *Какие микробы вызывают порчу кондитерских изделий?*
7. *Какие микробиологические показатели определяют в сырье, полуфабрикатах и готовых изделиях?*

Тема 10. Микробиология яиц и яйцепродуктов.

Микрофлора яиц. Не все составные части яйца отличаются одинаковой устойчивостью к микробам. Наиболее резистентен к разложению и заражению микробами плотный белок, что объясняется содержанием в нем лизоцима. Его больше в яичном белке кур (5,71 мг/мл) и значительно меньше в таком же белке водоплавающей птицы: уток (1,80 мг/мл), гусей (0,38 мг/мл).

Яйца от здоровой птицы не содержат микробов и могут оставаться длительное время стерильными. Яйца обсеменяются микробами эндогенным или экзогенным путем. Эндогенное обсеменение происходит в яичнике и яйцеводе несушек, больных туберкулезом, сальмонеллезом (пуллорозом) и другими инфекциями.

Экзогенное обсеменение происходит через поры скорлупы при содержании микробов на ее поверхности или в окружающей среде. Численность пор на площади скорлупы 1 см² может достигать 100 и более. На скорость проникновения микробов в яйцо оказывают влияние температура, влажность воздуха, степень свежести яиц, инактивация лизоцима, наличие органов передвижения у микробов и т. д. По данным И. С. Загаевского, при температуре 20°C и относительной влажности воздуха 80 - 85 % бактерии *Pseudomonas* и *Proteus* проникают с поверхности скорлупы внутрь яйца на 2-5-е сутки, *Salm. typhimurium* - на 8-11-е, *E. coli* - на 13-15-е, *Aspergillus* - на 5-9-е сутки.

Скорость проникновения мезофильных микробов при температуре ниже 15°C и влажности 60-65% замедляется до 11 нед, а ниже 10°C почти прекращается. Психрофильные микробы из группы *Pseudomonas* и плесневые грибы проходят через поры скорлупы и при нуле градусов. Вначале колонии образуются на подскорлупной оболочке, а затем на белке.

Чистота скорлупы – важный показатель качества пищевых яиц. Загрязненная скорлупа не только портит их товарный вид, но и резко сокращает продолжительность хранения. В зависимости от загрязненности скорлупы количество микроорганизмов на ней варьирует в больших пределах. На 1 см² поверхности свежих чистых яиц находятся десятки и сотни, очень редко тысячи бактерий, а загрязненных яиц – десятки тысяч и даже миллионы микробных клеток. Загрязнение скорлупы яиц патогенной и условно-патогенной микрофлорой происходит наиболее часто при напольной системе содержания кур в птичниках с плохо оборудованными гнездами, с подстилкой неудовлетворительного качества и нарушением микроклимата. При напольном содержании птиц до 20-25% пищевых яиц получают с

загрязненной скорлупой, которые по этой причине не могут быть реализованы как диетические.

Наиболее высокий выход яиц с чистой поверхностью скорлупы (в среднем 96 %) наблюдается при содержании птицы в одноярусной автоматизированной батарее, что объясняется высокой культурой и уровнем механизации

Порча яиц может происходить от чисто ферментативного процесса без присутствия бактерий или от проникновения через скорлупу микроорганизмов.

Гниение яиц. Это процесс разложения яичного белка протеолитическими ферментами микробов. По данным А.А. Романова и А.И. Романовой, в зависимости от вида микроба, вызывающего гниение, различают следующие виды гниения яиц.

Зеленая гниль появляется в результате проникновения в яйцо микробов рода *Pseudomonas* (*Ps. fluorescens* и др.). Они образуют зеленый пигмент, который придает соответствующую окраску содержимому яйца.

Черная гниль появляется при размножении *Proteus vulgaris* и некоторых представителей рода *Pseudomonas*. Содержимое яйца разжижается и принимает коричневый или черный оттенок. Образовавшиеся газы часто разрывают скорлупу, а содержимое выливается на соседние яйца и загрязняет их.

Смешанная гниль вызывается *E. coli*, *Staphylococcus aureus* и другими микробами. При этом изменяется не только консистенция белка, но и его окраска. Чаще всего он становится серым и издает гнилостный запах.

В результате размножения гнилостных аэробных бацилл желток приобретает светло-желтый цвет. Вследствие разрушения желточной оболочки белок перемешивается с желтком, и образуется однородная мутная жидкая масса. При овоскопии такое яйцо не просвечивается.

Размножение в яйце чудесной палочки, розового микрококка, а также некоторых дрожжей и плесневых грибов, образующих красный пигмент, вызывает окрашивание его содержимого в розовый или красный цвет. При овоскопии заметен красный оттенок в желтке и покраснение белка, который может быть разжиженным или вязким (**красная или розовая гниль**).

Белое гниение вызывают *Micrococcus*. Белок и желток смешиваются между собой.

Порчу яиц, вызываемую гнилостными бактериями, при которой они не просвечиваются при овоскопии, называют «тумак бактериальный». Яйцо непрозрачно, кроме воздушной камеры, которая увеличена и подвижна; наружная поверхность скорлупы сероватого или мраморного цвета, часто с

гнилостным запахом; содержимое яйца в виде мутной массы серо-зеленого и грязно-желтого цвета имеет запах разложения. Дефект возникает в результате развития гнилостных бактерий.

Дефект «кислое яйцо» вызывается многими бактериями, в том числе кишечной палочкой, при овоскопии не обнаруживается, а при вскрытии яйцо издает едкий запах.

Плесневение яиц. Из почвы и загрязненных предметов на поверхность скорлупы попадают плесневые грибы и актиномицеты. При низких плюсовых температурах и повышенной влажности споры грибов прорастают и проникают в поры скорлупы, а затем на подскорлуповые оболочки. Наиболее благоприятные условия они находят вблизи воздушной камеры. При овоскопии пораженных яиц видны темные пятна - колонии грибов. В последующем гифы грибов пронизывают белок, образуя разветвленную сеть, и с помощью ферментов разжижают его. Среди грибов чаще обнаруживают плесневые родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* и реже - другие. В местах развития плесневых грибов гнилостная микрофлора обычно отсутствует.

При размножении плесеней на подскорлупных оболочках, где они образуют колонии в виде окрашенных пятен, в зависимости от размеров колоний различают порок «малое или большое пятно». Когда подскорлупные оболочки сплошь покрыты колониями плесневых грибов, белок и желток смешаны, яйцо не просвечивается при овоскопии, порок называют «тумак плесневелый».

Дефект яиц «*малое пятно*» характеризуется наличием под скорлупой мелких неподвижных пятен общим размером 1/8 поверхности яйца; появляются в результате развития плесени и бактерий во время хранения яиц при повышенной температуре и высокой влажности воздуха.

Большое пятно - под скорлупой общим размером более 1/8 поверхности яйца, образуемое колониями плесеней и бактерий при тех же условиях хранения.

Тумак плесневый характеризуется тем, что яйцо при просвечивании непрозрачно, кроме пуги, так как все содержимое поражено плесенью, белок и желток смешаны. Яйцо приобретает запах плесени.

Яйца с признаками порчи «*тумак бактериальный*» и «*тумак плесневелый*» для пищевых целей непригодны. При пороке «малое или большое пятно» яйца используют после лабораторного исследования по указанию органов санитарного надзора.

В яйцах водоплавающей птицы, особенно у утиных, нередко обнаруживаются сальмонеллы. Для профилактики пищевых отравлений

реализация утиных и гусиных яиц на предприятиях общественного питания и в торговой сети запрещена.

Инфекции, передаваемые через яйцо. Через яйцо передаются инфекции, общие для человека и птицы. Яйца птицы, особенно водоплавающей, часто служат источником заражения туберкулезом и сальмонеллезом. Наибольшую опасность среди сальмонелл представляет *Salm. typhimurium*, которой бывают заражены не только утиные, но и куриные яйца. Считавшиеся ранее безопасными *Salm. pullorum gallinarum*, по данным зарубежных авторов (P. Edwards, 1958; G. Dack, 1957, и др., привожу по И. С. Загаевскому), иногда вызывают пищевые отравления. Заражение яиц происходит эндогенным или экзогенным путем. Находящиеся в яйцах сальмонеллы беспрепятственно размножаются, так как лизоцим на них не действует. Наиболее благоприятная часть яйца для развития сальмонелл - желток.

Кроме сальмонелл через поры скорлупы в яйцо проникают холерный вибрион и другие микробы. Туберкулезные бактерии были выделены из яиц не только явно больной, но и реагирующей на туберкулин птицы.

Для полного уничтожения возбудителей туберкулеза и сальмонеллеза, а также других инфекций куриные и утиные яйца рекомендуется выдерживать в кипящей воде 13 мин, гусиные - 14 мин. Яйцо водоплавающей птицы, а также кур из хозяйств, неблагополучных по туберкулезу и другим инфекциям, разрешается употреблять только в производстве кондитерских изделий. Реализация таких яиц через торговую сеть и предприятия общественного питания запрещена!

Хранение яиц. Длительное хранение яиц даже при отсутствии в них микробов приводит к изменению их содержимого. Белок разжижается, желток становится подвижным. При хранении рядом с пахучими веществами яйцо приобретает запах окружающей среды, воздушная камера его увеличивается. Наряду с физическими происходят и химические изменения. Так, белки частично расщепляются, количество фосфора и других веществ уменьшается, что снижает качество яиц. Замедлить изменения в яйце можно под действием низкой температуры. Для этого яйца помещают в холодильники при температуре 2-2,5°C и влажности 85%. В таких условиях яйца могут сохраняться в течение 6 мес. Низкая температура задерживает развитие микробов, а также усыхание яиц. Яйца, имеющие пороки, сохраняются плохо. Установить пороки яиц можно овоскопией. Свежие яйца хорошо пропускают свет. У старых яиц желток и белок более темные, а воздушная камера увеличена.

Консервирование яиц. Яйца, предназначенные для длительного хранения, консервируют. Существуют физические и химические методы консервирования яиц. Из физических методов применяют высушивание и замораживание.

