

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ

ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ

ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

СМОЛЕНСКАЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ

Е.В. Иванова, Н.В. Романова

ТЕХНИЧЕСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Учебное пособие

Смоленск -2020

УДК 579.243

Рецензент: Лякина О.А. кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры агрономии, землеустройства и экологии

Иванова Е.В., Романова Н.В.

Техническая микробиология : методическое пособие / Е.В. Иванова, Н.В. Романова - Смоленск: ФГБОУ ВО Смоленская ГСХА, 2020- 90 с.

Учебное пособие предназначено для студентов инженерно-технологического факультета Смоленской ГСХА, обучающихся по направлению подготовки 35.03.07 Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции.

Печатается по решению методического совета ФГБОУ ВО Смоленская ГСХА (протокол № 8 от 26 мая 2020 г.)

УДК: 579.243

© Иванова Е.В., Романова Н.В.2020

© Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Смоленская государственная сельскохозяйственная академия, 2020

Введение

Учебное пособие составлено в соответствии с рабочей программой по курсу и освещает все основные разделы. В учебное пособие включены практические работы по темам: проведение микробиологического контроля молока и молочных продуктов; активизация применения бактериальных заквасок (традиционных и прямого внесения) и бактериальных концентратов; выделение и изучение свойств микроорганизмов. Практические работы включают разделы: содержание работы, приборы и материалы, методы исследования, порядок выполнения и оформления работы. Для закрепления усвоенного материала по изучаемой теме приводятся вопросы для самопроверки.

Введение

Лабораторные работы выполняются студентами индивидуально в соответствии с заданием преподавателя. При подготовке к выполнению лабораторной работы студент должен повторить теоретическую часть курса по изучаемой теме, используя лекционный материал и учебную литературу.

К работе в лаборатории допускаются студенты при наличии специальной одежды (белого халата) и после их ознакомления с правилами техники и пожарной безопасности, знание которых проверяет преподаватель.

Студенты под руководством преподавателя выполняют работу, результаты которой отражают в отдельной тетради. Оформленные работы учитываются при прохождении промежуточной аттестации по курсу.

Правила работы в микробиологической лаборатории

Работа в микробиологической лаборатории требует строгого соблюдения специальных правил, что определяется двумя основными положениями.

Первое – в микробиологической практике используют, главным образом, чистые культуры микроорганизмов, т.е. популяции микроорганизмов одного вида, часто являющихся потомством одной клетки.

Поскольку в воздухе, на поверхности окружающих нас предметов, на одежде, руках, волосах всегда имеется большое количество разнообразной микрофлоры, то для обеспечения стерильности исследований и избежания загрязнения культур работа должна проводиться с соблюдением правил асептики.

Второе – при исследованиях с неидентифицированными микроорганизмами, при их выделении из объектов окружающей среды и техногенных потоков могут быть выделены патогенные и условно патогенные микроорганизмы.

Кроме того, клетки как сапрофитных, так и патогенных микроорганизмов могут являться аллергенами для определенных индивидуумов. Таким образом, для получения достоверных результатов исследований, для обеспечения

личной и безопасности окружающих необходимо соблюдение определенных правил.

Подготовка помещения (бокса) для проведения микробиологических работ включает влажную уборку с последующим облучением ультрафиолетовыми лучами бактерицидных ламп. Поверхность стола, где непосредственно проводится работа с культурами микроорганизмов, следует дезинфицировать путем протирания 3%-м раствором хлорамина или 70%-м раствором этилового спирта.

Студенты, выполняя задания, должны соблюдать следующие правила:

1. Каждый студент в микробиологической лаборатории работает на постоянном месте, выполняя задание индивидуально.

2. На рабочем месте не должно быть посторонних предметов (в том числе портфелей и сумок).

3. Студент должен работать только в чистом халате, волосы должны быть подобраны, не падать на плечи.

4. При работе с культурами микроорганизмов необходимо соблюдать все правила микробиологической техники. На пробирках, колбах, чашках Петри, бутылочках должна быть сделана надпись, содержащая родовые и видовые названия культуры, дату засева, фамилию студента.

5. Все предметы, использованные при работе с живыми культурами, должны быть обеззаражены либо обжиганием в пламени горелки (петли, иглы), либо погружены в дезинфицирующий раствор (предметные и покровные стекла, пипетки, шпатели).

6. Все засеянные пробирки, чашки помещают в термостат или сдают лаборанту. Отработанный материал (пробирки, чашки Петри) также помещается в определенные емкости по указанию лаборанта для их дальнейшего обеззараживания.

7. В лаборатории запрещается курение, прием пищи, лишнее хождение по лаборатории.

8. Порядок работы со спиртовками.

8.1. Открыть крышку спиртовки и с помощью пинцета поправить фитиль так, чтобы он был вытянут в вертикальном положении.

8.2. Зажечь спиртовку и не приподнимать держатель фитиля в течение всего времени её использования.

8.3. Над горящей спиртовкой не наклоняться, не подносить к ней легковоспламеняющиеся предметы (бумагу, вату и т. п.), не оставлять без присмотра, не прекратив её горение.

9. Работа с бактериальными культурами.

9.1. Клетки микроорганизмов для приготовления препаратов-мазков берут бактериологической петлей, открывая пробирку или чашку Петри в зоне пламени (в диаметре 2–7 см).

9.2. Оставшиеся на петле после приготовления препарата клетки микроорганизмов тщательно сжигают в пламени спиртовки. Прокаливание петли в этом случае начинают с участка проволоки, примыкающего к кольцу для того, чтобы микробная масса, оставшаяся на петле, подсохла. Затем петлю переводят в вертикальное положение и прокаливают докрасна. Такой порядок стерилизации петли необходим потому, что при быстром нагревании влажной микробной массы происходит её разбрызгивание и образуется аэрозоль, загрязняющий воздух. Только после прокаливания петлю можно положить на место.

9.3. Если посуда с чистой культурой разобьётся, надо тщательно собрать разбитые части и поместить их в дезинфицирующий раствор (2–3 %-й раствор бикарбоната натрия, 3–5 %-й раствор фенола, 0,5–3 %-й раствор хлорамина и некоторые другие дезинфектанты), руки тщательно вымыть мылом, дезинфицирующим раствором. Тщательно протереть место попадания культуры дезраствором.

10. В конце занятия студент должен привести в порядок рабочее место, вымыть место. Необходимо иметь индивидуальные салфетки для вытирания рук.

Каждый студент ведет тетрадь для лабораторных работ, являющуюся документом, позволяющим контролировать правильность полученных данных.

Записи проводятся в определенной последовательности и должны содержать следующее:

1. Номер работы. Ее название. Дата постановки и окончания опыта.
2. Объект исследования.
3. Методы исследования и условия проведения опыта.
4. Полученные результаты и выводы из них.

При изучении морфологии культур делаются их зарисовки при определенных увеличениях микроскопа, что указывается в тетради; цифровые данные обобщают в таблицах, графиках, диаграммах.

МОРФОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ И ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

1. Предмет и объекты микробиологии. Роль микроорганизмов в природе, пищевой промышленности и сельском хозяйстве

Микробиология (в переводе с греческого *micros* – малый, *bios* – жизнь, *logos* – учение) – наука, изучающая строение, жизнедеятельность, закономерности и условия развития микроскопических организмов, видимых только с помощью увеличительных приборов – микроскопов – оптических или электронных. Максимальное увеличение оптического микроскопа достигает 3000, что дает возможность различать частицы размером не менее 0,1–0,2 мкм (микрометр = 10^{-3} мм). Электронные микроскопы дают увеличение 750000 раз, с разрешающей способностью до 0,15 нм (нанометр = 10^{-6} мм), что позволяет видеть не только мельчайшие существа, но и структуры их клетки. К числу микроорганизмов относятся бактерии, археи, актиномицеты, грибы, в том числе мицелиальные грибы, дрожжи, мельчайшие водоросли, простейшие (одноклеточные) животные организмы и неклеточные формы – вирусы, фаги.

Основными отличиями микроорганизмов от других живых существ, обитающих на Земле, являются:

- 1) микроскопические размеры;
- 2) одноклеточное строение – (большинство);
- 3) чрезвычайная распространенность в окружающей среде (в почве, воде, воздухе, на поверхности тела, в кишечнике человека и животных, на поверхности растений, во льдах Арктики и Антарктиды, в горячих источниках и т.д.);
- 4) высокая скорость размножения;
- 5) интенсивность обмена веществ;
- 6) многообразие форм метаболизма и его пластичность.

Микроорганизмы играют чрезвычайно важную роль в природе – осуществляют круговорот органических и неорганических (N, P, S и др.) веществ,

минерализуют растительные и животные остатки, участвуют в образовании угля, торфа, нефти, газа, серных, железных и марганцевых руд и других полезных ископаемых. По влиянием деятельности микроорганизмов возникла почва и её основное свойство – плодородие. Велика роль микроорганизмов в питании животных, особенно жвачных, в 1 мл рубцовой жидкости которых насчитывается от 10 до 46 млрд. бактерий. Микробные ферменты перерабатывают сухие вещества корма, а азотистые соединения превращаются в белок, доступный для питания животных.

Однако микроорганизмы могут приносить и большой вред, вызывая порчу сырья, пищевых продуктов, органических материалов, строений. Многие виды микроорганизмов являются возбудителями болезней человека, животных и растений.

Микроорганизмы в настоящее время широко используются в народном хозяйстве. Их жизнедеятельность лежит в основе микробиологической промышленности, которая с помощью разных видов бактерий и грибов занимается биосинтезом разнообразных веществ: органических кислот, спиртов, ферментов, антибиотиков, витаминов, кормовых дрожжей, аминокислот, ростовых веществ. На основе микробиологических процессов работают хлебопечение, виноделие, пивоварение, производство молочнокислых продуктов, квашение плодов и овощей, а также другие отрасли пищевой промышленности.

Задачи микробиологии в народном хозяйстве настолько разнообразны, что существует отраслевое разделение её на ряд специализированных научных дисциплин.

Медицинская микробиология – изучает патогенные микроорганизмы, вызывающие заболевания человека, и разрабатывает методы диагностики, профилактики и лечения этих болезней.

Ветеринарная микробиология – изучает патогенные микроорганизмы вызывающие заболевания животных и разрабатывает методы диагностики, профилактики и лечения этих болезней.

Техническая микробиология разрабатывает и совершенствует научные методы биосинтеза разнообразных веществ с помощью микроорганизмов. Перед технической микробиологией ставится задача разработки мер предохранения сырья, продуктов питания, органических материалов от порчи микроорганизмами, исследование процессов, протекающих при их хранении и переработке.

Почвенная микробиология изучает роль микроорганизмов в образовании и плодородии почвы, в питании растений.

Водная микробиология исследует микрофлору водоемов, её роль в пищевых цепях, в круговороте веществ, в загрязнении и очистке питьевой и сточных вод.

Космическая микробиология изучает влияние космических лучей на микрофлору человека, свойства земных микроорганизмов в космосе, а также разнообразные способы возможного заноса микробов из космоса на Землю и наоборот.

Генетика микроорганизмов рассматривает молекулярные основы наследственности и изменчивости микробов, закономерности процессов мутагенеза, разрабатывает методы и принципы управления жизнедеятельностью микроорганизмов и получения новых штаммов для использования их в промышленности и сельском хозяйстве.

2. Краткая история развития микробиологии

Микробиология является сравнительно молодой наукой. Начало её развития относится к концу XVII века. Первое обстоятельное наблюдение и описание микроорганизмов принадлежит голландскому натуралисту Антонию ван Левенгуку (1632–1723), который изготавливал линзы, дававшие увеличение в 200–300 раз. В 1695 г. Левенгук издал книгу «Тайны природы, открытые Антони-ем Левенгуком», где он не только описал, но и дал рисунки многих микроорганизмов, обнаруженных с помощью своего «микроскопа» в разных настоях, дождевой воде, на мясе и других объектах. Открытия Левенгука вызвали всеобщее внимание учёных к диковинному микроскопическому миру. Однако состояние

науки того времени позволяло только описывать новые виды (*морфологический период*). Этот период продолжался до середины XIX века.