Высушивание яичной массы проводят путем распыления в дисковых сушилках. В яичном порошке содержится 5-9 % воды. В таких условиях развитие микробов не происходит, но они длительное время могут оставаться жизнеспособными. Наряду с сапрофитами в яичный порошок попадают и возбудители инфекционных болезней. Среди них бывают и салмонеллы, которые сохраняются в яичном порошке в течение 4-9 мес. Яичный порошок расфасовывают в жестяные банки с пергаментной прокладкой и хранят при постоянной температуре не выше 15°C.

Замораживают содержимое только доброкачественных яиц. Белок и желток смешивают, фильтруют, разливают в жестяные банки и запаивают. Полученную замороженную смесь хранят при температуре минус 5... минус 10°C. В меланже могут содержаться *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Bac. mesentericus* и другие микробы, которые попадают из окружающей среды. В процессе хранения часть микробов погибает. Оставшиеся в живых микробы после размораживания быстро размножаются. Среди них иногда находят представителей рода *Salmonella*. Поэтому перед разбиванием яйца его поверхность очищают, дезинфицируют. Все оборудование необходимо содержать в чистоте. Размороженный меланж следует использовать в течение нескольких часов, иначе он испортится.

Химические способы преследуют цель предотвратить попадание микробов через поры скорлупы. Для этого используют растворы извести и жидкого стекла (3-10 %), в которые помещают яйца, а также подогретое до 50°C парафиновое масло. В парафиновое масло яйца погружают на короткое время. Иногда для сохранения яиц используют также растворы хлорида натрия, но при этом изменяется их вкус.

Контрольные вопросы:

1. Состав и строение яйца.
2. Эндогенное и экзогенное обсеменение яиц микроорганизмами.
3. Болезни, передаваемые через яйца.
4. Консервирование и хранение яиц.
5. Микробная порча яиц

Тема 11. МИКРОБИОЛОГИЯ БРОДИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДСТВ

МИКРОБИОЛОГИЯ ПИВОВАРЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА

Характеристика рас дрожжей, используемых в пивоварении. Физиологические свойства и условия жизнедеятельности дрожжей

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

Дрожжи Saccharomyces cerevisiae относятся к дрожжам *верхового брожения* и используются редко, в основном для темных и специальных сортов пива. Оптимальной температурой для развития этих дрожжей является температура 14-25. С (в производственных условиях они бродят при 12-15 °С). При брожении они всплывают на поверхность в виде «шапки».

Дрожжи Saccharomyces carlsbergensis осуществляют *низовое брожение* пивного сусла - оседая на дно бродильных емкостей. Эти дрожжи хорошо бродят при температуре 5-10°С и широко используются для приготовления стандартного и сортового пива.

Дрожжи, применяемые в пивоварении, принято называть культурными, т.к. они обладают признаками, приобретенными в результате длительного разведения (культивирования) в определенных технологических условиях. Для получения высококачественного пива дрожжи должны обладать следующими свойствами:

- **высокой бродильной активностью.** Бродильную активность определяют по степени сбраживания сусла (показатель, характеризующий отношение массы сброженного экстракта к массе сухого вещества в начальном сусле).
- **флокуляционной способностью** - медленно и полно оседать на дно бродильных аппаратов в конце главного брожения. Различия в флокуляционных свойствах лежат в основе деления дрожжей на *хлопьевидные* и *пылевидные*. Хлопьевидные дрожжи в конце главного брожения слипаются в комки - флокулы и при низовом брожении оседают, образуя плотный осадок, а при верховом - поднимаются на поверхность. Пылевидные дрожжи в течение всего процесса остаются во взвешенном состоянии.
- **умеренной способностью к размножению.** Очень активное размножение дрожжей нежелательно, т.к. при этом расходуются экстрактивные вещества сусла и образуется большое количество побочных продуктов (в среднем в процессе брожения биомасса дрожжей увеличивается в 3-4 раза);
- **стойкостью к неблагоприятным условиям и инфицированию;**
- **стабильностью морфологических и физиологических свойств;**
- **способностью придавать пиву характерный вкус и аромат.**

Условия жизнедеятельности дрожжей зависят от:

- **углеводного состава суслу.** Определяется наличием в сусле сбраживаемых и несбраживаемых сахаров. Содержание сбраживаемых сахаров в сусле составляет 70-80% сухих веществ. Это мальтоза (60-70%), мальтотриоза (15-20%), глюкоза (10-15%). Быстрее всего сбраживаются моносахара, медленнее мальтоза и хуже всего мальтотриоза.
- **азотистого состава суслу.** Азотистые вещества необходимы клеткам для синтеза компонентов, обеспечивающих их рост и размножение. Наиболее ценными и важными источниками азота являются аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания. От биосинтеза и распада аминокислот зависит образование ароматических веществ. Образующиеся при биосинтезе дрожжей аминокислоты придают пиву бархатистую консистенцию. При неблагоприятных условиях культивирования они могут быть причиной дрожжевого привкуса и помутнения пива.
- **температуры и наличия в среде кислорода.** При низкой температуре и анаэробных условиях размножение дрожжей замедляется, но вырастают они более крупными с большим запасом резервных веществ и высокой бродильной активностью. При повышении температуры и аэрации увеличивается потребность дрожжей в питательных веществах, размеры клеток уменьшаются, они не содержат запасных веществ и вырастают более слабыми.

В настоящее время в нашей стране при производстве пива используются различные расы (штаммы) низовых дрожжей, отличающиеся между собой физиологическими свойствами. Это среднесбраживающие расы 776, 41, 44, S (Львовская), P и сильносбраживающие -11, A, 8a(M), F.

Разведение чистых культур дрожжей в пивоваренном производстве

В пивоварении используют чистые культуры дрожжей, которые поступают на заводы из музейной коллекции Всероссийского НИИ БП в пробирках на плотных питательных средах. В условиях пивоваренных заводов чистые культуры хранят при температуре не выше 5-8 °С и периодически (не реже 4 раз в год) пересевают на свежий сусло-агар.

Задачей разведения чистой культуры является увеличение биомассы дрожжей от объема пробирки до объема, вводимого в бродильный аппарат.

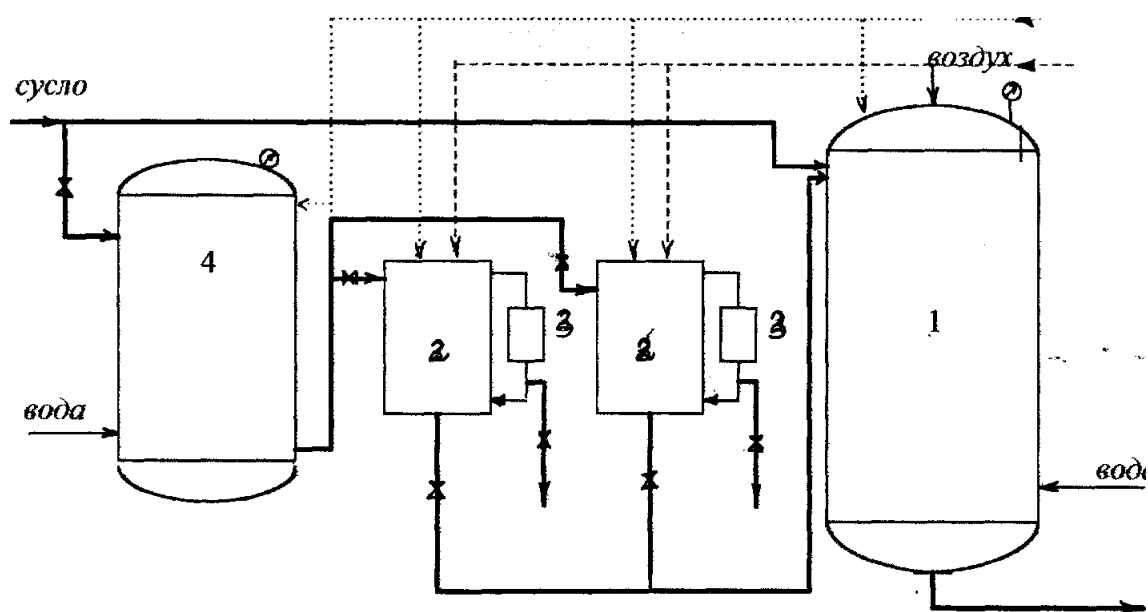
Разведение чистой культуры дрожжей ведут на стерильном охмеленном сусле с концентрацией сухих веществ 11-13 %, постепенно адаптируя дрожжи к суслу и низкой температуре. Процесс разведения состоит из двух стадий: лабораторной и цеховой.

Лабораторная стадия разведения чистой культуры. Из пробирки дрожжи последовательно пересевают через 24-36 часов во все возрастающие объемы стерильного суслу:

$0,02\text{см}^3 \rightarrow 0,1\text{дм}^3 \rightarrow 0,5\text{дм}^3 \rightarrow 2,5\text{дм}^3 \rightarrow 10\text{дм}^3$ (колбы Карлсберга)

На первой стадии пересева температуру поддерживают на уровне 20-23 °С, на последующих - 8-10 °С. Дрожжи пересевают по достижении энергичного брожения. В колбе Карлсберга брожение длится 5-6 суток, после чего дрожжи передают в цех для размножения в установке чистой культуры.

Размножение дрожжей в установке Грейнера. Установка Грейнера состоит из двух стерилизаторов - малого (4) объемом 65 дал и большого (1) объемом 400 дал и двух цилиндров (2) для сбраживания по 36 дал. Цилиндры для сбраживания оборудованы сосудами (3) объемом 10л для отбора чистой культуры в период работы аппарата. Стерилизаторы снабжены змеевиками для нагрева и охлаждения суслу, воздушными фильтрами и контрольно-измерительными приборами. Сосуды (3) имеют подвод стерильного воздуха и соединены коммуникациями со стерилизаторами 1 и 4.