Новый период в развитии микробиологии – *физиологический* – связан с деятельностью великого французского учёного Луи Пастера (1822–1895). С именем Пастера связаны наиболее крупные открытия в области микробиологии: он исследовал природу брожения, установил, что каждый вид брожения связан с жизнедеятельностью определенных микроорганизмов; доказал возможность жизни без кислорода (анаэробноз); отверг теорию самозарождения жизни; исследовал причины порчи вин, пива и предложил способ борьбы с возбудителями порчи продуктов (пастеризация). Пастер открыл природу заразных болезней человека и животных, установил, что эти болезни возникают из-за инфекции (заражения) особыми микробами и что каждое заболевание вызывается определенными микроорганизмами. Он разработал и научно обосновал метод предупреждения заразных болезней (предохранительные прививки), изготовил вакцины против сибирской язвы и бешенства.

Р. Кох (1843–1910) – современник Пастера, немецкий микробиолог, большое внимание уделял методам исследования в микробиологии. Он разработал методы посева на плотные питательные среды, подсчёта микроорганизмов, выделения чистых культур, стерилизации материалов, метод окрашивания микробов анилиновыми красителями. Впервые использовал для микроскопии иммерсионный объектив, а также микрофотографию. Р. Кох изучал возбудителей многих инфекционных заболеваний (сибирской язвы, холеры, туберкулеза). Возбудитель туберкулёза (*Mycobacterium tuberculosis*) в его честь, был назван «палочкой Коха». В 1905 г. за исследования туберкулёза Р. Коху присуждена Нобелевская премия.

Родоначальником русской микробиологии является Л.С. Ценковский (1822–1887). Объектами его исследований были простейшие, водоросли, грибы. Впервые в России приготовил вакцину против сибирской язвы.

И.И. Мечников (1845–1916) впервые разработал фагоцитарную теорию иммунитета, т.е. невосприимчивости организма к повторному заболеванию ин-

фекционными болезнями. За создание учения об иммунитете был удостоен первой Нобелевской премии. Он раскрыл антагонизм у микробов, что положено в основу применения антибиотиков и других биопрепаратов. Мечников И.И. организовал первую в России бактериологическую лабораторию.

Н.Ф. Гамалея (1859–1949) – основоположник иммунологии и вирусологии, открыл бактериофагию. Гамалея Н.Ф. организовал в Одессе первую станцию по прививкам против бешенства. Вся его деятельность была направлена на решение важнейших вопросов здравоохранения в нашей стране.

С.Н. Виноградский (1856–1953) внёс большой вклад в развитие общей микробиологии и микробиологии почвы, является основоположником экологии почвенных микроорганизмов. Изучая процессы нитрификации, превращения соединений серы и железа, установил способность бактерий ассимилировать углекислый газ, используя при этом энергию, выделяемую при окислении минеральных соединений (аммиака, сероводорода, закиси железа). Такой совершенно новый тип жизни получил название хемолитоавтотрофный. С.Н. Виноградский открыл явление фиксации атмосферного азота анаэробными бактериями. Им предложен и широко использовался метод выращивания микроорганизмов при помощи элективных (избирательных) питательных сред.

В.Л. Омелянский (1867–1928) был учеником и сотрудником С.Н. Виноградского, изучал роль микроорганизмов в круговороте веществ в природе – углерода, азота, серы, железа, открыл целлюлозоразрушающие бактерии, создал первый русский учебник по микробиологии «Основы микробиологии» и первое русское «Практическое руководство по микробиологии».

Д.Н. Ивановский (1864–1922) открыл фильтрующиеся фитопатогенные вирусы и стал основоположником вирусологии. Также изучал вопросы фиксации атмосферного азота, распада белков, клетчатки.

Б.Л. Исаченко (1871–1948) – автор работ в области водной микробиологии, азотфиксации в почве.

А.И. Лебедев, С.П. Костычев, В.И. Палландин, В.С. Будкевич выполняли классические биохимические исследования. Изучая процессы дыхания и брожения,

раскрыли химизм процесса спиртового брожения, доказали, что некоторые органические кислоты образуются в результате жизнедеятельности грибов, что позволило начать промышленное производство лимонной кислоты.

В.Н. Шапошников усовершенствовал бродильные производства, что дало возможность организовать производство молочной кислоты, ацетона и бутилового спирта с помощью бактерий.

Большим вкладом в развитие общей микробиологии явились труды А.А. Имшенецкого, Е.Н. Мишустина, С.И. Кузнецова, Н.Д. Иерусалимского, Е.Н. Кондратьевой и других учёных.

3. Особенности строения и химического состава прокариотной клетки

Универсальной биологической единицей всего живого является клетка. Клетки разных организмов построены однотипно, биосинтез органических веществ осуществляется сходным образом, что объединяет разные организмы в единый мир живых существ.

Однако, наряду с чертами сходства, при изучении строения клетки с применением электронной микроскопии выявлены существенные различия в структуре клеток различных организмов.

Существует два типа клеточной организации у микроорганизмов:

- *эукариотное* – клетки имеют истинное ядро (высшие протисты),
- *прокариотное* – с примитивным ядерным аппаратом (низшие протисты).

К прокариотам отнесены бактерии, цианобактерии (сине-зеленые водоросли), археи, а к эукариотам – грибы, в т.ч. дрожжи, одноклеточные водоросли, простейшие, по строению они сходны с растительными и животными клетками.

В клетках прокариот отсутствует истинное ядро и ядерная мембрана, нет ядрышка. Ядерный аппарат (нуклеоид) представлен одной хромосомой, расположенной непосредственно в цитоплазме. Прокариоты не имеют митохондрий, хло-

ропластов, лизосом, аппарата Гольджи. Они содержат функциональные аналоги этих органоидов, которые не четко дифференцированы. Не развита сеть внутриклеточных мембран, фотосинтетический аппарат у цианобактерий и фотосинтезирующих бактерий представлен в виде простых пластинчатых образований (тилакоиды). Рибосомы мелкие и рассеяны в цитоплазме. В составе клеточной стенки преобладает специфический гетерополимер – муреин (пептидогликан), характерный только для прокариот. Не происходят процессы митоза и мейоза.

Клетка эукариот характеризуется более сложным строением, она имеет настоящее (истинное) ядро с ядрышком, отделенное от цитоплазмы ядерной мембраной. В ядре содержится набор хромосом, постоянный для каждого вида организмов. В цитоплазме клетки расположены вакуоли, пластиды, митохондрии, комплекс Гольджи, лизосомы. Рибосомы крупные, расположены на поверхности мембран эндоплазматической сети. Все органеллы четко ограничены от цитоплазмы собственными мембранами. Основными веществами в составе клеточных стенок у эукариот (грибов, растений) являются хитин, целлюлоза.

4. Морфология бактериальной клетки

Морфология микроорганизмов изучает их внешний вид, форму, размер, способность к движению. Морфологические признаки играют большую роль в распознавании микроорганизмов и их классификации. Клетки бактерий имеют довольно простую форму: сферы, цилиндры или спирали. Они бывают одиночными, в иных случаях образуют нити или колонии.

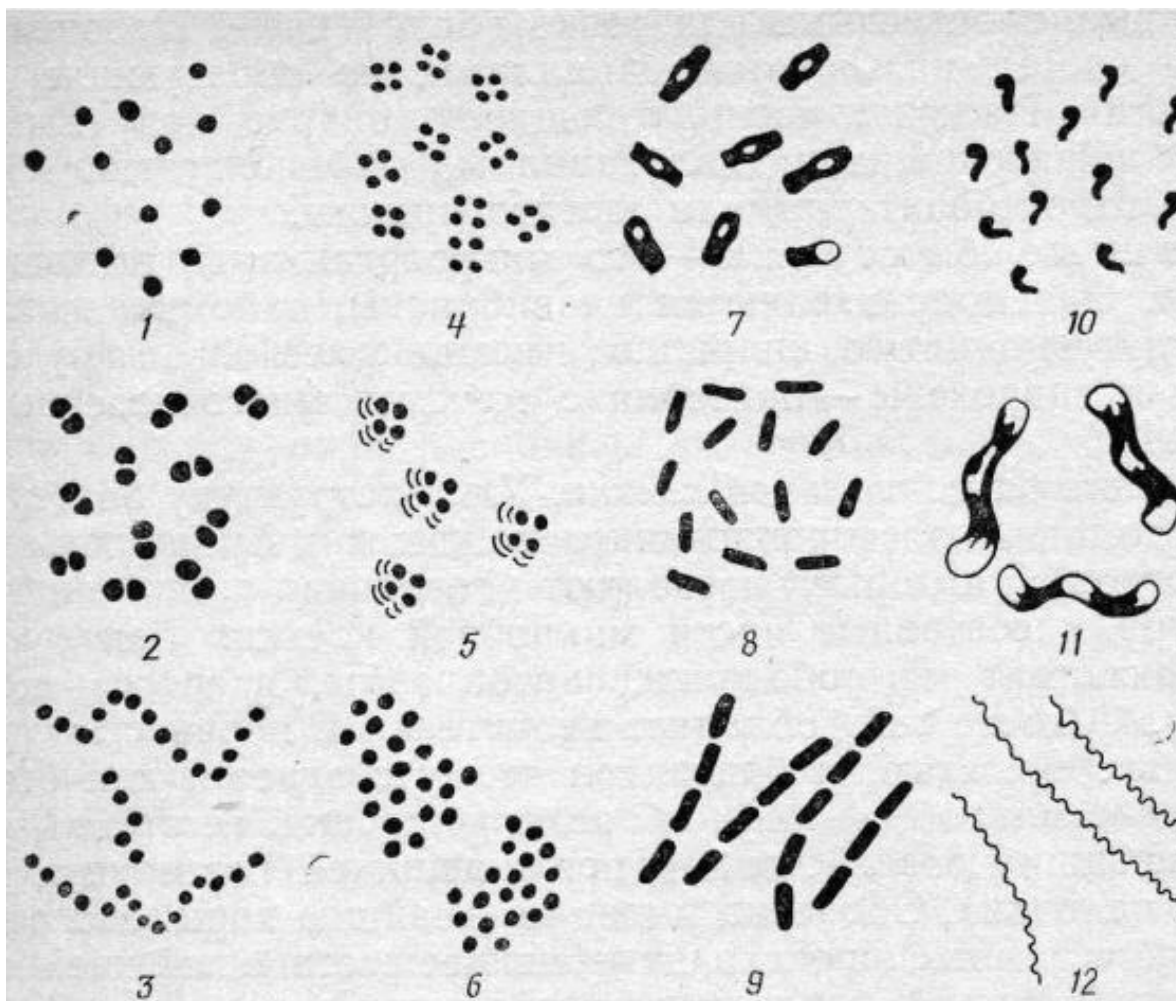
Микроорганизмы сферической формы называют кокками. В зависимости от расположения клеток после деления различают их несколько форм (рисунок 1):

- *микрোকки* – клетки располагаются поодиночке;
- *диплококки* – образуют пары клеток;
- *стрептококки* – клетки образуют цепочки разной длины;

- *тетракокки* – располагаются по четыре при делении в двух взаимно перпендикулярных плоскостях;

- *сарцины* – скопления кубической формы из восьми клеток, образующиеся при делении в трёх плоскостях;

- *стафилококки* – скопления клеток неправильной формы при делении в нескольких плоскостях.



Шаровидные: 1)микрококки, 2) диплококки, 3)стрептококки, 4), тетракокки, 5) сарцины, 6) стафилококки, 7) бациллы, 8) бактерии, 9) стрептобактерии, 10) вибрионы, 11) спирали, 12) спирохеты

Рисунок 1 – основные формы микроорганизмов (схема)

Кокки обычно имеют диаметр от 0,5 до 1,5 мкм.

Микроорганизмы, имеющие форму цилиндра (палочковидные), сильно различаются по форме, размеру в длину и в поперечнике, форме концов клетки, по взаимному расположению. Палочковидные бактерии, не образующие спор,

называют бактериями, а образующие споры – бациллами. В зависимости от расположения после деления, различают *собственно палочки* – одиночное расположение, *диплобактерии* или *диплобациллы* – парные соединения палочек, *стрептобактерии* или *стрептобациллы* – цепочки палочек.

Ширина палочек чаще всего составляет 0,5–1,5 мкм, длина – 2–10 мкм. Встречаются и палочки-гиганты длиной в десятки и сотни микрометров.

К группе извитых или спиралевидных бактерий относятся *вибрионы*, изогнутые в виде полумесяца или запятой, *спириллы*, имеющие от одного до нескольких витков, и *спирохеты* – тонкие длинные палочки с многочисленными витками.

Известны нитевидные формы бактерий, встречающиеся в водоемах.

Использование электронного микроскопа позволило открыть много новых бактерий, имеющих особую форму клеток: в виде замкнутого или разомкнутого кольца (тороиды), червеобразной, звездообразной, треугольной формы, клетки с выростами (простеки), стебельковые и почкующиеся бактерии.