Установку перед пуском стерилизуют. В стерилизатор 4 набирают горячее охмеленное сусло, стерилизуют паром под давлением и охлаждают. Сусло передают в бродильные цилиндры (2). Колбы Карлсберга снаружи хорошо обтирают спиртом, содержимое сильно взбалтывают и стерильно переливают в бродильные цилиндры (2). В течение 3 суток при температуре 7-8 °С происходит размножение дрожжей и сбраживание суслу. К моменту готовности дрожжей большой стерилизатор (1) заполняют суслу, стерилизуют и охлаждают, после чего туда передают содержимое бродильного цилиндра. Часть сброженного суслу из каждого бродильного цилиндра отбирают в сосуды (3), где оно хранится до следующей разводки. Бродильные цилиндры (2) после освобождения вновь заполняют стерильным суслу из малого стерилизатора и засевают дрожжами, хранящимися в сосудах (3). Процесс разведения дрожжей в установке Грейнера повторяют непрерывно до обнаружения загрязнения культуры.

Дрожжи в период главного брожения и дображивания

Дрожжи вводят в сусло в начальный момент заполнения бродильного аппарата. Начальное количество дрожжевых клеток составляет 25-50 млн клеток (0,4-0,5 л на 10 дал). От нормы введения дрожжей зависят скорость брожения и рост дрожжей: скорость пропорционально возрастает, а рост наоборот - тормозится. Кроме того, при очень высоких нормах задачи дрожжей в пиве появляются горечь и неприятный аромат. На практике норму задачи дрожжей увеличивают при использовании культуры с ослабленной бродильной активностью, при увеличенном содержании экстрактивных веществ и недостатке азотистых веществ, холодном режиме брожения и необходимости его ускорения, а также при незначительном количестве кислорода в сусле.

Рост и размножение дрожжей в период главного брожения подчиняется закону роста статической культуры. В *лагфазе* видимые признаки размножения дрожжей отсутствуют. Продолжительность этой фазы 1-1,5 суток. При этом увеличиваются размеры клеток, возрастает количество почкующихся клеток, содержание мертвых клеток в этот момент минимальное. В *лагфазе* рост дрожжевых клеток наиболее интенсивный, скорость почкования максимальна. Из-за быстрого размножения размеры клеток уменьшаются. В *стационарной фазе* размножение дрожжей замедляется. К концу стационарной фазы количество живых клеток остается без изменения, а их размеры вновь увеличиваются - начинается спиртовое брожение. В *фазе замедления роста* размножение дрожжей прекращается вследствие уменьшения количества экстракта и накопления спирта. Клетки инактивируются и отмирают, оседают на дно бродильного аппарата или собираются на поверхности.

Производственные засевные дрожжи

Засевные дрожжи - это дрожжи, осевшие в бродильных аппаратах после главного брожения, которые собирают и используют для последующих производственных циклов несколько раз (10-12 генераций).

Получение засевных дрожжей состоит из нескольких операций:

- **Съем дрожжей.** Все фракции осадочных дрожжей обладают достаточно высокой бродильной активностью. Поэтому в специальный приемник собирают после деконтации молодого пива все осевшие дрожжи.
- **Очистка дрожжей.** Дрожжи из приемного сборника направляют на вибрационное сито, где их путем процеживания отделяют от крупных белковых хлопьев и остатков хмелевых веществ. Очищенные дрожжи направляют в монжу или дрожжевые ванночки и заливают 2-3 кратным количеством охлажденной до 0-2°C водой. После тщательного перемешивания дрожжи отстаивают 2-3 часа. Мутную воду, содержащую остатки пива, мелкие взвешенные белковые и хмелевые вещества и мертвые клетки, осторожно сливают. При наличии в засевных дрожжах большого количества посторонних микроорганизмов их очищают

минеральными кислотами (засевные дрожжи разводят водой в отношении 1:3 и добавляют 10% серную кислоту до концентрации ее в разводке 0,2%). В растворе кислоты дрожжи оставляют на 30-60 мин. При этом хлопьевидные дрожжи приобретают свойства пылевидных, что обеспечивает контакт кислоты с посторонними микроорганизмами. После обработки серной кислотой дрожжи нейтрализуют содой и оставляют на 1-2 часа для оседания. Затем воду сливают, а осадок дрожжей промывают 2-3 раза холодной водой. Очистка дрожжей кислотами ослабляет дрожжевые клетки, поэтому норму введения их в сусло увеличивают.

Известны также способы обработки дрожжей 0,1-0,5% раствором уксусной кислоты в течение 10 час с последующей нейтрализацией, а также сернистой, солянок и лимонной кислотами; использование водных и щелочных препаратов хмеля. Для уничтожения посторонних диких дрожжей можно применять 0,5-1% раствор винной кислоты, молочнокислых бактерий - 0,1-0,6% раствор фосфорной кислоты.

Для очистки засевных дрожжей за рубежом используют антибиотики: полимиксин, неомицин, пенициллин.

- **Хранение дрожжей.** Дрожжи хранят под слоем воды при 0-2°C не более 4-5 суток, т.к. при этом бродильная активность снижается. Не реже 1-2 раз в сутки воду с поверхности воды заменяют свежей холодной водой (при этом дрожжи не перемешивают). В прессованном виде дрожжи можно хранить в закрытых баках при температуре -2-0°C в течение 1-2 недель. Можно также хранить дрожжи под слоем свежего пива (5-10 см) в течение не более 4 недель при 0-2° С.

- **Активирование дрожжей.** Перед введением в бродильные аппараты дрожжи активируют одним из способов:

1. дрожжи смешивают с аэрированным суслом с температурой 15-17 °С в соотношении 1:1, после чего добавляют 1/3-1/4 часть холодного сусла;

2. дрожжи заливают суслом на 2-4 ч для увеличения содержания гликогена в клетках;

3. в засевные дрожжи вносят водные вытяжки или экстракты солодовых ростков, богатых азотом и биологически активными веществами. В бродильный аппарат вводят здоровые, физиологически активные засевные дрожжи, содержащие не более 5% мертвых клеток; упитанность по гликогену должна быть не ниже 70%, посторонних бактериальных клеток - не более 0,5%.

Микроорганизмы - вредители пивоваренного производства

Производство пива ведется в нестерильных условиях. Поэтому не исключено попадание в сусло, молодое и готовое пиво разнообразных микроорганизмов. Естественная **биологическая стойкость пива** обусловлена:

- бактерицидным действием хмелевых смол;

- низкой температурой брожения;
- кислой реакцией среды (рН 5,4-4,6);
- отсутствием кислорода;
- содержанием в пиве диоксида углерода и этилового спирта;
- санитарно-гигиеническим состоянием производства.

Источниками посторонних и вредных микроорганизмов в производстве пива являются сырье, вода, воздух, дрожжи, аппаратура и коммуникации, фильтрующие и вспомогательные материалы, руки и спецодежда работников.

Микрофлора ячменя и солода. Микроорганизмы, присутствующие на ячмене можно разделить на три группы:

- *Сапрофитная группа.* Сюда относятся микроорганизмы, попавшие в зерно в полевых условиях: бактерии рода *Pseudomonas* (70-95% всех бактерий), микрококки, палочки, спорообразующие бактерии родов *Bacillus*, *Clostridium*, мицелиальные грибы - *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium*.
- *Группа фитопатогенных микроорганизмов.* К ней относятся паразитические грибы и бактерии: спорынья, головня, некоторые виды фузариума и бактерий рода псевдомонас;
- *Патогенные для человека и животных микроорганизмы* - возбудители сибирской язвы, бруцеллеза, сапа и др. - относятся к случайной микрофлоре зерна и попадают на него с органическими удобрениями, почвой, разносятся грызунами и животными.

В процессе солодоращения количество микроорганизмов возрастает: дрожжей в 5-10 раз, грибов - в 2,5-5 раз, бактерий в 50-100 раз. Далее в процессе сушки солода численность микроорганизмов снижается, однако их содержание в готовом солоде значительно выше, чем в ячмене. При излишней обсемененности солода качество сусле и пива снижается. Так, аспергилловые грибы придают пиву специфические подгоревший грубый запах и мелассный привкус, грибы кладоспориум и фузариум вызывают появление горького винного привкуса. Применение солода, полученного из потемневшего зерна с низкой прорастаемостью, влияет на ход технологического процесса: снижается выход экстрактивных веществ в сусле, повышается его вязкость, возрастают продолжительность осахаривания и фильтрования затора, уменьшается стойкость к коллоидному помутнению.

Микрофлора сусле и пива.

К *грамположительным бактериям*, встречающимся в сусле и пиве, относятся молочнокислые палочки, пивные сарцины, микрококки.

Молочнокислые палочки (лактобациллы) в пиво попадают с суслем, засевными дрожжами, недостаточно чистой водой, вызывая ухудшение вкуса и аромата пива, вызывая помутнение и прокисание, а иногда - ослизнение.

Пивные сарцины хорошо развиваются в присутствии углекислого газа и спирта и обычно размножаются в пиве низового брожения, образуя

опалисцирующую муть, мелкозернистый осадок, ослизнение, вызывая появление в пиве неприятного вкуса и медового запаха (сарцинное заболевание пива).

Микрококки, стрептококки легко приспосабливаются к анаэробным условиям, скапливаются в дрожжевых осадках бродильных и лагерных танков. Вызывают помутнение пива и изменение его вкуса.

К грамотрицательным микроорганизмам относятся уксуснокислые бактерии, бактерии группы кишечной палочки и др.

Уксуснокислые бактерии относятся к аэробным микроорганизмам и начинают размножаться в пиве даже при малом содержании кислорода, попадая в него из сусла, с засевными дрожжами. Эти бактерии вызывают быстрое прокисание пива, помутнение, некоторые виды образуют слизь и придают тягучесть пиву.

Флавобактерии попадают в производство с засевными дрожжами. Рост бактерий идет более интенсивно, если оно медленно разбраживается дрожжами и имеет низкую кислотность (рН более 5). В инфицированном пиве появляется шелковистая муть и запах пастернака.

Ахромобактерии отличаются подвижностью и развиваются в широком интервале рН (3,5-7,5). Если условия благоприятны для этих бактерий, то они вызывают порчу пива (помутнение и неприятный запах) в течение нескольких часов.

Бактерии группы кишечных палочек попадают в производство с недоброкачественной водой, с засевными дрожжами, при несоблюдении правил личной гигиены работниками производства. Развиваются в сусле, придавая пиву сладковатый, фруктовый привкус и запах вареной капусты. В пиве не размножаются, но сохраняются в течение 2-3 недель.

Дикие дрожжи. Являются вредителями производства, так как тормозят развитие культурных дрожжей, ухудшают органолептические свойства пива. Наиболее распространенными среди диких дрожжей, встречающихся в пивоварении, являются дрожжи родов *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Candida*, *Pihia*, *Torulopsis* и др.

Дрожжи-сахаромицеты обычно увеличивают содержание в пиве содержание высших спиртов и эфиров, придают пиву сладковатый или терпко-горький вкус, вызывают помутнение пива и образование неприятного запаха. Это сахаромицэс элепсоидэс, валидус, пастерианус апикулята и др.

Дрожжи ганзенула при сбраживании сахаров образуют, кроме этилового спирта, бутиловый, амиловый спирты, уксусную, масляную, янтарную кислоты и эфиры, что обуславливает резкий запах пива.

Дрожжи пихия и кандида, развиваясь в пиве, образуют белую или сероватую пленку, вызывают помутнение, придают пиву фруктово-эфирный и лекарственный привкус.

В 60-е годы в пивоваренном производстве были обнаружены ненормально мелкие дрожжевые клетки, замедляющие брожение и ускоряющие отмирание производственных дрожжей, так как они выделяют в среду токсичный белок - «убивающий фактор». Эти дрожжи называли

дрожжами-убийцами.

Микробиологический контроль пивоваренного производства

Микробиологический контроль является важнейшим участком работы по оценке качества сырья, полуфабрикатов и готовой продукции на пивзаводах. Он осуществляется на всех технологических стадиях и включает объекты наиболее важные и уязвимые в биологическом отношении. Наиболее важными микробиологическими показателями являются общая бактериальная обсемененность и наличие бактерий группы кишечной палочки. Производственный микробиологический контроль включает:

- **Контроль сусла.** При микробиологическом контроле сусла в нем определяют *биологическую стойкость* (пробы сусла отбирают в нескольких повторностях в стерильные пробирки, закрывают ватными пробками, отмечают место отбора, дату, № варки и помещают в термостат с температурой 20 °С. Стойкость сусла является очень хорошей, если через 4 суток нет помутнения и плохой, если помутнение наблюдается через 1 сутки). После определения стойкости проводят микроскопирование, определяя основные группы микроорганизмов, вызвавшие изменения в сусле. Определяют в сусле также *общую бактериальную обсемененность* и *содержание кислотообразующих микроорганизмов*.

- **Контроль засевных дрожжей.** Разводки чистых культур анализируют на присутствие в них посторонних микроорганизмов и мертвых клеток. При наличии посторонних микроорганизмов проводят разведение новой чистой культуры. Производственные засевные дрожжи исследуют ежедневно из каждой ванночки: проверяют морфологию клеток, содержание мертвых клеток, гликогена, определяют присутствие посторонних микроорганизмов. Количество мертвых клеток в засевных дрожжах не должно превышать 5%, а количество бактерий 0,5 % и диких дрожжей 1%.

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

- **Контроль готового пива.** Готовое пиво проверяют на биологическую стойкость, а также определяют общую бактериальную обсемененность и наличие БГКП. Биологическая стойкость каждого сорта пива характеризуется временем (в сут), в течение которого не происходит развитие в нем микрофлоры. Если стойкость ниже, то определяют кМАФАНМ (в пиве не должно быть более 100 клеток в 1 см³).

- **Контроль воды и материалов.** Устанавливаются нормы обсемененности каждого объекта. Так, например, количество

микроорганизмов в смывных водах после дезинфекции оборудования должно быть близким к содержанию микроорганизмов в воде, кишечные палочки должны отсутствовать.

Санитарно-гигиенический контроль пивоваренного производства

Хранение ячменя

Помещение для хранения зерна является наиболее запыленным участком производства. Поэтому, санитарные правила предусматривают установку пылеуловителей и вентиляторов, а также уборку помещения в каждую смену.

Перед поступлением новой партии ячменя складские помещения тщательно очищают от мусора и дезинфицируют. В силосные емкости загружают ячмень с содержанием влаги не выше 12 – 15 % и регулярно проветривают.

Солодовенный цех

Санитарные мероприятия направлены на борьбу с зерновой пылью, механическими примесями, микроорганизмами.

Ячмень, поступающий на замачивание, после тщательной мойки рекомендуется дезинфицировать гашеной известью, хлорной известью, формалином или перманганатом калия для инактивации микрофлоры, присутствующей на зерне.

Рекомендуется чистка, мойка и дезинфекция хлорной известью или формалином чанов и солодорастильных аппаратов после их от освобождения от солода.

Для борьбы с мицелиальными грибами поверхность стен цеха перед их побелкой следует обрабатывать антисептиком (например, 2 – 4 % раствором медного купороса).

Варочный цех

После каждой варки внутреннюю поверхность заторных котлов, фильтрационных аппаратов и суловарочных котлов необходимо тщательно чистить и мыть. Коммуникации необходимо ежедневно промывать холодной и горячей водой, затем пропаривать 15 – 20 мин. И вновь промывать холодной водой.

Производственные отходы – пивную и хмелевую дробину из варочного цеха насосом перекачивают в закрытые бункеры. Хранить и транспортировать дробину открытым способом не рекомендуется.

Необходимо обеспечить надлежащие санитарные условия процесса осветления и охлаждения сула. Сепараторы для осветления сула промывают и обрабатывают 2 % -ным раствором каустической соды, а затем снова промывают водой. Теплообменники 2 раза в неделю чистят и дезинфицируют 1 % -ным горячим раствором щелочи. Дезинфекцию всего варочного отделения обычно проводят антиформинном не реже 2 раз в месяц.

Дрожжевое отделение (отделение ЧК)

Должно быть изолировано от других производственных цехов. Дрожжевые ванночки и другое оборудование дезинфицируют 1 % раствором хлорной извести или антиформинном.

Бродильное отделение

Бродильные чаны и танки после перекачивания молодого пива для дображивания очищают механическим способом, моют и обрабатывают дезинфицирующим препаратом в течение 30 мин, после чего омывают водой универсальным дезинфектантом, которым является аммонийное соединение катамин АБ.

Цех дображивания

Для дезинфекции танков применяют те же средства, что и в цехе брожения. Проводят тщательную обработку пивопроводов до начала и после окончания работы путем промывания водой. 2 раза в неделю дезинфицируют антиформинном, каустической содой или катамином АБ с последующим промыванием водой.

Цех розлива

Всю систему фильтровально – разливной установки ежедневно моют, 1 раз в неделю дезинфицируют антиформинном или раствором хлорной извести. Розлив автомата промывают чистой водой до и после розлива пива. Пивопровод между фильтрационным отделением и разливочными машинами пропаривают 1 раз в неделю в течение 15 мин.

Розлив пива проводят в отдельных помещениях. Бутылки, танки и автоцистерны перед наполнением тщательно моют. Для обработки бутылок в бутылкомоечных машинах применяют смесь 0,5 % растворов санпора и каустической соды.

Общий санитарно – гигиенический контроль включает систематическую проверку чистоты воды, рук и спецодежды работников на наличие БГКП.

Вопросы для самопроверки

- 1. Какую роль выполняют дрожжи в пивоварении?*
- 2. Какие дрожжи относятся к дрожжам верхового и низового брожения?*
- 3. Как влияет скорость размножения дрожжей на процесс размножения пива?*
- 4. Какое значение при приготовлении пива имеет способность дрожжей к флокуляции?*
- 5. Какие Вы знаете расы дрожжей?*
- 6. Как проводят разведение чистой культуры в лабораторных условиях?*
- 7. Что такое «чистая культура» дрожжей?*
- 8. Как получают производственную разводку чистой культуры в аппаратах Грейнера?*

9. *Какие дрожжи называют засевными?*
10. *Как очищают и хранят засевные дрожжи?*
11. *Каковы основные источники инфицирования в пивоварении?*
12. *Какие микроорганизмы входят в состав микрофлоры зерна и солода?*
13. *Как влияет микрофлора солода на качество готового пива?*
14. *Какие бактерии могут развиваться в сусле и пиве и вызывать ухудшение органолептических показателей пива?*
15. *Какие дикие дрожжи вызывают порчу сусла и пива?*
16. *Как проводится микробиологический контроль в пивоваренном производстве?*
17. *Каким образом определяется биологическая стойкость сусла, молодого пива, готового пива?*
18. *Какие микробиологические показатели определяются в готовом пиве?*

МИКРОБИОЛОГИЯ СПИРТОВОГО ПРОИЗВОДСТВА

Микрофлора сырья при производстве спирта

В качестве сырья в производстве спирта используют крахмалсодержащее сырье (картофель, злаковые культуры), а также вторичное сырье производства сахара - мелассу. От содержания микроорганизмов в сырье во многом зависит процесс спиртового брожения.

Микрофлора несоложенного сырья

Картофель. На спиртовые заводы поступает картофель различного качества: здоровый, мороженный, дефектный, пораженный болезнями и вредителями.

При хранении здорового картофеля на неповрежденном эпидермисе клубней большая часть микроорганизмов находится в неактивном состоянии. На клубнях с механическими повреждениями могут развиваться возбудители гнили и болезней картофеля: микроскопические грибы - фитофтора, фузариум, фома, бактерии родов *Streptomyces* (актиномицеты) и *Corynebacterium*, а также другие микроорганизмы.

Активное размножение микроорганизмов наблюдается в подмороженных и мороженных, а затем оттаявших клубнях. Такой картофель может стать в производстве источником бактерий рода *Bacillus* и *Clostridium*: *Bacillus aerothermophilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus coagulans*, *Clostridium butyricum*, споры которых имеют повышенную термоустойчивость, а клетки способны развиваться в кислой среде.

Зерно. Микрофлора та же, что и в ячмене (см. 2.1).