Форма и размеры клеток бактерий значительно изменяются под влиянием условий внешней среды, возраста культуры. Из основных форм наиболее стабильными являются кокки, более изменчивы – палочковидные бактерии. Масса бактериальной клетки очень мала и составляет около $4 \cdot 10^{-13}$ г.

5. Ультраструктура бактериальной клетки

Использование электронного микроскопа позволило определить различные поверхностные и внутренние структуры у бактерий. К *поверхностным* относятся структуры, расположенные снаружи от цитоплазматической мембраны: клеточная стенка, капсула, жгутики, фимбрии и пили; к *внутренним* – цитоплазма, в которой находятся нуклеоид, рибосомы, мезосомы и разнообразные включения.

Капсула – слизистое образование поверх клеточной стенки. В зависимости от толщины и консистенции выделяют *макрокапсулы* (толщина слоя $> 0,2$

мкм), *микрокапсулы* (менее 0,2 мкм) и *слизистый чехол* – слизистое вещество, имеющее аморфный, бесструктурный вид, легко отделяется от поверхности клетки. Не все клетки образуют капсулу.

Химический состав капсул неоднороден, в основном они состоят из полисахаридов и липидов, но встречаются липидные, гетерополисахаридные и другого состава. Содержат до 98% воды, поэтому предохраняют клетки от высыхания, служат дополнительным осмотическим барьером, а также предохраняют от механических повреждений и от других неблагоприятных воздействий окружающей среды.

Активное развитие бактерий, образующих капсульное вещество, может приводить к порче продуктов (ослизнение мяса, колбас, творога, капусты). С другой стороны, капсульное вещество используют для получения синтетических плёнок, сефодексов, заменителей плазмы крови.

Жгутики – нитевидные образования белковой природы, прикрепляются к особой структуре – базальному тельцу, находящемуся под цитоплазматической мембраной. Жгутики обеспечивают *свободноплавающий* тип движения бактерий.

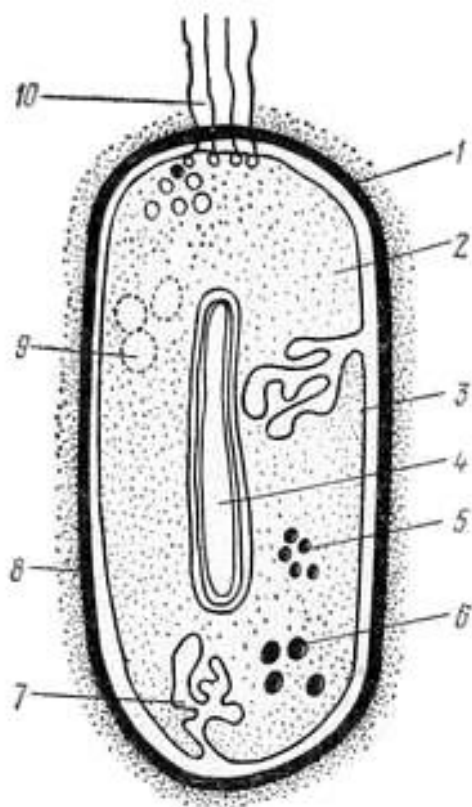
Бактерию с одним жгутиком называют *монотрихом*, с пучком жгутиков на одном конце – *лофотрихом*, на обоих концах – *амфитрихом*, по всей поверхности клетки – *перитрихом*.

Количество жгутиков колеблется от 1 до 100, толщина – от 10 до 20 нм, длина – от 3 до 15 мкм.

У других групп микроорганизмов известен *скользящий* тип движения. Он происходит за счёт сокращения осевой нити, состоящей из белковых микрофибрилл и расположенной внутри клеточной стенки. Скольжение наблюдается у миксобактерий и серных бактерий.

Скорость передвижения зависит от особенностей аппарата движения, условий среды. В среднем за секунду бактерии проходят расстояние, равное размеру клетки. Бактерии передвигаются беспорядочно, но известно и направленное движение, называемое *таксисом*. Различают *хемотаксис*, *аэротаксис*,

фототаксис, магнетотаксис. Некоторые бактерии не имеют специальных приспособлений для передвижения, поэтому перемещаются со средой (водой, воздухом).



1 – клеточная оболочка; 2 – цитоплазма; 3 – цитоплазматическая мембрана; 4 – ядерное вещество; 5 – рибосомы; 6 – жировые капельки; 7 – мезосома; 8 – капсула; 9 – гранулы полисахарида; 10 – жгутики.

Рисунок 2 - Схема строения бактериальной клетки

Фимбрии и пили. *Фимбрии* – тонкие, многочисленные нити, покрывающие всю поверхность клетки. Состоят из белка пилина. Толщина 5–10 нм, длина – 0,3–4,0 мкм, количество – 100–200 и до нескольких тысяч на одну клетку. Служат для прилипания к субстрату или к другим клеткам. *Пили*, или *половые ворсинки*, представляют собой полые трубочки, через которые происходит передача генетического материала от одной клетки к другой при конъюгации.

Клеточная стенка (оболочка) бактериальной клетки служит механическим барьером для предохранения содержимого клетки от вредного действия окружающей среды. Придаёт клетке определенную форму и сохраняет её, играет важную роль в регуляции роста и деления клетки, в распределении генетического материала.

Толщина клеточной стенки составляет $1/10$ – $1/20$ часть толщины клетки, а масса – около 20 % сухого вещества клетки. В составе клеточной стенки прокариот преобладает специфическое полимерное соединение – пептидогликан (муреин), отсутствующий в клеточных стенках эукариотных организмов. Известно, что одним из важнейших показателей при определении рода и вида бактерий служит окраска по Граму. Все бактерии делятся на Грам+ (положительные) и Грам- (отрицательные). Такое разделение основано на способности клеток окрашиваться фиолетовым красителем (генцианвиолетом) и не обесцвечиваться (или наоборот) спиртом, ацетоном. Этот метод окраски введен впервые в 1884 году датским физиком Христианом Грамом и используется как важнейший таксономический признак. Установлено, что свойство бактерий окрашиваться или не окрашиваться по Граму, обусловлено различиями в химическом составе и ультраструктуре их клеточных стенок. У Грам+ клеточная стенка состоит из многослойного пептидогликана, в который вплетены белки, полисахариды, тейховые кислоты. У грамотрицательных бактерий пептидогликан однослойный. Сверху располагается наружная мембрана, имеющая мозаичное строение и состоящая из фосфолипидов, липопротеидов, белков и липополисахаридов.

Содержание муреина в клеточной стенке грамположительных бактерий составляет 50–90 %, а у грамотрицательных – от 1 до 10 %.

Синтез веществ клеточной стенки происходит на наружной стороне цитоплазматической мембраны.

Цитоплазматическая мембрана (ЦПМ) – обязательный структурный элемент прокариотной клетки, отделяет от клеточной стенки содержимое клетки. Нарушение целостности ЦПМ приводит к гибели клетки. На долю мембраны приходится 8–15 % сухого вещества клетки, её толщина 7–10 нм. По химическому составу это белково-липидный комплекс. Белки составляют 50–70 %, липиды – 15–30 %. Кроме того, присутствует небольшое количество углеводов и РНК.

Под электронным микроскопом мембрана видна в виде трехслойной структуры, состоящей из двух мономолекулярных слоёв белка, между которыми расположен двойной слой липидов.

Основная функция цитоплазматической мембраны – транспорт веществ в клетку и из неё. Мембрана образует внутрицитоплазматические впячивания, называемые мезосомами. ЦПМ и мезосомы осуществляют энергетические и синтетические процессы, поэтому на них локализованы разнообразные ферменты. Хорошо развиты мезосомы у грамположительных бактерий, у грамотрицательных они развиты слабо и имеют более простое строение.

Цитоплазма находится под цитоплазматической мембраной. Представляет собой полужидкую, вязкую коллоидную систему, состоящую из воды, белков, жиров, углеводов и других веществ, соотношение которых колеблется в зависимости от вида бактерий и их возраста. В цитоплазме содержатся рибосомы, генетический аппарат, мезосомы и включения.

Рибосомы рассеяны в цитоплазме в виде мелких гранул размером 20–30 нм, состоят из РНК и белка и участвуют в синтезе белка.

Ядерный аппарат у прокариотов (**нуклеоид**) представлен свернутой в кольцо молекулой ДНК с молекулярной массой $2 \cdot 10^9$, называемой бактериальной хромосомой. Нуклеоид не имеет ядерной мембраны. Основная его функция – сохранение и передача наследственных признаков потомству. В покоящейся клетке обычно содержится один нуклеоид. Перед делением, в фазе роста–размножения и в неблагоприятных условиях для жизнедеятельности клетки может быть два и более нуклеоидов.

Кроме нуклеоида у некоторых бактерий могут быть короткие цепочки ДНК, называемые *плазмидами*, которые придают организму дополнительные полезные свойства.

В цитоплазме фотосинтезирующих бактерий имеются **тилакоиды** – мембранные структуры, содержащие хлорофилл и каротиноиды, при помощи которых осуществляется фотосинтез.

Включения в цитоплазме клетки разнообразны и не постоянны. Представлены в виде гранул различной величины и формы. Являются запасными питательными веществами или продуктами обмена микроорганизмов. К ним относятся гликоген, гранулёза, жиры, липиды, волютин, полифосфаты, капельки серы, кар-

бонат кальция, а также растворимые белки, углеводы, аминокислоты, пигменты, различные ферменты и др.

6. Спорообразование у бактерий

Многие микроорганизмы способны образовывать структуры, помогающие им переносить неблагоприятные условия среды в течение длительного времени. Это цисты и споры (эндоспоры).

Цисты встречаются у азотобактера, спирохет, миксобактерий, риккетсий. У миксобактерий цисты – необходимый этап в цикле их жизнедеятельности. После активного деления образуются плодовые тела (скопление клеток). Клетки укорачиваются, происходит утолщение клеточной стенки, образуются слизистые оболочки. Такие морфологические изменения покоящейся клетки миксобактерий называются микроцистами, в виде которых клетки лучше переносят неблагоприятные условия среды.

Споры образуются преимущественно у палочковидных родов *Bacillus*, *Clostridium*, а также у некоторых кокков и спирилл. В каждой клетке обычно образуется только одна эндоспора. Спорообразование начинается при недостатке питательных веществ, неблагоприятной температуре и величине pH, накоплении продуктов обмена в больших количествах.

При образовании споры в клетке происходит сложный физиологический процесс. Клетка обезвоживается, идёт концентрирование цитоплазмы, образуется специфическое для споры вещество – дипиколиновая кислота. Дипиколонат кальция является основным веществом оболочек споры, с наличием которого, а также с высоким содержанием липидов и специальных белков, связывают высокую термоустойчивость спор по сравнению с вегетативными клетками. Так, вегетативные клетки *Bacillus subtilis* отмирают при нагревании до 75° в течение 1–2 мин, споры – при 120° в течение 30 мин.

Механизм спорообразования можно представить следующим образом: в результате неравномерного деления клетки, сопровождающегося впячивани-

ем цитоплазматической мембраны, происходит обособление части цитоплазмы с нуклеоидом. Обособленный участок цитоплазмы покрывается цитоплазматической мембраной клетки. Образуется *проспора*, окружённая двумя мембранами – наружной и внутренней. Между ними образуется *кортекс* (кора споры), состоящий из пептидогликана. Дальнейшее развитие споры заключается в образовании многослойных *оболочек* споры, состоящих из белков, липидов и гликолипидов.

После созревания споры клеточная стенка вегетативной клетки разрушается, а спора попадает в окружающую среду и может сохраняться в жизнеспособном состоянии сотни и тысячи лет.

Попадая в благоприятные условия среды, спора набухает, активизируются ферменты, усиливаются биохимические процессы, оболочка разрывается, и молодая вегетативная клетка выходит наружу.

Споры имеют округлую или овальную форму. Диаметр равен ширине клетки, у рода *Clostridium* диаметр споры превышает ширину клетки, клетка приобретает форму веретена или вид барабанной палочки.

Порчу пищевых продуктов и кормов вызывают лишь вегетативные клетки бактерий. Знание условий, способствующих образованию спор у бактерий, и условий, вызывающих их прорастание, имеет большое значение в выборе способов хранения кормов, сырья и продуктов питания для предотвращения их микробной порчи.

7. Размножение и рост бактерий

Размножение – это увеличение числа клеток микроорганизмов в популяции. Основным способом размножения бактерий является простое деление клетки пополам. Делению предшествует увеличение размера клетки и репликация ДНК, что приводит к образованию двух тождественных бактериальных хромосом. Затем идёт образование *перегородки*, состоящей из двух слоёв цитоплазматической мембраны и пептидогликана. Во время репликации и образования перегородки

клетка непрерывно растёт. Происходит синтез веществ и образование структур бактериальной клетки. В конце процесса деления дочерние клетки отделяются друг от друга. Обычно образуются две равные клетки (*изоморфное деление*), встречается и неравномерное (*гетероморфное*) деление, когда дочерние клетки больше материнских. Жгутики и фимбрии обычно остаются у одной – материнской – клетки. У дочерней они формируются позднее.

Спирохеты, риккетсии некоторые дрожжи и грибы размножаются *поперечным делением* клеток. Миксобактерии делятся *перетяжкой*. При этом клеточная стенка постепенно суживается в месте деления, а затем втягивается с обеих сторон внутрь клетки и делит её на две.

Известен способ размножения бактерий *почкованием* – у родов *Nurphomicrobium*, *Pedomicrobium*. При этом на материнской клетке образуется почка, которая растёт и отделяется от материнской клетки.

У некоторых бактерий (*Escherichia coli*) установлено примитивное половое размножение, называемое *конъюгацией*.

Независимо от способа деления клетки скорость размножения огромна. За 24 часа иногда сменяется столько поколений, сколько у человека за 5 тыс. лет. При наличии в среде оптимальных условий деление клетки происходит через каждые 20–30 минут. Высокая интенсивность размножения имеет для бактерий большое биологическое значение. Она обеспечивает сохранение микроорганизмов в окружающей среде.

При изучении роста бактерий необходимо разграничивать рост, или увеличение размеров клеток, от роста культуры, т.е. от увеличения числа особей в данной бактериальной популяции, которое происходит в результате процессов размножения.

Совокупность бактерий, развивающихся в ограниченном объёме среды, представляет собой бактериальную популяцию. Размножение популяции в замкнутой среде (*непроточная культура*) протекает в определённой закономерности. Можно выделить четыре основных фазы: (Рисунок 3)

I. *Начальная (лаг-фаза)* – фаза задержки размножения, когда клетки приспособляются к условиям питательной среды, интенсивно растут, но не делятся.

II. *Логарифмическая (экспоненциальная)* – фаза активного деления клеток, численность которых нарастает в геометрической прогрессии. В процессе роста культуры происходит изменение состава среды, накапливаются продукты распада, и рост культуры замедляется.

III. *Стационарная фаза* – число жизнеспособных клеток достигает максимума и перестаёт увеличиваться. Количество появляющихся клеток примерно равно количеству отмерших.

IV. *Фаза отмирания* – отмирание клеток превышает скорость их размножения. Отмирание происходит в результате истощения питательной среды, накопления продуктов распада, старения клеток, спонтанного автолиза, т.е. под действием собственных ферментов (главным образом, протеолитических).

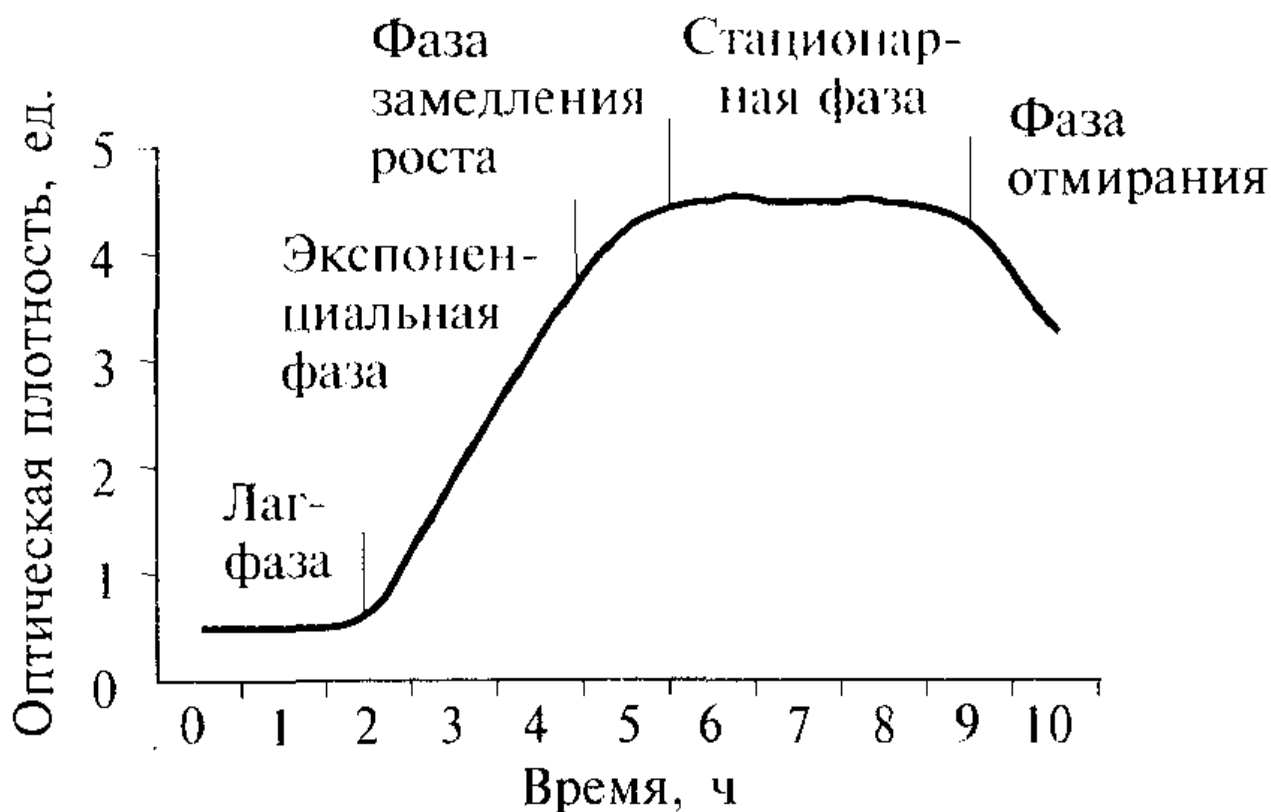


Рисунок 3 – Кривая роста бактериальной культуры

Знание особенностей роста и развития бактерий в замкнутых условиях необходимо для выбора метода культивирования микроорганизмов в микробиологическом производстве. При добавлении в среду питательных веществ и удалении продуктов обмена микроорганизмы могут развиваться неопределенное время в логарифмической или стационарной фазе. Такое культивирование микроорганизмов называется *проточным*. Оно широко внедряется в практику и обеспечивает непрерывность технологического процесса при микробиологическом производстве разнообразных продуктов.

8. Влияние факторов внешней среды на развитие микроорганизмов

Развитие и жизнедеятельность микроорганизмов зависит от условий окружающей среды. Их можно разделить на три группы:

- 1) физические (температура, влажность, концентрация веществ в среде, лучистая энергия);
- 2) химические (реакция среды (pH), действие некоторых веществ (антисептики);
- 3) биологические (взаимоотношения микроорганизмов с другими организмами в среде).

Физические факторы. Влажность. Для нормальной жизнедеятельности микроорганизмам необходима вода, так как питательные вещества поступают в клетку только в растворенном виде. Растворенные в воде вещества создают определенное тургорное давление в клетке, которое колеблется в широких пределах у разных групп микроорганизмов. Доступность содержащейся в субстрате воды выражают термином «водная активность» (a_w). Она показывает отношение давления паров раствора (субстрата) P и чистого растворителя (воды) – P_0 при одинаковой температуре. $a_w = P / P_0$ Водная активность изменяется от 0 до 1 и характеризует относительную влажность субстрата. Большая часть микроорганизмов не растут при активности воды ниже 0,95.

В зависимости от минимальной потребности во влаге микроорганизмы делятся на три группы: *гигрофилы* – с величиной $a_w = 0,92–0,99$; *мезофилы* – $0,9–0,95$; *ксерофилы* – $0,8$ и менее. Большинство бактерий являются гигрофилами. В числе ксерофилов преобладают мицелиальные грибы, дрожжи и некоторые актиномицеты. Грибы рода *Aspergillus* могут развиваться при $a_w 0,7–0,65$, практически на сухих продуктах, что нередко наблюдается при хранении зерна, комбикормов и т.д. Возможность развития микроорганизмов на субстрате можно учитывать по величине водной активности и по относительной влажности воздуха: $a_w \cdot 100$ равно относительной влажности воздуха, выраженной в %.

При высушивании развитие большинства микробов прекращается, хотя многие из них не погибают, а сохраняются в течение длительного времени. Сроки отмирания различных микробов широко варьируют: холерный вибрион выдерживает высушивание до 2 суток, возбудители дифтерии – 30 дней, стафилококки и микобактерии – 90 дней, молочнокислые бактерии – до 10 лет, некоторые патогенные стрептококки – более 25 лет.

Высушивание широко применяется при консервировании продуктов питания и кормов. Но, попав в условия высокой влажности, сухие продукты быстро портятся из-за восстановления активности сохранившихся микробов.

Осмотическое давление определяет деление микроорганизмов на группы в зависимости от концентрации растворенных веществ. При малом содержании веществ (с очень низким осмотическим давлением) раствор *гипотонический*, при большом – *гипертонический*. Оптимальная концентрация веществ создаёт условия для хорошего развития микроорганизмов. Если внутриклеточное давление ниже внешнего, вода уходит из клетки, ЦПМ отстаёт от стенки, клетка может погибнуть. Это явление называется *плазмолиз*, наблюдается в гипертонических растворах. При гипотоническом растворе вода поступает внутрь клетки, вызывая разрыв клеточной оболочки. Такое явление называется *плазмолитиз*.

Неблагоприятное действие концентрированных растворов соли и сахара на микроорганизмы широко используют для консервирования ряда продуктов (рыбы, мяса, овощей, фруктов).

Различные бактерии неодинаково чувствительны к наличию хлорида натрия в среде. При концентрации NaCl 3 % приостанавливается рост и развитие гнилостных бактерий, а при 7–10 % – прекращается. Большинство бактерий не переносят концентрации NaCl выше 5 %. Некоторые возбудители пищевых отравлений приостанавливают рост при 6–10% NaCl, но многие даже при 20% сохраняют жизнеспособность. Микроорганизмы, способные жить при очень высоких (20 % и выше) концентрациях NaCl, называются *галофильными*. Поэтому солёные продукты следует хранить при низкой температуре.

Температура является одним из основных факторов, определяющих возможность и активность развития микробов. Каждый микроорганизм развивается только в строго определённых температурных границах. Для одних они достаточно широкие, для других – более узкие. Для каждого организма выделяют: *минимум* – температура, ниже которой развития не происходит; *оптимум* – наилучшая температура для роста; *максимум* – температура, выше которой происходит гибель микроорганизмов.

По отношению к температуре микроорганизмы делятся на три группы: *психрофилы* (холодолюбивые) – хорошо растут при относительно низких температурах. Для них минимум составляет -10°C, оптимум – 10–15°C, максимум – около 30°C. К ним относятся организмы, обитающие в северных морях и почвах, на замороженных продуктах.

Термофилы (теплолюбивые) – лучше развиваются при относительно высоких температурах. Температурный минимум для них не ниже 30°C, оптимум – 55–65°C, максимум – 70–80°C. Встречаются в горячих водных источниках, в самонагревающихся материалах (сено, зерно, навоз).

Мезофилы – микроорганизмы, для которых температурный минимум 5–10°C, оптимум – 25–35°C, максимум – 45–50°C. Большинство бактерий, грибов, дрожжей относятся к мезофиллам.

Высокие температуры действуют на микробы губительно. Большинство непорообразующих бактерий в жидкой среде гибнут при температуре 70°C в течение 10–15 минут, при кипячении – почти мгновенно. Споры бацилл во

влажной среде гибнут при 120–130°C через 20–30 мин, в сухом состоянии – при 160–170°C через 1–2 часа. Термоустойчивость одних и тех же микроорганизмов может меняться в зависимости от условий среды (величины pH, концентрации веществ).

Низкие температуры переносятся микроорганизмами лучше – некоторые могут часами сохраняться при -190°C. Особенно устойчивы споры бактерий. Большинство микробов при отрицательной температуре не размножаются, их активность приостанавливается, но они остаются жизнеспособными, переходя в состояние анабиоза, и при повышении температуры возвращаются к активной жизни.