Меласса. Ее микрофлора зависит от особенностей технологии сахарного производства, способов транспортирования мелассы и условий ее хранения. В мелассе обнаруживаются почвенные бактерии и микроорганизмы-

вредители, развивающиеся на разных стадиях производства сахара. В мелассе микроорганизмы в связи с высоким содержанием сухих веществ не размножаются. Однако при разбавлении мелассы водой она становится благоприятной средой для размножения микроорганизмов, и их количество возрастает в десятки и сотни тысяч раз. В результате активной жизнедеятельности микроорганизмов химический состав меласс изменяется, и они переходят в категорию дефектных. В состав микрофлоры мелассы входят аэробные спорообразующие палочки рода *Bacillus*: *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus* и др., а также анаэробные клостридии *Clostridium butyricum*. Среди неспорообразующих бактерий присутствуют псевдомонады, которые активно размножаются в разбавленных мелассах, что приводит к потерям сахара и восстановлением содержащихся в мелассе нитратов в нитриты, которые являются чрезвычайно ядовитыми веществами. Кроме того, в мелассе могут развиваться кислотообразующие бактерии - лейконостоки и молочнокислые бактерии *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermenti* и др., являющиеся вредителями спиртового производства. В микрофлоре мелассы присутствуют также дикие дрожжи, кокковая микрофлора, микроскопические грибы.

Солод. В солоде наиболее часто встречаются мицелиальные грибы, дикие дрожжи, спорообразующие бациллы и неспорообразующие бактерии: сарцины, уксуснокислые, молочнокислые бактерии. Наиболее опасными для спиртового производства являются гомо- и гетероферментативные молочнокислые бактерии, которые неблагоприятно воздействуют на ферменты солода и дрожжевые клетки.

Солодовое молоко. В нем микроорганизмы размножаются особенно быстро. Наиболее часто в солодовом молоке обнаруживаются молочнокислые палочки и кокки, уксуснокислые и маслянокислые бактерии, микроскопические грибы - пенициллы, аспергиллы, мукоровые грибы.

Ферментные препараты. Кроме спор грибов-продуцентов в ферментных препаратах могут присутствовать споры посторонних грибов, аэробные споровые палочки, молочнокислые бактерии.

Характеристика микроорганизмов, используемых в производстве спирта

В спиртовом производстве применяют **дрожжи** вида *Saccharomyces cerevisiae*, которые относятся к дрожжам верхового брожения. Основными требованиями, предъявляемыми к расам дрожжей при **производстве спирта**, являются:

- высокая бродильная активность. Спиртовые дрожжи должны образовывать максимум спирта;
- способность сбраживать как моносахариды, так и дисахариды и некоторые декстрины;
- способность сбраживать растворы, содержащие довольно большие

концентрации сахара (в производстве спирта из мелассы концентрация сахара составляет 13-15% и более);

• способность осуществлять спиртовое брожение при высоком содержании спирта в растворе.

При производстве спирта из крахмалсодержащего сырья чаще всего используют расу ХП, а в производстве спирта из мелассы - расы Я, Л и В.

Успешное применение находят гибридные дрожжи, выведенные в институте генетики АН путем скрещивания двух видов дрожжей. Так, гибрид 67 получен скрещиванием пивных дрожжей и спиртовых расы Я, основной особенностью которого является наличие у него фермента α -галактозидазы и способность сбраживать рафинозу.

Производственные спиртовые дрожжи - круглые или яйцевидные клетки размером 5-6,2x5-8 мкм, распределяющиеся во всем объеме сусла, пылевидные.

Основными факторами, влияющими на жизнедеятельность дрожжей в спиртовом производстве, являются температура, рН среды, концентрация сусла, содержание органических и неорганических кислот.

Температура. Оптимальная скорость роста спиртовых дрожжей 30-32 °С, однако дрожжи, выращенные при температуре ниже оптимальной имеют более высокую бродильную активность, поэтому процесс брожения начинают при температуре 18-22 °С, а во время брожения ее поддерживают на уровне 29-30 °С. Более высокая температура вызывает снижение бродильной активности и способствует развитию молочнокислых бактерий и диких дрожжей.

РН среды. Водородные ионы изменяют электрический заряд коллоидов плазменной оболочки клетки и в зависимости от концентрации могут увеличивать или уменьшать проницаемость оболочки клеток для отдельных веществ и ионов. От величины рН зависит скорость поступления питательных веществ в клетку, активность ферментов, образование витаминов.

При изменении рН среды изменяется характер брожения: если рН смещается в щелочную зону, то увеличивается содержание глицерина и побочных веществ в бражке. Оптимальным рН для развития дрожжей является 4,8-5,0, однако в спиртовом производстве его стараются поддерживать на уровне 3,8-4,0, чтобы подавить развитие молочнокислых бактерий. Необходимый рН создают добавлением серной, соляной или молочной кислоты.

Содержание сахара в сусле. Очень высокие концентрации сахара повышают осмотическое давление в дрожжевых клетках, а низкие - экономически невыгодны, поэтому сбраживают сусло с содержанием сухих веществ, что соответствует содержанию в нем 13-15% сахара. В зависимости от исходной концентрации сахара и производственных потерь содержание спирта в зрелой бражке составляет 8-9,5 об. %.

Содержание спирта. Спирт оказывает тормозящее влияние как на размножение, так и на бродильную способность дрожжей. Торможение

брожения наблюдается при содержании спирта 12-16%. Поэтому концентрация Сахаров в сусле должна быть такой, чтобы в зрелой бражке крепость спирта не превышала 10 об.%.

Иногда для подкисления сусла при производстве спирта из картофеля и зерна используют **молочнокислые бактерии** вида *Lactobacillus delbrueckii* штаммов 52 и смешанная культура со штаммом 70. Это грамположительные не образующие спор палочки, которые осуществляют гомоферментативное молочнокислое брожение. Культивирование молочнокислых палочек ведут при температуре 50°C до кислотности 2,0-2,2 ° для картофельного и 1,7-2,0° для зернового сусла, а потом проводят пастеризацию сусла при 75°C. В сусле, подкисленном молочнокислыми бактериями, увеличивается содержание растворимых азотистых веществ, что благоприятно сказывается на размножение дрожжей.

Разведение чистых культур дрожжей и молочнокислых бактерий в спиртовом производстве

Разведение чистой культуры дрожжей в спиртовом производстве

Чистые культуры дрожжей спиртовые заводы получают из отраслевых институтов: Всероссийского НИИ продуктов брожения и Украинского НИИ спиртовой и ликероводочной промышленности, которые рассылают в пробирках, закрытых ватными пробками на скошенном сусло-агаре. На заводах пробирки с чистыми культурами дрожжей хранят в холодильнике при температуре 4-6°C, пересевая не реже одного раза в 2 мес.

При разведении чистой культуры дрожжей вначале получают лабораторную разводку чистой культуры по схеме:

пробирка → колба (0,5-1 л) → колба (3-5 л) → бутылка (15-20 л)

Посев в пробирки осуществляют на стерильное солодовое сусло концентрацией 8-10% СВ и кислотностью 0,3-0,5°. Затем пробирки помещают в термостат с температурой 30 °С. Забродившее в пробирке сусло переводят в 0,5-1 л колбу с стерильным солодовым суслом с концентрацией 12% СВ и вновь помещают в термостат. Затем переносят содержимое колбы в колбу большего объема со стерильным суслом с концентрацией 12-15%, приготовленного из сырья, перерабатываемого на заводе. Для последней лабораторной разводки готовят бутылки на 15-20 л с нефилтрованным, хорошо осахаренным дрожжевым суслом (стерильным или пастеризованным) с концентрацией 17-18% СВ и кислотностью 0,8 ° при подкислении серной и 2 ° - молочной кислотой. Выдерживают разводку 18-24 часа при 25-26°C и определяют микроскопированием их чистоту, морфологическое состояние, наличие гликогена.

Производственные стадии разведения чистой культуры ведут а аппаратах засевных дрожжей, используя пастеризованное или стерильное

сусло с концентрацией 18-19% СВ и кислотностью 0,9 град. В течение 18-24 час, сбразивая сусло до концентрации спирта 6-7%, после чего дрожжи передают в дрожжевой аппарат или дрожжегенератор.

Производственные стадии разведения чистых культур в производстве спирта из мелассы включают:

АЧК-1 (20 л) → АЧК-2 (1м³) → АЧК-3 (5м³) → Дрожжегенератор (50 м³)
Разведение чистой культуры молочнокислых бактерий

Молочнокислые бактерии *Lactobacillus delbrueckii* штаммов 52 и смешанная культура со штаммом 70 рассылаются отраслевыми НИИ в запаянных ампулах на солодовом сусле с дробинкой и мелом.

Для получения заводской культуры молочнокислых бактерий одной ампулой засевают 0,5 л стерильного сусла концентрацией 15% СВ. Колбу, засеянную штаммами 52 и 70 закрывают ватной пробкой и помещают в термостат с температурой 50-51°С на 15-18 час. Первое разведение переводят в бутылки с 7-8 л стерильного сусла. Бутылку с культурой выдерживают 10-12 ч в термостате при температуре 50-51°С и передают в засевной аппарат с 6-8 дал сусла. Через определенное время размножения культуру передают в дрожжевой аппарат.

Чистую культуру молочнокислых бактерий в заводской лаборатории поддерживают на стерильном сусле с концентрацией 8-10% СВ с дробинкой и мелом. Пересев ведут через 8-12 сут. Хранят культуру в холодильнике.

Микробиологический контроль в спиртовом производстве

Микробиологический контроль спиртового производства включает исследование производственных дрожжей и бражки.

Микробиологический контроль производственных дрожжей

Дрожжи ежесменно просматривают под микроскопом и определяют количество дрожжевых клеток в 1 см³ содержание в них гликогена, процент почкующихся и мертвых клеток, наличие посторонних микроорганизмов.

При правильном ведении технологического процесса дрожжи редко являются источником инфицирования. Их кислотность остается постоянной. При нарушении технологического режима в дрожжах могут присутствовать молочнокислые бактерии *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermenti*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* и др., уксуснокислые бактерии, дикие дрожжи. Спорообразующие бактерии обычно не развиваются в производственных условиях. При нормальном технологическом режиме в дрожжах обнаруживаются 1-3 палочки бактерий в поле зрения микроскопа.

Содержание почкующихся клеток в засевных дрожжах не должно превышать 3 %, а в дрожжах из дрожжегенератора - 25-30 %. По содержанию гликогена судят о степени упитанности дрожжей: при средней упитанности

гликогена в клетках содержится 20-25% объема, при хорошей - от 35-50 и более. Содержание мертвых клеток не должно превышать 5%. Нормальные производственные дрожжи содержат в 1 см³ 120-160 млн. клеток.