Низкие и высокие температуры лежат в основе распространенных способов хранения пищевых продуктов (охлаждение, замораживание, стерилизация, пастеризация).

Лучистая энергия. Солнечный свет нужен только для фототрофов, использующих его энергию для ассимиляции CO₂.

Прямые солнечные лучи губительны для микроорганизмов, менее устойчивы патогенные бактерии, по сравнению с сапрофитами. Гигиеническое значение света, как естественного обеззараживающего средства, очень велико. Он освобождает от болезнетворных бактерий воздух, внешнюю среду.

Наиболее сильное бактерицидное действие оказывают лучи с короткой длиной волны – ультрафиолетовые (УФ). Эффективность УФ-лучей зависит от дозы, характера облучаемого субстрата, его pH, температуры, степени обсемененности и видового состава микрофлоры. Их используют для обеззараживания питьевой воды, молока, воздуха лабораторий, лечебных и производственных помещений, холодильных камер и т.д. При применении УФ-лучей в течение 6 часов может быть уничтожено до 80% бактерий и плесеней, находящихся в воздухе.

ИК (инфракрасные) лучи оказывают только тепловое действие, используются для термической обработки продуктов.

Радиоактивное излучение (гамма-лучи) вызывают гибель микробов только в больших дозах. Чувствительны к облучению кишечная палочка, протей,

сальмонеллы, *Pseudomonas* (т.е. Грам- бактерии). Более устойчивы микрококки, споры бактерий, дрожжи. Гамма-лучи используют для обработки некоторых пищевых продуктов, способ называется *радуризацией* (частичное уничтожение микрофлоры на плодах, овощах, ягодах путём обработки гамма-лучами). При этом увеличиваются сроки хранения.

Химические факторы, к которым относятся химический состав, реакция среды и её окислительно-восстановительные свойства, оказывают большое влияние на жизнедеятельность микроорганизмов.

Реакция среды (pH). Под влиянием pH среды может изменяться активность ферментов и направленность осуществляемых ими биохимических превращений.

Жизнедеятельность микроорганизмов возможна лишь в определенных границах pH. Для грибов и дрожжей характерна слабокислая среда – pH 4,5–5,5. Большинство бактерий существуют в диапазоне pH 6,8–7,3, т.е. нейтральной или слабощелочной. Плесневые грибы могут развиваться в широком диапазоне pH (1,2–11,0). Кислая среда более губительна, чем щелочная. Особенно губительна кислая среда для гнилостных бактерий и вызывающих пищевые отравления. Более устойчивы бактерии, которые сами в процессе жизнедеятельности образуют кислоты (уксуснокислые, молочнокислые). Некоторые виды дрожжей, плесневых грибов регулируют реакцию среды (подкисляют или подщелачивают).

Губительное действие на микроорганизмы некоторых кислот (уксусной, бензойной) происходит не только за счёт низкого значения pH, но и за счёт токсичности недиссоциированных молекул кислот. Пропионовая, сорбиновая, уксусная кислоты применяются в практике пищевой промышленности как консерванты. Они используются в процессах квашения, маринования.

Химические вещества (антисептики). Ряд химических веществ замедляет или вызывает гибель микроорганизмов. В первом случае это *бактериостатическое* их действие, во втором – *бактерицидное*. Соли тяжёлых металлов (золото, серебро, ртуть, медь и др.) даже в ничтожно малых концентрациях оказывают губительное действие на микроорганизмы. Ограниченное приме-

нение на практике имеет серебро. Бактерицидное действие проявляют многие окислители (хлор, йод, перекись водорода, перманганат калия), неорганические кислоты (сернистая, борная и др.), газы (CO_2 , SO_2 , CO и др.), органические соединения (формалин, спирты, кислоты – салициловая, сорбиновая, бензойная и др.).

Механизм действия антисептиков различен: нарушение проницаемости ЦПМ, растворение липидов, разрушение ферментных систем, подавление синтеза белков и нуклеиновых кислот, что приводит к уничтожению микроорганизмов.

Антисептики широко применяются в народном хозяйстве для защиты от микроорганизмов древесины, бумаги, текстильных изделий.

Многие антисептики используют как дезинфицирующие средства в сельском хозяйстве, медицине, быту. Особенно широко используют хлор и его соединения.

Применение антисептиков для консервирования пищевых продуктов строго ограничено. Для обработки свежих плодов, ягод, овощей, плодово-ягодных полуфабрикатов используют сернистый ангидрид (SO_2), сернистую кислоту и её соли. В качестве консерванта пищевых продуктов широко применяют сорбиновую кислоту и её соли. Она менее токсична, чем бензойная и сернистая, но более активно действует на микроорганизмы. Пропионовая кислота эффективна для борьбы с картофельной болезнью хлеба и его плесневением, для обработки обёрточных материалов от плесеней.

Регулируемая газовая среда ($\text{N}_2 = 88\%$, $\text{CO}_2 = 11\%$, $\text{O}_2 = 1\%$) используется для сохранения зерна, кормов, плодов, овощей. Широкое распространение получило копчение, при котором бактерицидным и фунгицидным действием обладают компоненты дыма – формальдегид, фенолы и органические кислоты.

Биологические факторы. В естественных условиях обитания на сырье и пищевых продуктах совместно развиваются разнообразные виды микроорганизмов. Между ними устанавливаются многообразные взаимоотношения, которые могут как способствовать, так и подавлять развитие отдельных групп микробов.

9. Характер взаимоотношений микроорганизмов в среде

В природе всё взаимосвязано. Между микроорганизмами и другими живыми организмами существуют самые разнообразные взаимоотношения.

Нейтрализм – микроорганизмы не оказывают ни положительного, ни отрицательного влияния друг на друга, развиваясь в одном ценозе.

Конкуренция – взаимоотношения между видами, потребляющими одинаковые питательные вещества.

Симбиоз – совместная жизнь двух или нескольких видов, приводящая к взаимной пользе (кефирные "грибки", закваски типа жидких дрожжей) и др. В кефирных зёрнах развиваются дрожжи и молочнокислые бактерии, последние продуцируют молочную кислоту, которую используют дрожжи. При этом снижается кислотность, что создаёт благоприятные условия для развития молочнокислых бактерий.

Комменсализм – тип симбиоза, когда взаимная польза не выражена отчётливо, но сожительство не приносит вреда организмам. Комменсалы – это микробы, живущие на внешних покровах и во внутренних органах растений и животных.

Паразитизм – симбиоз приносит пользу только одному организму, второй не получает ничего, или ему наносится вред. Паразитами являются возбудители болезней человека, животных, растений.

Метабиоз – развитие одних видов способствует развитию других, или когда один вид живет за счёт продуктов жизнедеятельности другого, не причиняя ему вреда. Аэробы, потребляя кислород, создают условия для развития анаэробов. Аммонифицирующие бактерии накапливают аммиак, который используют нитрифицирующие, превращая его в нитраты, которые используют денитрифицирующие бактерии.

Антагонизм – взаимоотношения, когда один вид задерживает или подавляет развитие другого. Подавление может происходить за счёт выделения продуктов жизнедеятельности (кислот, щелочей, антибиотиков), что широко ис-

пользуется при силосовании, квашении, лежит в основе применения антибиотиков в лечебных целях.

10. Наследственность и изменчивость у микроорганизмов

Сохранение определенных специфических свойств организма на протяжении многих поколений называют **наследственностью**. У микроорганизмов, так же как и у других живых организмов, наблюдается наследование признаков, свойственных определенному виду, что позволяет идентифицировать любой вид микроорганизмов.

В то же время известно, что один и тот же вид бактерий может иметь отклонения морфологических и физиологических свойств под влиянием факторов внешней среды. Это явление называется **изменчивостью**. Наследственность и изменчивость – два неразрывно связанных процесса, являющихся основой эволюции всего живого.

Местом нахождения генетического материала у эукариотов является ядро, у прокариотов – нуклеоид, который представлен гигантской молекулой ДНК с молекулярной массой $2,9 \cdot 10^9$ а.е.м (атомная единица массы), длиной 1100–1400 мкм. Молекула ДНК представляет собой двойную *полинуклеотидную цепь*, состоящую из мономеров – *нуклеотидов*. Каждый нуклеотид включает одно из азотистых оснований (аденин, гуанин, цитозин, тимин), молекулу сахара (дезоксирибозу) и остаток фосфорной кислоты. Полинуклеотидные цепи соединены между собой по типу комплементарности (аденин – тимин, гуанин – цитозин) водородными связями. ДНК замкнута в виде кольца, называемого *бактериальной хромосомой*.

Отдельные участки ДНК – *гены* – контролируют наследование определенного признака. Совокупность всех генов организма называется *генотипом*, а совокупность присущих организму признаков – *фенотипом*. Генетический материал у бактерий в норме представлен одной бактериальной хромосомой.

У некоторых бактерий он может содержаться во внехромосомных структурах – *плазмидах*, которые представляют собой короткие цепочки ДНК. Они могут находиться автономно в цитоплазме, или быть интегрированы в хромосому. Плазмиды контролируют синтез антибиотиков, невосприимчивость к некоторым лекарственным препаратам, участвуют в конъюгации, обуславливают синтез токсинов и др.

Популяция бактерий одного вида при культивировании в течение длительного времени или в разных условиях подвержена изменениям. Эти изменения имеют приспособительный характер и наблюдаются, только пока действует фактор, вызвавший эти изменения. Такой тип изменчивости называется *модификацией*, или *адаптацией*. Адаптации не затрагивают генотип, поэтому не наследуются.

К наследственным изменениям относятся те, которые происходят в клеточном геноме. Их можно подразделить на *мутации* и *генетические рекомбинации*. *Мутации* – скачкообразные изменения генотипа, приводящие к появлению новых признаков, которые передаются по наследству и сохраняются даже тогда, когда вызвавший их фактор перестаёт действовать. Выделяют *генные* и *хромосомные мутации*. *Генные* – затрагивают один ген, *хромосомные* – несколько. Изменение одного нуклеотида полинуклеотидной цепи (замена, вставка, выпадение) называется точковой мутацией.

Хромосомные мутации связаны с перестройками фрагментов ДНК (выпадение нуклеотидов, поворот участка ДНК на 180°, или повторение), что ведёт к нарушениям последовательности и количества генов.

Мутации вызвать непросто, так как у бактерий существуют специальные гены, контролирующие восстановление (*репарацию*) поврежденной ДНК. Индуцировать мутации способны физические факторы (ультрафиолетовые, рентгеновские, γ -лучи) и химические (соединения мышьяка, хрома, органические перекиси, растительные ауксины и др.).

Рекомбинации генетического материала у прокариот происходят в результате частичного объединения геномов двух клеток. Известны три типа ге-

нетической рекомбинации: *конъюгация, трансформация и трансдукция*, которые различаются механизмом передачи генетического материала от клетки-донора в клетку-реципиент. *Конъюгация* – это примитивный половой процесс, который осуществляется у некоторых бактерий (*Escherichia coli*, *Shigella*) путём передачи генетического материала через половые ворсинки (пили) от клетки-донора в клетку-реципиент. Клетка-донор отличается наличием *половой плазмиды (F-фактора)*, ДНК которой отвечает за способность донорской клетки вступать в контакт с реципиентом, синтезировать пили и передавать генетический материал. Передаётся не вся хромосома, а только её часть. В клетке-реципиенте часть донорской ДНК обменивается на соответствующую часть ДНК реципиента. В результате образуется рекомбинантная бактериальная хромосома, содержащая генетический материал от двух клеток. В зависимости от того, какая часть донорской ДНК обменивается, могут возникнуть в потомстве рекомбинанты разного типа.

Трансформация – изменение свойств одних бактерий под влиянием экзогенной ДНК, выделенной из родственных бактерий в результате их лизиса. Процесс трансформации можно разделить на 3 этапа: 1) контакт ДНК с поверхностью клеток; 2) проникновение в клетку-реципиент ДНК-фрагмента; 3) Включение ДНК-фрагмента в геном реципиентной клетки. Последующая стадия – репликация включённой в хромосому новой информации. Трансформация обнаружена у многих бактерий, относящихся к родам *Bacillus*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Rhizobium* и др. С помощью трансформации передаются такие признаки как капсулообразование, ферментативная активность, устойчивость к ядам и др.