Контроль бражки. Один раз в смену определяют степень инфицирования бражки из каждого бродильного аппарата посторонними микроорганизмами прямым микроскопированием и титрованием. В первые часы брожения (12-22 ч) посторонние микроорганизмы должны отсутствовать. В период главного брожения допускается наличие отдельных посторонних клеток, а при дображивании количество бактерий не должно превышать 3-5 в поле зрения микроскопа. Титруемая кислотность бражки с дрожжами должна быть в пределах 0,2-0,3 град, зрелой бражки - 0,3-0,5 град.

Вопросы для самопроверки

- 1. Какие микроорганизмы входят в состав микрофлоры несоложенного сырья?*
- 2. Какие микроорганизмы входят в состав микрофлоры мелассы?*
- 3. Какие микроорганизмы, вносимые с сырьем, являются наиболее опасными для спиртового производства?*
- 4. Какие дрожжи используют при производстве спирта из крахмалсодержащего сырья, мелассы?*
- 5. Перечислить факторы, влияющие на жизнедеятельность спиртовых дрожжей?*
- 6. Какие требования предъявляются к дрожжам в спиртовом производстве?*
- 7. Почему сбраживание суслу в спиртовом производстве ведут при температуре ниже оптимальной?*
- 8. При каком значении рН ведут спиртовое брожение и чем это обусловлено?*
- 9. Для чего в спиртовом производстве используют чистые культуры молочнокислых бактерий?*
- 10.. Какие молочнокислые бактерии используются при производстве спирта?*
- 11. Как получают лабораторную разводку из чистой культуры дрожжей?*
- 12. Каким образом проводят разведение чистой культуры молочнокислых бактерий?*
- 13. Как проводится микробиологический контроль в спиртовом производстве?*

МИКРОБИОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА БЕЗАЛКОГОЛЬНЫХ НАПИТКОВ И КВАСА

Микроорганизмы, применяемые в производстве кваса.

Хлебный квас является продуктом незаконченного спиртового и молочнокислого брожения. Спиртовое брожение вызывается квасными дрожжами – сахаромицетами, при этом накапливаются до 0,5 % об. спирта и выделяется диоксид углерода. Молочнокислые бактерии (гетероферментативные), превращают сахара квасного сусла в молочную, уксусную, янтарную кислоты, CO_2 , ароматические вещества, спирт.

Квасные дрожжи относятся к виду *Saccharomyces minor* (раса М) и *Saccharomyces mines cesevisiae*. Очень часто дрожжи квасные используются в сушеном виде с содержанием 7 – 10 % влаги.

Квасные молочнокислые бактерии относятся к виду *Lactobacillus fermenti* штаммов 11 и 13, которые выделены из лучших образцов хлебного кваса.

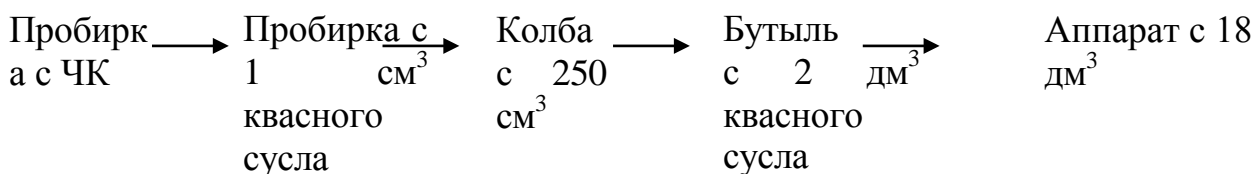
Чаще всего в производстве кваса используют комбинированную закваску, содержащую ЧК квасных дрожжей рас М квасных молочнокислых бактерий штаммов 11 и 13.

Во взаимоотношениях дрожжей и молочнокислых бактерий в комбинированной закваске проявляется и синергизм и антагонизм. Молочнокислые бактерии, продуцируя молочную кислоту, создают благоприятные значения рН 5 – 5,5 для дрожжей, а продукты жизнедеятельности дрожжей (витамины) стимулируют развитие молочнокислых бактерий. Однако впоследствии в процессе брожения квасного сусла молочнокислые бактерии вступают в антагонистические отношения с дрожжами. Дальнейшее развитие бактерий и повышение кислотности снижают бродительную активность дрожжей.

Для производства кваса разводят отдельно квасные дрожжи и молочнокислые бактерии до количества, требуемого для засева производственного чана.

Схема приготовления комбинированной закваски

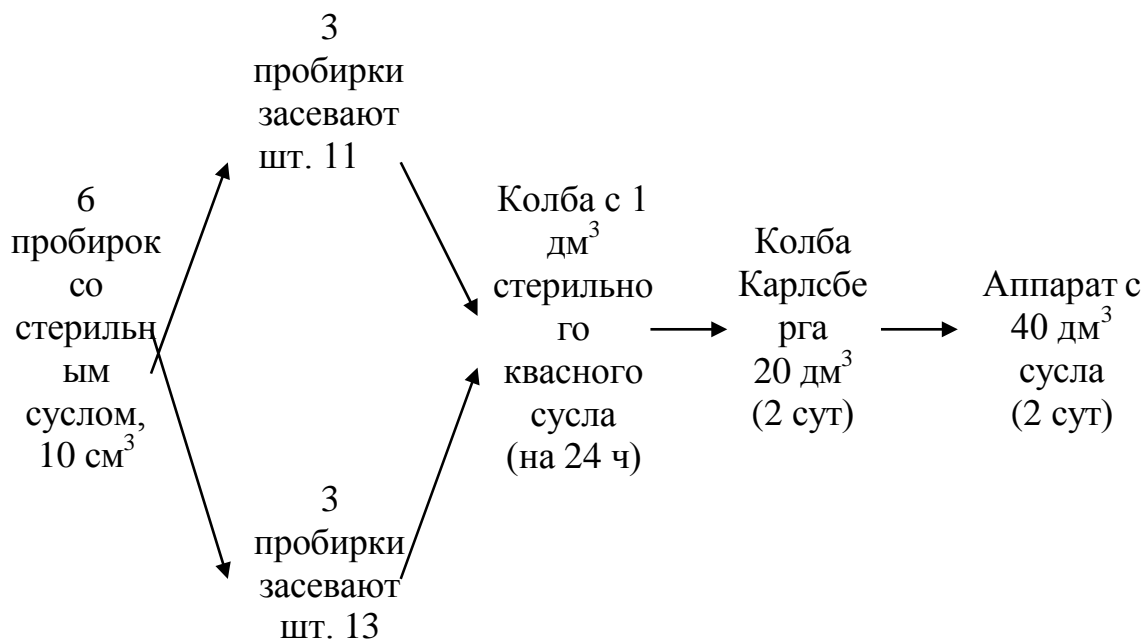
Дрожжи. Разводят на стерильном квасном сусле с добавлением сахарного сиропа до концентрации сухих веществ 84 %:



Дрожжевая разводка не должна содержать посторонних микроорганизмов, гнилостных бактерий, диких дрожжей, уксуснокислых бактерий.

Молочнокислые бактерии.

Используют сахарный сироп, содержащий 8 % СВ.

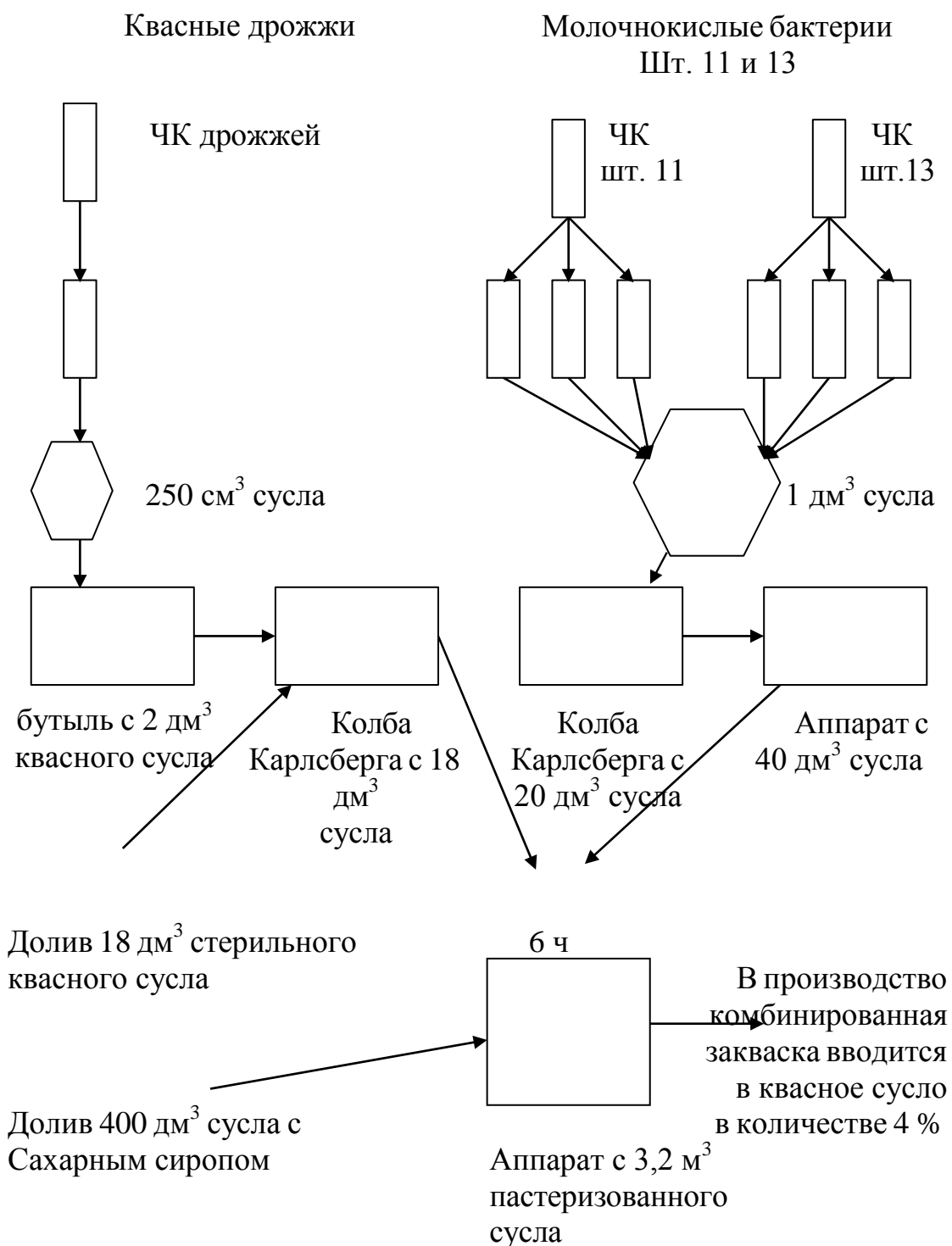


Комбинированные закваски. 3,2 м³ пастеризованного квасного суслика (8 % СВ) + 420 дм³ разводки молочнокислых бактерий + (17 – 18) дм³ другой разводки - 6 часов.

Комбинированные закваски вводятся в квасное суслико в количестве 4 %.

Приготовление комбинированной закваски

Посевы ведут через 24 ч, температура термостатирования 30° С.



Источники инфицирования в производстве кваса и безалкогольных продуктов.

Безалкогольные напитки и квас являются благоприятной средой для развития дрожжей, молочнокислых бактерий, уксуснокислых бактерий, грибов. Эти микроорганизмы встречаются в полуфабрикатах (сахарном сиропе, концентратах напитков и квасного сусла, купажных сиропах), в комбинированной закваске, в воздухе, на технологическом оборудовании, таре, упаковочных материалах. Развиваясь в готовых напитках, микроорганизмы снижают их биологическую стойкость, происходит обесцвечивание напитка или его ослизнение.

Источниками инфицирования в производстве безалкогольных напитков является сырье: вода, сахар – песок, соки, экстракты, красители и т.д.

Сахар – песок является источником слизиобразующих бактерий *Leuconostoc mesenteroides*, которые вызывают ослизнение напитков благодаря наличию у них слизистых капсул, образующихся на сахаросодержащих средах, особенно с сахарозой. Лейконосток очень термоустойчив и выдерживает нагревание до 90° С. Попадают эти микроорганизмы в напиток с сахарным сиропом. С инфицированным сахаром в производство попадают осмофильные дрожжи, кислотообразующие бактерии, споры грибов.

В натуральных плодово – ягодных соках (спиртовых соках и экстрактах), несмотря на высокую концентрацию спирта и сухого вещества, сохраняют жизнеспособность некоторые бактерии и дрожжи, которые после введения соков в напитки начинают интенсивно размножаться.

Красители – при длительном хранении могут содержать значительное количество микроорганизмов, понижающих стойкость напитков. Поэтому сильно обсемененные микробами красители перед употреблением необходимо прокипятить.

Вода – от ее чистоты в значительной степени зависит стойкость напитков и санитарное состояние производства. Качество поступающей на завод воды должно полностью соответствовать ГОСТ на питьевую воду. Загрязнение воды может происходить в коммуникациях завода, поэтому важно поддерживать и контролировать чистоту шлангов, аппаратуры и качество воды в купажном, красном и других цехах.

Оборудование – источником инфекции при плохой мойке может быть вся аппаратура, чаны, трубопроводы, шланги, а также фильтрующая масса.

Наиболее опасными являются розливные машины. Существенное значение имеет реконструкция наливателей, в которых могут оставаться фруктовые соки, способствующие росту микроорганизмов. При этом дезинфицирующие вещества не всегда эффективны. Если розливные агрегаты моют нерегулярно, то после розлива в напитках обнаруживаются грамотрицательные бактерии, грибы, дрожжи.

Из аппаратуры контролю подлежат сиропные и купажные баки – сиропницы, дозировальные машины, купажные линии, заторные, настойные

и бродильные чаны, сусло-, сиропо- и квасопроводы, шланги и т.д. Имеет большое значение также чистота тары.

Микроорганизмы – вредители производства кваса и безалкогольных продуктов.

Микроорганизмами – вредителями производства кваса являются:

1. Слизеобразующие микроорганизмы

К ним относятся лейконостоки (*Leuconostoc mesenteroides*), сенная палочка (*Bacillus subtilis*) и другие микроорганизмы, которые при росте на сахаросодержащих средах образуют капсулы. При развитии этих микроорганизмов квас приобретает плотную консистенцию и тягучесть. В нем резко снижается вкусовое ощущение сладости. Источником лейконостока является сахарный сироп, а сенная палочка и другие слизеобразующие бактерии хорошо развиваются на зерне злаков, откуда попадают на солод.

Для предупреждения заражения кваса слизеобразующими микроорганизмами необходимо прокипятить сироп в течение 30 мин. И строго соблюдать режим производства.

Кроме того, нужно знать, что слизеобразующие бактерии погибают в кислой среде. Поэтому в случае обнаружения первых признаков ослизнения можно повысить кислотность кваса до предела, предусмотренного стандартом.

2. Уксуснокислые бактерии

Развиваясь в квасе, они окисляют этиловый спирт до уксусной кислоты, в результате чего резко повышается его кислотность, ухудшается вкус, снижается содержание сухих веществ при брожении и хранении, подавляется жизнедеятельность полезной микрофлоры. На поверхности кваса появляется тонкая пленка. Характерным признаком развития уксуснокислых бактерий в производстве кваса является появление плодовой мушки дрозофилы, которая является переносчиком бактерий в открытые емкости с суслом и квасом.

Очагами развития уксуснокислых бактерий могут быть плохо вымытые аппараты и шланги.

3. Грибы

Мицелиальные грибы (пеницилловые, аспергилловые, ризопусы, мукоровые и др.) придают пораженному квасу характерный плесневелый запах и неприятный привкус. Для предупреждения развития грибов необходимо поддерживать чистоту и регулярно обрабатывать оборудование и помещения дезинфицирующими растворами.

4. Дикие дрожжи

Основным возбудителем порчи кваса является *Candida mycoderma*. При развитии этих дрожжей в сусле и квасе образуется белая складчатая пленка, спирт и органические кислоты разлагаются до CO_2 и H_2O , угнетаются культурные дрожжи и ухудшается вкус кваса. Для предотвращения развития

диких дрожжей сусло и квас должны находиться в закрытых резервуарах, производственные дрожжи не должны содержать более 0,5 % диких дрожжей.

5. БГКП

Попадают в квас через заградительное оборудование с водой при нарушениях санитарного режима производства работниками. Если в квасе титруемая кислотность палочки меньше 100, то это свидетельствует о плохом санитарном состоянии производства.

Микроорганизмы – вредители производства безалкогольных напитков:

1. Дрожжи – вызывают биологическую порчу безалкогольных напитков. Осмофильные дрожжи вызывают брожение фруктово-ягодных соков, морсов, купажных сиропов и других полуфабрикатов, ухудшая органолептические свойства напитков (запах, вкуса, цвета), происходит вспенивание напитков. Основными видами дрожжей, развивающихся в безалкогольных напитках, являются дрожжи рода *Candida mycoderma*, *Hanseniaspora apiculatus*, *Schizosaccharomyces*.

2. Уксуснокислые бактерии

Ацетобактерии образуют на поверхности напитков пленку беловатого или серого цвета, вызывают прокисание. Размножению этих бактерий в безалкогольных напитках способствуют плохая мойка оборудования, неполный налив, плохая укупорка.

3. Молочнокислые бактерии (*Lactobacillus*)

Вызывают скисание соков, образуют устойчивую муть и вызывают порчу сырья. Могут накапливать в соках ацетон и диацетил, в результате чего возникает специальный привкус (масляно-молочный). Также могут вызывать ослизнение напитков.

4. Слизеобразующие бактерии – описание тоже, что и в производстве кваса.

5. Мицелиальные грибы – развиваются на поверхности фруктовых соков при их длительном хранении. Кусочки мицелия могут появиться и в жидкости. Являясь аэробными микроорганизмами, грибы в безалкогольных напитках размножаются редко. Их появление в напитке можно определить по окрашенной пленке на поверхности или хлопьям. Это *Aspigillus*, *Penicillium*, *Fusarium* и другие грибы.

Факторы, влияющие на биологическую стойкость напитков:

1. Начальная численность и виды микроорганизмов в напитках после укупорки бутылок. Для получения стойкой продукции, общая бактериальная обсемененность в напитках не должна превышать 100 КОЕ/см³, т.е. норму, установленную для питьевой воды.

2. Значение pH – низкое pH препятствует развитию многих бактерий.

3. Значение γH_2 – низкое значение γH_2 тормозит развитие микроорганизмов, а высокое – ускоряет.

Комбинированное воздействие активной кислотности и окислительного восстановительного потенциала в сочетании с малым содержанием азотистых веществ и присутствием CO_2 создает неблагоприятные условия для развития микроорганизмов.

4. Внесение консервантов - сорбиновой кислоты с добавлением или без добавления аскорбиновой кислоты, бензоната натрия и других. Применение консервантов обеспечивает стойкость напитков в течение не менее 30 суток.

Без консервантов стойкость напитков при 20°C должна быть не менее 7 суток.

Микробиологический контроль производства кваса и безалкогольных продуктов.

Микробиологическому контролю в производстве безалкогольных напитков подлежат вода, сахар – песок, натуральные плодово – ягодные соки, сахарный сироп, концентраты напитков и квасного сусла, купажные сиропы, красители, комбинированная закваска для кваса, готовая продукция.

Вода должна соответствовать ГОСТу на питьевую воду: кМАФАнМ не более 100 КОЕ/см^3 , коли – титр более 300 см^3 , коли – индекс не более 3 в 1 дм^3 .

Сахар – песок. В 1 г сахара должно содержаться не более 10^3 клеток микроорганизмов.

Натуральные плодово – ягодные соки (спиртованные, концентрированные) исследуются на содержание дрожжей. Качественным считается спиртованный сок, содержащий не более 200 клеток в 1 см^3 . Соки с повышенным содержанием дрожжей перед употреблением сепарируют или фильтруют через фильтр – картон.