Трансдукция – процесс переноса генетического материала от одной клетки к другой посредством бактериофагов, которые случайно захватывают фрагмент бактериальной хромосомы в процессе формирования зрелых фаговых частиц. Биологическое значение фагов заключается в том, что они служат межклеточными переносчиками бактериальных генов. Существует три типа трансдукции: *специфическая* – характеризуется способностью фагов переносить

только определенные гены, расположенные на донорской хромосоме вблизи места прикрепления фага; *неспецифическая* – возможен перенос генов, расположенных в разных участках бактериальной хромосомы; *абортивная* – перенесенный фрагмент ДНК не включается в ДНК реципиента, а находится в цитоплазме автономно и при делении передаётся только одной дочерней клетке, поэтому постепенно утрачивается в потомстве.

Трансдукция обнаружена у бактерий родов *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Vibrio*. При трансдукции могут передаваться такие признаки как ферментативный аппарат, особенности питания, устойчивость к лекарственным средствам.

Знание генетики микроорганизмов широко применяется для получения высокоактивных штаммов, используемых в промышленном синтезе разнообразных веществ (ферментов, витаминов, антибиотиков, аминокислот и др.).

11. Систематика микроорганизмов

Систематика – это распределение (классификация) микроорганизмов по группам (таксонам) в соответствии с определенными признаками.

Таксон – группа организмов, обладающих заданной степенью однородности. Определяющей единицей в таксономии является вид, виды объединяются в роды, роды – в семейства, несколько семейств – в порядок, несколько порядков – в класс. Более высокие таксоны неодинаковы в разных классификациях. В последнем «Руководстве Берджи по систематике бактерий» более высоким таксоном является филум – домен. В других классификациях классы составляют отделы, отделы – царство. При классификации бактерий учитываются их основные морфологические, культуральные, физиолого-биохимические и генетические признаки.

Морфологические признаки: форма и тип соединения клеток, окраска по Граму, подвижность, спорообразование.

Культуральные признаки: характер роста на жидких и плотных питательных средах (осадок, плёнка, форма, размер, структура, цвет и др. признаки колоний).

Физиолого-биохимические признаки: особенности питания и энергетического обмена, отношение к температуре, pH, влажности, кислороду, и т.д.

Генетические признаки: анализ и расшифровка состава ДНК.

Так же, как для растений и животных, для бактерий принята бинарная номенклатура: родовое и видовое название, например, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*.

Выделяют две систематики живых организмов – естественную и искусственную. Все существующие в настоящее время классификации микроорганизмов являются искусственными, так как недостаточно данных об эволюции и генетике микроорганизмов. В настоящее время активно развивается *филогенетическая* система классификации микроорганизмов, которая будет учитывать родственные связи и пути эволюции микроорганизмов, а также станет удобнее для практического применения, позволяя быстро найти место конкретного микроорганизма в системе. Для практической идентификации микроорганизмов используют девятое издание определителя, выпущенное комитетом Берджи.

По современным представлениям в классификации Д. Берджи, всё живое разделено на три домена *Archaea*, *Bacteria* и *Eukarya*. Домены разделены на группы, называемые филумами. В первые два домена включены группы (филумы), относящиеся к прокариотным организмам. Общее количество групп в настоящее время достигает 56, включая некультивируемые формы.

12. Вирусы

Вирусология (англ. virology) изучает строение, функциональные свойства, экологию, филогению и систематику живых существ, называемых вирусами. Исходно вирусологию рассматривали как составную часть молекулярной биологии, т. к. объектом её исследования являются субклеточные структуры — вирусы, которые по существу (строению и организации) являются макромоле-

кулами. Однако в настоящее время вирусология складывается из комплекса дисциплин (цитологии, биохимии, молекулярной биологии и т. п.), которые изучают полифилетичных живых существ — внутриклеточных молекулярных паразитов, специфическими хозяевами которых являются клеточные организмы разного эволюционного происхождения (*Bacteria*, *Archaea*, *Eucarya*) и различного цитологического строения.

Как известно, клетки способны копировать не только эндогенную матрицу (собственный геном), но и экзогенную (чужой геном), например вирусную. В жизненном цикле вирусов различают две фазы:

- 1) внеклеточную, которая длится, пока вирус существует в виде инертной инфекционной частицы — вириона (упакованной матрицы);
- 2) внутриклеточную (неупакованной матрицы), когда формируется особая система «вирус — клетка».

Вирусы — группа ультрамикроскопических облигатных внутриклеточных паразитов, способных размножаться только в клетках живых организмов (многоклеточных и одноклеточных). Они являются возбудителями заболеваний человека, животных, растений, насекомых, простейших и микроорганизмов.

Вирусы открыл в 1892 г. Д.И. Ивановским при изучении причин гибели табака от мозаичной болезни, выражающейся в появлении пятен на листьях растений. Д.И. Ивановский обнаружил, что здоровое растение можно заразить бесклеточным фильтратом сока больного растения. Таким образом, было показано, что болезнь передаётся организмом, который может проходить через бактериологические фильтры. Эти организмы получили название «фильтрующиеся вирусы», а затем просто «вирусы».

Вирусы обладают следующими характерными особенностями, отличающими их от других микроорганизмов:

- это мельчайшие организмы, размером 30–300 нм;
- не имеют клеточного строения;
- не способны к росту и бинарному делению;
- не имеют собственных метаболических систем;

– содержат нуклеиновые кислоты только одного типа – ДНК или РНК, окружённые белковой оболочкой, поэтому вирусы делятся на ДНК-содержащие и РНК-содержащие;

– для их воспроизводства нужна только нуклеиновая кислота;

– используют рибосомы клетки-хозяина для синтеза собственных белков;

– молекула ДНК вирусов может встраиваться в геном клетки хозяина и существовать в таком виде долгое время, не проявляя себя.

Таким образом, вирусы – это организмы, для размножения которых необходимы живые клетки хозяина.

Вирусная частица называется *вирионом*, состоит из нуклеиновой кислоты, окружённой белковой оболочкой – *капсидом*, который состоит из субъединиц – *капсомеров*. Вирусные частицы могут быть палочковидной, нитевидной, сферической, кубовидной, булавовидной формы.

Вирусы паразитируют только на определенных хозяевах – растениях, животных или микроорганизмах. Эта специфичность обуславливает разделение вирусов на группы на основе типа хозяев. Вирусы бактерий и актиномицетов названы фагами – бактериофагами и актинофагами. В настоящее время известны субмикроскопические агенты, поражающие грибы и водоросли (например, цианофаги).

Вирусы не размножаются в почве, но могут долго сохраняться в ней, если условия исключают их инактивацию (вирусы мозаичной болезни пшеницы, овса и табака, кольцевой пятнистости картофеля и др.). Некоторые вирусы человека и животных, попадая в почву, остаются инфекционными в течение нескольких месяцев.

Механизмы проникновения вирусов в клетки разнообразны:

1. У сложных вирусов животных происходит слияние суперкапсида с ЦПМ клетки, что приводит к высвобождению нуклеокапсида в цитоплазму.

2. В рецептор-опосредованном эндоцитозе участвует эндосома, которая сливается с лизосомой, что приводит к протеолизу эндосомы и слиянию липид-

ных слоев капсида с ЦПМ лизосомы, в результате чего нуклеокапсид попадает в цитозоль клетки.

3. Трансфекция бактериофагов — поглощение свободной вирусной ДНК бактериями. Кроме того, нитчатые фаги могут скатываться внутрь клетки по жгутикам, F- и I-пилям.

4. Т-четные фаги, сокращая чехол, впрыскивают свою ДНК внутрь бактериальной клетки через отверстие в клеточной стенке, которое образуется за счет действия лизоцима базальной пластинки вириона. Ферментативное разрушение клеточных стенок осуществляют и многие другие вирусы одноклеточных.

5. Вирусы растений попадают внутрь клеток чаще через повреждения клеточной стенки, которые образуются самопроизвольно или насекомыми.

6. Другие вирусы растений передаются с цитоплазмой при вегетативном или семенном размножении либо инфицируют те стадии онтогенеза хозяина, которые лишены клеточной стенки (например, подвижные гаметы водорослей).

Внутриклеточное размножение вируса заключается в репликации геномной НК, биосинтезе вирусных структурных белков и сборке нуклеокапсида. Особенности репликации и образования репликативных интермедиатов для различных вирусных генотипов приведены выше. Вирусные белки синтезируются на двойственной основе. С одной стороны, вирус эксплуатирует хозяйский аппарат трансляции; с другой стороны, используется вирусная позитивная РНК (смысловая или мРНК). Общими особенностями этого процесса являются синтез нуклеокапсидных белков на свободных полирибосомах, а суперкапсидных — на рибосомах, связанных с мембранами, протеолитический процессинг (нарезание) и гликозилирование вирусных белков. Суперкапсидные белки присоединяют остаток сахара в ходе транспортировки на наружную поверхность клеточной мембраны. Особо следует обратить внимание на стратегии размножения дефектных вирусов, у которых не активны или утрачены некоторые гены, отвечающие за образование полноценных вирионов. Вирусы, интегрированные в хромосому клетки-хозяина, реплицируются совместно с хромосомой.

Дефектные интерферирующие вирусы являются делеционными мутантами, которые кодируют свои структурные белки и используют репликативную систему вируса-хелпера, нарушая тем самым репликацию последнего. Вирусы-сателлиты также интерферируют с вирусами-помощниками, однако, как правило, они не имеют структурного сходства с последними, поэтому являются еще более жесткими молекулярными паразитами. Вирусы-хелперы предоставляют вирусам-сателлитам не только свои репликазы и трансферазы, но и свои м-РНК. Морфогенез вирионов заключается в упаковывании геномной НК в капсид. Сначала все компоненты вириона образуются независимо друг от друга, затем они собираются в капсид, перед замыканием которого внутрь проникает НК, и капсид приобретает окончательную форму. На этом созревание простых вирусов завершается. У оболочных вирусов созревание происходит в процессе заключения нуклеокапсида в суперкапсид, что часто имеет место при почковании одновременно с выходом из клетки-хозяина. Оболочные вирусы могут созревать как на ЦПМ (ортомиксо- и рабдовирусы), так и на мембранах органелл: ядра (герпесвирусы) или шероховатого эндоплазматического ретикулума (корона- и буньявирусы). Выход готовых вирионов наружу исчерпывается двумя сценариями. Простые вирусы, которые собираются в цитоплазме или на внутренней мембране ядерной оболочки, как правило, используют цитолиз клетки-хозяина, для чего им достаточно активности одного-двух собственных ферментов. Оболочные вирусы предпочитают механизм экзоцитоза (в том числе почкования), при котором целостность ЦПМ клетки-хозяина не нарушается, и вирионы выходят постепенно. Не у всех вирусов продуктивная инфекция заканчивается выходом зрелых вирионов наружу. Многие вирусы растений и грибов распространяются в обход внеклеточного пространства и заражают новые клетки через цитоплазму. Некоторые вирусы животных, захваченные фагоцитами, способны блокировать фагоцитоз и распространяются *in vivo* вместе с фагоцитами. Наконец, для провирусов, интегрированных в хозяйскую хромосому, и вирусов-плазмид, существующих в виде экстрахромосомных генетических элементов, выход из клетки не является обязательным, поскольку они продол-

жают сохранять себя в виде геновида внутри клетки-хозяина, передаваясь вертикально при её делении. Встраиваясь в геном клетки-хозяина, профаг оказывает мутагенный эффект, который может проявляться в изменении таких фенотипических свойств бактерий, как окраска и форма колоний, устойчивость к антибиотикам и т. п. Интегрирование вирусного генома с геномом многоклеточных эукариот может приводить к нарушению пролиферации клеток и вызывать их злокачественное перерождение. В связи с этим онкогенные вирусы есть в составе всех групп ДНК-содержащих вирусов.

Онкогенность — побочное следствие механизмов их репродукции, в основе которого лежит способность вирусов индуцировать переход клеток в S-фазу жизненного цикла и выключать системы, контролирующие размножение в нормальных клетках, что может привести к бесконтрольной пролиферации (размножению). К онковирусам относятся ДНК-содержащие папова-, адено- и герпесвирусы и РНК-содержащие ретровирусы.

Бактериофаги — облигатные паразиты микроорганизмов. Обычно имеют многогранную призматическую головку, состоящую из капсомеров, внутри которых содержится ДНК, и отросток, представляющий собой белковый стержень, покрытый чехлом из спирально расположенных капсомеров. Длина головки достигает 60–100 нм, отростка — 100–200 нм. Через отросток ДНК из головки фага переходит в клетку поражённого микроорганизма.

Обычно фаг адсорбируется чувствительной к нему клеткой бактерии, содержимое головки фага переходит в бактерию, а оболочка фага остается вне её. После нападения фага бактерия утрачивает способность к делению, перестаёт двигаться. Метаболизм бактериальной клетки перестраивается под влиянием ДНК фага, и она производит не вещества собственной клетки, а бактериофага, в клетке идёт интенсивное образование его частиц. Затем клеточная стенка бактерии растворяется, и из неё выходят зрелые бактериофаги. Одна клетка бактерии служит источником нескольких сотен и даже тысяч бактериофагов.

Растворять (лизировать) бактерии способен только *вирулентный* фаг. Нередко бактериальная клетка инфицируется недостаточно активным фагом, который может в ней существовать, не вызывая лизиса. Такие фаги называются *умеренными*. При размножении бактерии инфекционное начало переходит в дочерние клетки. Бактерии-передатчики этих фагов называются *лизогенными*. При определенных условиях лизогенные культуры бактерий могут быть лизированы находящимся в них фагом.

Следует отметить специфичность действия фагов. Каждый фаг способен поражать или один вид, или группу близких видов микроорганизмов.

Известны фаги, лизирующие бактерии родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, актиномицеты рода *Streptomyces*; микобактерии рода *Mycobacterium* и многие другие.

Фаги встречаются в воде, почве и других природных объектах. Способность фагов разрушать бактерии используется для лечения бактериальных заболеваний. Некоторых фагов используют в медицине для профилактики заболеваний.

Геном фага Т4 (166 тыс. п. н.) представлен примерно 200 генов. Цитозин полностью замещен 5-гидроксиметилцитозином, 5-ОН группа которого гликозилирована, что обеспечивает устойчивость вирусной ДНК к воздействию рестриктаз клетки-хозяина. Хотя геномная ДНК фага находится в линейной конфигурации, она способна переходить в кольцевую форму. В капсиде может поместиться только одна копия генома. Особенности упаковки нуклеиновой кислоты Т4 в капсид приводят к тому, что геномные ДНК в популяции бактериофага отличаются друг от друга первыми и последними нуклеотидами. Другой особенностью генома фага Т4 является присутствие интронов в нескольких его генах, которые по строению сходны с интронами I типа эукариот и также подвергаются автосплайсингу. Хозяева бактериофагов сем. *Myoviridae* принадлежат к нескольким филам домена *Bacteria* (B10 *Cyanobacteria*, B12 *Proteobacteria*, B13 *Firmicutes* и B14 *Actinobacteria*), а также к филе A2 *Euryarchaeota*.

Жизненный цикл. Адсорбция и проникновение фага Т4 проходят в несколько стадий и регулируется рядом белков, в том числе бактериальных. На обратимой стадии адсорбции хвостовые фибриллы связываются с липолисахаридом и базальная пластинка прикрепляется к наружной мембране клетки-хозяина. На необратимой стадии белки базальной пластинки изменяют свою конформацию, что вызывает сокращение чехла хвостового отростка. Белок Gr5, входящий в состав стержня хвостового отростка и обладающий лизоцимной активностью, локально разрушает пептидогликан (ферментативный домен активируется периплазматическими протеазами). Сократившийся отросток внедряется в образовавшийся канал; при этом N-концевой домен белка Gr5 принимает участие в транслокации фаговой ДНК в цитоплазму. После проникновения хозяйская РНК-полимераза распознает промотор самых ранних генов, транскрипцию которых регулируют клеточные сигма-факторы. По завершении адсорбции уже через 3 мин начинается синтез ферментов, которые расщепляют ДНК хозяина до нуклеотидов и модифицируют РНК-полимеразу благодаря АДФ-рибозилированию её α -субъединицы. Фаг Т4, в отличие от Т7, не кодирует собственную РНК-полимеразу и поэтому использует бактериальный фермент, который после модификации уже не распознает промоторы *E. coli*. Модифицированная РНК-полимераза взаимодействует с промоторами запаздывающих ранних генов, а транскрипция самых ранних генов прекращается. Белки, синтезированные на протяжении 5–10 мин от начала инфекции, участвуют в репликации генома бактериофага, причем в качестве субстратов используются хозяйские нуклеотиды. Одновременно с этим синтезируется новый сигма-фактор, который регулирует транскрипцию поздних генов. Поздние гены кодируют структурные и морфогенетические белки. Их транскрипция тесно связана с репликацией и активизируется ДНК-полимеразным комплексом. Сначала геном бактериофага реплицируется *ori*-зависимым способом одновременно в семи локусах. При этом образуются линейные dsДНК, имеющие одноцепочечные ss-разрывы, которые возникают при удалении РНК-праймеров при синтезе отстающей нити. Такие детали строения репликативных интермедиатов играют

важную роль на следующем рекомбинационно-зависимом этапе репликации с использованием хозяйского механизма рекомбинационной репарации ds-разрывов. По-видимому, ss-участок внедряется с помощью вирусной рекомбиназы в гомологичный участок ds-интермедиата с образованием хиазмы Холлидея. В этой области вирусная ДНК-полимераза достраивает на матрице недостающий фрагмент 3'-конца. Вирусная резольваза и лигаза демонтируют хиазму Холлидея и восстанавливают ds-интермедиат, в результате чего образуются длинные конкатемеры. Капсид и хвостовой отросток собираются независимо друг от друга. При упаковке ДНК приобретает сверхвысокую плотность в результате паракристаллической укладки. Через 20–30 мин после начала инфекции активизируются гены лизиса. На поздних этапах, если клетку инфицирует слишком много частиц бактериофага, литический цикл затормаживается, и в течение еще 4–6 ч продолжаются репликация и упаковка вирусной ДНК. По завершении литического цикла из клетки выходит 200 частиц Т4, как и другие миовирусы, проходит преимущественно литический цикл, который заканчивается гибелью бактерий-хозяев. Лизогенные циклы для них не характерны. В связи с этим они являются одними из регуляторов круговорота органического вещества бактериального пикопланктона. Сравнительно-морфологические и генетические исследования показывают, что эти бактериофаги широко распространены как в пресноводных, так и в морских экосистемах. Резистентность. Устойчивость фагов к факторам окружающей среды достаточно велика. Они - выдерживают нагревание до 75 °С, - не обезвреживаются дезинфицирующими веществами в малых концентрациях, - резистентны к антибиотикам, хлороформу и ферментным ядам, что широко используется при выделении фагов из бактериальных популяций, весьма чувствительных ко всем микробоцидным веществам; - быстро разрушаются в желудочном соке, под воздействием УФ-лучей и ионизирующих излучений. В организме человека сохраняются в течение 7–13 дней, поэтому при проведении профилактических мероприятий в очагах кишечных инфекций повторно назначают фаги контактным (инфицированным) лицам.

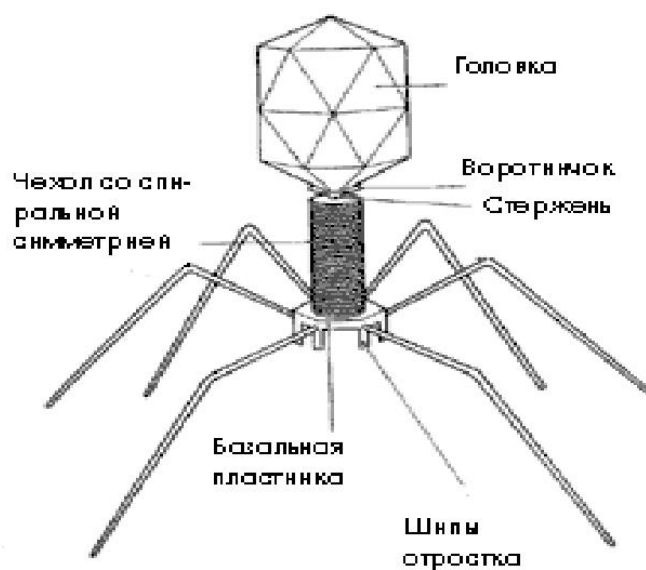


Рисунок 4 Схема строения бактериофага

13. Понятие об обмене веществ у микроорганизмов

Основу жизнедеятельности микроорганизмов, как и клеток любых живых существ, составляет обмен веществ (метаболизм). Он представляет собой сложный комплекс химических превращений пищи, поступающей из внешней среды. Обмен веществ состоит из двух взаимозависимых и в то же время противоположных, протекающих одновременно процессов – конструктивного (анаболизма) и энергетического (катаболизма) обмена.

Анаболизм (пластический обмен, биосинтез) – это совокупность химических реакций, приводящих к превращению поступивших из внешней среды веществ, синтезу новых компонентов клетки. Для его осуществления и других функций клетки (движение, размножение, спорообразование) необходима энергия. Организм получает её в результате **катаболизма** – совокупности химических реакций, протекающих в клетке с выделением энергии. Все химические реакции, связанные с обменом веществ, катализируются ферментами и протекают одновременно в определённой последовательности. Одно и то же вещество может служить источником энергии и материалом для синтеза компонентов клетки. Нередко используются и разные вещества.

Особенностью микроорганизмов является большое разнообразие обменных процессов, различные потребности в питательных веществах, различные способы получения энергии, необычайно интенсивный обмен веществ. За сутки при оптимальных условиях клетка потребляет пищу, масса которой в 30–40 раз больше массы самой клетки. Основная часть пищи расходуется в энергетическом обмене, при котором выделяются в окружающую среду продукты обмена: кислоты, спирты, CO_2 , H_2 и др. Это широко используется в пищевой и микробиологической промышленности для получения разнообразных продуктов (уксус, спирт, хлеб, молочнокислые продукты, антибиотики, витамины, ферменты и др.). Это же явление обуславливает быструю порчу сырья, кормов, продуктов питания.

Характеристика питательных сред

Питательные среды для культивирования микроорганизмов классифицируют по ряду критерий.

А. По составу:

1. Натуральные среды состоят из продуктов животного или растительного происхождения (овощные и фруктовые соки, животные ткани, разведенная кровь, молоко, вода морей, озер, минеральных источников, отвары или экстракты, полученные из природных субстратов, — мясо, почва, навоз, части растений).

Достоинство этих сред — на них хорошо развиваются многие микроорганизмы.

Недостаток — непригодность их для изучения обмена веществ микроорганизмов, т. к. такие среды имеют сложный непостоянный химический состав и в них трудно учесть потребление ряда компонентов и образование продуктов метаболизма. Используются главным образом для поддержания культур микроорганизмов, накопления биомассы и для диагностических целей. В лабораторной практике широко применяются мясопептонный бульон (МПБ), неохмелённое сусло, дрожжевой экстракт, почвенный экстракт, картофельная среда.

2. Синтетические — среды, в которые входят лишь соединения определенного химического состава, взятые в точно указанных количествах. Широко используются при исследовании обмена веществ, физиологии и биохимии микроорганизмов. Примерами таких сред являются среды для различных физиологических групп бактерий (тионовых, почкующихся, азотфиксирующих, нитрифицирующих).

3. Полусинтетические — среды, содержащие соединения известного состава, такие как углеводы, соли аммония, нитраты, фосфаты и т. п. Однако в их состав всегда включаются вещества неопределенного состава, такие как дрожжевой автолизат, почвенный экстракт, гидролизат казеина, которые служат источником неизвестных дополнительных факторов роста. Полусинтетические среды находят широкое применение в промышленной микробиологии для получения аминокислот, витаминов, антибиотиков и других важных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов. В лабораторной практике применяются для оживления микробных культур, выращиваемых на синтетических средах.

Б. По назначению:

1. Элективные (селективные) — обеспечивают преимущественное развитие определенной группы микроорганизмов, для которых характерна общность физиологических свойств. К факторам, определяющим элективность сред, относятся наличие или отсутствие органических субстратов в среде, аэробность или анаэробность, свет как источник энергии, отсутствие источника азота в среде и т. п. При создании элективных условий необходимо знать физиологию или четко представлять те особенности, которыми должны обладать выделяемые микроорганизмы. Селективные среды применяют для получения накопительных культур определенных метаболических групп микроорганизмов.

2. Дифференциально-диагностические (индикаторные) — позволяют быстро отличить одни виды микроорганизмов от других или выявить некоторые их особенности. Широко применяют в санитарной и медицинской микробиологии для быстрой идентификации определенных групп микроорганизмов.

Примерами таких сред являются агар Эндо для выявления бактерий группы кишечной палочки, рН-индикаторные среды и т. д.