В концентрированных соках допускается наличие в 1 см^3 единичных клеток микроорганизмов, причем дрожжи должны отсутствовать.

Сахарный сироп. Считается качественным, если в 1 см^3 его КМАФАнМ составляет не более 20, дрожжей – не более 5, а лейконосток отсутствует.

Концентраты напитков и квасного сусла – они считаются качественными, если в 1 см^3 содержатся единичные клетки микроорганизмов, а дрожжи должны отсутствовать.

В красителях допускается содержание в 1 см^3 единичных клеток микроорганизмов, а дрожжи должны отсутствовать.

Купажные сиропы – в них допускается содержание не более 400 – 500 клеток в 1 см^3 дрожжей.

Квасное сусло – показатель коли – титра не менее 100 см^3 .

Готовая продукция:

- газированные напитки: - кМАФАнМ – не более 100 в 1 см^3 , коли – титр более 300. Стойкость напитков без консервантов - 7 суток, с консервантами – 30 суток.

- хлебный квас (готовый) – БГКП не допускаются в 10 см^3

Вопросы для самопроверки

1. Какие микроорганизмы используются в производстве кваса?
2. Какова роль молочнокислых бактерий при производстве кваса?
3. Каковы источники инфицирования в производстве кваса и безалкогольных напитков?
4. Какие микроорганизмы являются вредителями при производстве кваса?
5. Какие микроорганизмы наиболее часто вызывают порчу безалкогольных напитков?
6. Какие факторы влияют на биологическую стойкость кваса и безалкогольных напитков?
7. Как готовят комбинированную закваску для производства кваса?
8. Каковы объекты микробиологического контроля в производстве кваса и безалкогольных напитков?

11. 4. МИКРОБИОЛОГИЯ ВИНОДЕЛИЯ

Дрожжи в виноделии

Главная роль при брожении виноградного и плодово – ягодного суслу принадлежит дрожжам. Под влиянием дрожжей всегда имеющихся на поверхности спелых ягод и плодов (эпифитная микрофлора) брожение сока может возникнуть спонтанно (самопроизвольно).

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

Для подавления нежелательной микрофлоры в промышленности в качестве основного возбудителя брожения используют *культурные дрожжи*, обладающие **ценными производственными свойствами**:

- для получения вина хорошего качества брожение следует вести при низких температурах. Поэтому винные дрожжи должны сбраживать суслу при 13° - 15°С;
- винные дрожжи должны быть устойчивы к высоким концентрациям спирта (до 18 %). Образование большого количества спирта препятствует развитию инфекции;
- способность сбраживать сахара при высоком давлении углекислого газа (давление к концу брожения достигает 500 – 600 МПА);
- дрожжи должны быть кислотоустойчивыми: наиболее успешно брожение протекает при титруемой кислотности 8 – 10 г/л в пересчете на винную кислоту;
- способность дрожжей давать зернистый и сухой осадок;

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

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

Дрожжи – образуют пленки на поверхности вина, больше эфиров, придающих вину посторонние запахи, фруктово – эфирный и лекарственный привкусы, вызывают помутнение вина, снижают бродительную активность культурных дрожжей. Это дрожжи родов *Zygosaccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Asatanomyces*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Torulopsis*, *Cluconibacter*.

Бактерии (Acetobacter)– уксуснокислые бактерии – образуют тонкую пленку на поверхности вина, придают ему резкий запах.

Lactobacillus – (молочнокислые палочки) - многие вызывают образование слизи в вине, появление вкуса и запаха квашеной капусты.

Micrococcus – вызывают кислотопонижение после бурного брожения, что способствует развитию в вине посторонней микрофлоры, вызывают также помутнение вина.

Болезни вин и их возбудители

Болезню называются нежелательные изменения состава вина, вызываемые микроорганизмами – вредителями.

Больные вина могут заражать здоровые через технологическое оборудование и коммуникации.

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

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

Б) уксуснокислое скисание – на поверхности вина образуется тонкая сероватая пленка. Вино приобретает вкус уксусной кислоты и ее эфиров. Возбудители – уксуснокислые бактерии. Особенно подвержены уксусному скисанию молодые вина с пониженным содержанием спирта и невысокой концентрацией сахара при хранении в неполно налитой таре и доступе воздуха.

В) молочнокислое скисание – этому заболеванию наиболее подвержены молочнокислые сладкие вина, десертные крепкие вина, реже херес. В вине появляются «шелковистые» волны, оно приобретает острый сладкокислый вкус и запах квашеной капусты, иногда с мышинным привкусом. Повышается титруемая кислотность за счет образования молочной, уксусной и летучих кислот.

Г) маннитное брожение – его вызывают некоторые молочнокислые бактерии, которые образуют маннит, уксусную и молочную кислоты. Наиболее часто этому заболеванию подвержены красные вина с низким содержанием спирта и сахара. Такое вино приобретает запах разлагающихся фруктов.

Д) турн – при заболевании турном изменяются вкус и цвет вина, оно мутнеет, приобретает неприятный запах уксусного эфира. Особенно часто поражаются вина, богатые азотистыми веществами и имеющие невысокую кислотность. Главным возбудителем турна являются бактерии рода *Bacterium tatarophorum*. Заболеванию вин турном способствует высокая температура при сбраживании сусла и выдержке.

Е) ожирение вина (ослизнение) – при этом заболевании как правило поражаются белые вина с невысоким содержанием сахара, спирта, кислот. Вино становится вязким, слизистым, тягучим с неприятным вкусом, аромат вина не изменяется.

Возбудителями этой болезни являются бактерии рода *Lactobasillus*, а также бактерии вида *Bactesilem viscosus*. Исправление (лечение) вина целесообразно, когда еще не началось сильное разрушение составных частей вина. Для уничтожения инфекции применяют пастеризацию и сульфитацию (50 – 100 мг сернистой кислоты на 1 л), после чего вино оклеивают и фильтруют. После лечения вина в него добавляют танин и подкисляют лимонной кислотой.

Предупреждение заболеваний вин и борьба с инфекцией

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

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

1. Тщательная сортировка винограда или плодово – ягодного сырья.
2. Использование чистой тары, очистка ее дезинфицированием и пропариванием.
3. Сусло перед брожением предварительно окуривают сернистым газом, сульфатируют сернистой кислотой.
4. Строгий контроль температуры брожения.

5. При хранении вин очень важное значение имеет доливка.

6. Для уничтожения плесени на винзаводе необходимо термически проветривать помещения, белить стены и потолки с добавлением 0,5 % медного купороса, облицовывать стены кафельной плиткой. Подвалы необходимо окуривать сернистым газом не реже одного раза в неделю.

7. Поддержание высокого санитарного состояния на производстве: тщательная мойка и дезинфекция оборудования и коммуникаций.

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

Пробы сусла и мезгу, чистую культуру, бродящее вино исследуют микроскопированием на наличие посторонней микрофлоры.

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

Исправление (лечение) вина целесообразно, когда еще не началось сильное разрушение составных частей вина. Для уничтожения инфекции применяют пастеризацию и сульфатизацию (50 – 100 мг сернистой кислоты на 1 л), после чего вино оклеивают и фильтруют. После лечения вина в него вводят танин и подкисляют лимонной кислотой.

Вопросы для самопроверки

1. Какие дрожжи используются в виноделии?
2. Какие требования предъявляются к дрожжам, используемым в виноделии?
3. Как готовят разводку дрожжей для производства вин?
4. Какие микроорганизмы являются вредителями вина?
5. По каким признакам можно определить заболевание вина?
6. Какие болезни вин Вам известны?
7. Какие существуют мероприятия по профилактике заболевания вин?
8. Каким образом предотвратить инфицирование вин?

Список рекомендуемой литературы:

1. Асонов, Николай Романович. Микробиология [Текст]: учебник / Н.Р.Асонов. - 4-е изд., испр. - М. : Колос, 2000. - 352 с. (100шт)
2. Безопасность продовольственного сырья и пищевых продуктов : учебное пособие / И. А. Рогов, Н. И. Дунченко, В. М. Позняковский [и др.]. - Саратов: Вузовское образование, 2014. - 226 с. - ISBN 2227-8397. - Текст : электронный // Электронно-библиотечная система IPR BOOKS : [сайт]. - URL: <http://lib.ugsha.ru:2055/4176.html>
3. Госманов, Р.Г. Санитарная микробиология пищевых продуктов [Текст] учебное пособие / Р.Г. Госманов, Н.М. Колычев, Г.Ф. Кабиров [и др.]. - Электрон, дан. - СПб.: Лань, 2015. -560 с. (10 шт)
4. Джей, Джеймс М. Современная пищевая микробиология / Дж. М. Джей, М. Дж. Лёсснер, Д. А. Гольден. - М. : Бином. Лабораторий знаний, 2012. - 886 с. (20 шт.)
5. Доценко, В.А. Практическое руководство по санитарному надзору за предприятиями пищевой и перерабатывающей промышленности, общественного питания и торговли : учебное пособие / В.А. Доценко. - 4-е изд., стер. . - Санкт-Петербург : ГИОРД, 2012. - 832 с. - ISBN 978-5-98879-153-9. - Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. - URL: <https://e.lanbook.com/book/4885>
6. Красникова, Людмила Васильевна. Микробиология [для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности "Технология хлеба, кондитерских и макаронных изделий", направлениям подготовки дипломного специального назначения и общественного питания" и 260600 "Пищевая инженерия" / Л. В. Красникова. - СПб. : Троицкий мост, 2012. - 296 с. (28 шт)
7. Петухова, Е. В. Микробиология пищевых производств : учебное пособие / Е. В. Петухова, А. Ю. Крыницкая, Л. Э. Ржечицкая. - Казань : Казанский национальный исследовательский технологический университет, 2008. - 150 с. - ISBN 978-5-7882-0634-9. - Текст : электронный // Электронно-библиотечная система IPR BOOKS : [сайт]. - URL: <http://lib.ugsha.ru:2055/62496.html>
8. Стрельчик, Н.В. Пищевая микробиология / Н.В. Стрельчик. - Омск : Омский ГАУ, 2014. - 128 с. - ISBN 978-5-89764-382-0. - Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. - URL: <https://lib.ugsha.ru:2053/book/60690>