В. По физическому состоянию:

1. Жидкие — для накопления биомассы или продуктов обмена, для исследования физиологии и биохимии микроорганизмов, для поддержания и сохранения коллекции культур микроорганизмов, плохо развивающихся на плотных средах, для определения количества микроорганизмов.

2. Сыпучие — для культивирования некоторых продуцентов физиологически активных соединений и для сохранения их культур в коллекциях. К таким средам относятся отруби, разваренное пшено, кварцевый песок, пропитанный питательным раствором, и др.

3. Плотные — для выделения чистых культур, в диагностических целях для описания колоний, их антибиотической активности, для хранения культур в коллекциях и в ряде других случаев. С целью уплотнения сред применяют агар-агар или желатин. Плотной основой могут служить пластинки силикагеля, которые пропитывают питательной средой (для синтетических сред строго определенного состава).

Так как в микробиологических исследованиях работают со стерильными питательными средами, то важно соблюдать режимы стерилизации и способы стерилизации в зависимости от вида питательной среды.

Таблица 1 – Режимы стерилизации питательных сред и материалов

№ п/п	Вид стерилизации	Стерилизуемый материал
1	Прокаливание в пламени и обжигание	Бактериологические петли, металлические инструменты, стеклянная и фарфоровая посуда, ватные пробки
2	Сухожаровая стерилизация горячим воздухом при 160-170 °С в печи Пастера (сушильном шкафу) в течение 2 часов	Посуда, завернутая в бумагу, металлические инструменты, вазелиновое масло, тальк

№ п/п	Вид стерилизации	Стерилизуемый материал
3	Дробная стерилизация (тиндализация) — прогревают несколько раз в парах кипящей воды или текучим паром в аппарате Коха или на водяной бане при 56-58 °С, а в период между прогреваниями дают прорасти жизнеспособным спорным формам	Среды, которые нельзя нагревать выше 100 °С
4	Автоклавирование — стерилизация насыщенным паром под давлением в автоклаве	Питательные среды, которые не содержат легко разрушаемое вещество, посуда
5	Кипячение	Мембранные фильтры, металлические инструменты, стеклянные детали
6	Пастеризация — нагревание до 60–80 °С однократно 20 мин	Молоко, соки, пиво, вино
7	Стерилизация фильтрованием	Среды или компоненты сред, не выдерживающие нагревания
8	Стерилизация облучением (УФ, рентгеновские лучи)	Помещение, медицинские принадлежности
9	Газовая стерилизация (СО, Cl ₂ , O ₃ , SO ₃)	Изделия из термолабильных пластмасс, аппаратура с зеркальным, оптическим и радиоэлектронным оборудованием
10	Стерилизация химическими веществами (спирт, фенол, перманганат калия)	Металлические инструменты, столы

ПРАКТИКУМ

Практическая работа 1. Изучение порядка подготовки посуды, реактивов и питательных сред для проведения микробиологических исследований

Содержание работы. Ознакомление с правилами техники безопасности и организации работ в микробиологической лаборатории. Изучение порядка мойки и подготовки посуды, приготовления питательных сред и методов их стерилизации. Освоение техники посевов.

Приборы и материалы. Стерилизатор паровой медицинский (автоклав); стерилизатор суховоздушный (шкаф сушильный); термостат; весы лабораторные 2-го класса точности; анализатор потенциометрический - рН-метр; водяная баня; электрическая плитка; водоструйный насос; фильтры Зейтца или «milipore», спиртовка; петля бактериологическая; лабораторная посуда (пипетки, чашки Петри, пробирки, ступки, пестики, бюксы, колбы, стекла предметные, цилиндры, шпатели и др.); вата; марля; бумага или пеналы для посуды; реактивы; питательные среды.

Методы исследования. Методы "горячей" и "холодной" стерилизации. Методы посевов по ГОСТ 9225: посев штрихом, посев уколом, посев петлей, поверхностный посев шпателем, глубинный посев в чашку Петри, метод последовательных разведений. Методы контроля стерильности приготовленных сред.

Порядок выполнения работы.

Каждый студент:

1. Проводит мойку и подготовку посуды (чашки Петри, пипетки вместимостью 1, 2, 5 и 10 см³, пробирки); изготовление ватно-марлевых пробок для пробирок и колб.

2. Изучает методы стерилизации: физические, химические и механические.

Физические методы: стерилизация кипячением, сухим жаром (автоклавирование), текучим паром (автоклавирование при открытом кране для выпуска

пара), неполная стерилизация (пастеризация) молока, тиндализация (дробная пастеризация), стерилизация лучистой энергией (действием ультрафиолетовых лучей).

Химический метод стерилизации или дезинфекции, который осуществляется при помощи сильнодействующих химических веществ или так называемых антисептиков. В лабораторной практике методы дезинфекции применяют для обеззараживания рабочего стола, рук, боксов для посевов, термостатов.

Механический метод стерилизации осуществляется путем фильтрования с помощью мембранных фильтров Зейтца или «milipore».

3. Готовит несколько питательных сред, необходимых для проведения исследований в соответствии с индивидуальным заданием преподавателя. Основные питательные среды, используемые при проведении работ: физиологический раствор; обезжиренное молоко; гидролизованное молоко (концентрированное и разбавленное водой в соотношении 1:2); МРС; специальные среды для бифидобактерий; среда для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов; среда для количественного учета дрожжей и плесневых грибов; среды для выявления и учета бактерий группы кишечных палочек.

После приготовления и стерилизации сред студенты проводят контроль на стерильность путем выборочного помещения сред в термостат при $t=(37\pm 1)$ °С и выдерживании их в течение 3 суток с последующим просмотром отсутствия или наличия вторичного роста остаточной микрофлоры.

4. Осваивает различные методы посевов, пересевов и учета полученных результатов.

Проводит пересев микроорганизмов, выращенных на твердой и жидкой питательной среде. Осуществляет посев микроорганизмов на плотные среды в чашки Петри глубинным и поверхностным методами. Студенты осуществляют посевы полученной ими культуры молочнокислых бактерий, бифидобактерий или других микроорганизмов, фагов в соответствии с индивидуальным заданием.

Порядок оформления работы.

В тетради студенты отражают результаты проделанной работы: записывают порядок подготовки посуды; излагают основные методы стерилизации, их сущность и применение в микробиологической практике; приводят прописи приготовления питательных сред (с указанием режимов стерилизации), необходимых для проведения индивидуальных исследований; описывают методы посевов, учета результатов и их применение; зарисовывают картины проведенных посевов штаммов молочнокислых бактерий, бифидобактерий и других изучаемых объектов.

Вопросы для самопроверки:

1. Каковы главные отличия стерилизации посуды от дезинфекции инструментов и других объектов?
2. В чем смысл дробной стерилизации питательных сред? В каких случаях она применяется?
3. С какой целью используется стерилизация с использованием фильтров? Для чего используют данный вид стерилизации на предприятиях молочной промышленности?
4. Назовите методы сухой стерилизации, режимы и область их применения.
5. Расскажите об устройстве автоклава и порядке работы с ним. Назовите режимы стерилизации питательных сред, применяемых при проведении микробиологических исследований молочных продуктов и заквасок.

Практическая работа 2. Методы микробиологических исследований

1.1. Основные методы микробиологического исследования Микроскопический метод — изучение живых и убитых микроорганизмов в нативном или обработанном виде с помощью микроскопа.

Основные виды микроскопов: световые, люминесцентные, электронные и лазерные. С помощью обычных световых микроскопов можно изучать живые или фиксированные микроорганизмы в светлом поле, с помощью дополнительных устройств вести прижизненные наблюдения в темном поле или фазовом контрасте. Для количественных исследований широко применяют люминесцентную микроскопию. Тонкое строение прокариот и вирусов (объекты менее 0,2 мкм) изучают с помощью просвечивающей или сканирующей электронной микроскопии, которая дает увеличение до 300 000. Развитие электронной техники сделало доступным для микробиологических исследований в XXI в. применение сканирующих зондовых, атомно-силовых, конфокальных сканирующих и лазерных интерференционных микроскопов. Это дает новые возможности для изучения группового поведения (quorum sensing) бактерий и формирования биопленок: получать 3D-изображения поверхностных ультраструктур с молекулярным разрешением в режиме реального времени в физиологических условиях, в определении технических параметров биопленок, включая прижизненное определение биомассы и др.

Микробиологический метод — выращивание микроорганизмов на питательных средах. При этом выделяют чистую культуру микроорганизмов и изучают её свойства. С этой целью исследуемый материал засевают на различные питательные среды.

Серологический метод — изучение антигенных свойств микроорганизмов с помощью иммунохимических реакций, в которых в качестве тест-систем применяются клетки крови экспериментальных животных или человека. Используется в микробиологии для идентификации вида микроорганизма или штамма (серотипа, серовара), что важно в медицине для определения инфекционного заболевания и/или заключения о перенесённых заболеваниях.

Экспериментальный или биологический метод – изучение некоторых свойств микроорганизмов, в частности патогенности и/или вирулентности, на лабораторных животных. Применяется в иммунологии и медицине.

1.2. Приготовление простых бактериальных препаратов-мазков включает следующие этапы:

- а) приготовление препарата,
- б) высушивание,
- в) фиксация,
- г) окраска.

Для работы используют предметное стекло (78×26 мм). Стекло должно быть чистым и обезжиренным. Чтобы обезжирить стекло, натирают одну из его поверхностей кусочком хозяйственного мыла, потом удаляют его следы сухой ватой.

А. Приготовление препарата начинается с нанесения на обезжиренную поверхность стекла маленькой капли дистиллированной воды. Стекло кладется на стеклянную рейку, помещенную над кюветой. Небольшое количество культуры, выросшей на поверхности твердой питательной среды, извлекается из пробирки или чашки Петри при помощи бактериологической петли или бактериологической иголки с соблюдением правил стерильности. Бактериологические петли делают, используя тонкую проволоку из платины или нихрома, которую закрепляют в металлическом держателе или впаивают в стеклянную палочку, диаметр бактериологической петли 4–5 мм. Петлю перед взятием клеток микроорганизмов стерилизуют. Для этого проволоку накаливают докрасна в пламени спиртовки и одновременно обжигают примыкавшую к петле часть держателя, которая будет вводиться внутрь сосуда, содержащего микроорганизмы. Петлю рекомендуется держать в пламени спиртовки почти вертикально, чтобы проволока была равномерно раскалена на всем протяжении. При прокаливании необходимо помнить, что наивысшая температура развивается в верхней и периферической частях пламени, поэтому не следует опускать петлю непосредственно к спиртовке. Сразу же после стерилизации петлю вводят в

пробирку с микроорганизмами. Чтобы не повредить клетки, петлю охлаждают, прикасаясь ею к внутренней поверхности пробирки, чашки или к питательной среде, свободной от клеток микроорганизмов, и только после этого захватывают небольшое количество микробной массы. Для этого пробирку или чашку Петри берут в левую руку так, чтобы поверхность питательной среды с налетом выросших микроорганизмов была обращена кверху и хорошо видна. В правую руку петлю берут так, как держат карандаш, и прокалывают её в пламени спиртовки, затем, не выпуская петли, открывают чашку Петри в стерильной зоне и извлекают бактериальную массу. Закрывают чашку, а извлеченный материал используют для приготовления препарата. Для этого равномерно эмульгируют его в капле воды.

Б. Высушивание. Приготовленные мазки высушивают на воздухе при комнатной температуре или в термостате при 28 °С. Нельзя подогревать, т. к. при интенсивной потере влаги происходит быстрое свертывание белков и клетка теряет естественную форму.

В. Фиксация. Мазки фиксируют после полного их высыхания с целью закрепления на стекле. Кроме того, убитые микробы лучше воспринимают окраску.

Способы фиксации:

I — в пламени спиртовки. Стекло берут пинцетом и проводят через верхнюю часть пламени два-три раза (около 2 с). После фиксации мазку следует дать остыть. Длительная фиксация может изменить структуру клетки, а недостаточно зафиксированный мазок смывается со стекла при последующей обработке.

II — химическими веществами (в этаноле 15–30 мин, спирт + эфир 2–5 мин). Фиксацию производят, наливая фиксирующую жидкость на мазок или погружая мазок в кювету с такой жидкостью.

Г. Окраска препарата. Способы окраски можно разделить на две группы: ориентировочные, или простые, позволяющие сделать вывод о морфологии

культур, и дифференциальные, или сложные, выявляющие химические структурные особенности бактериальных клеток.

При простом методе окраски используют один красящий раствор. На фиксированный препарат помещают несколько капель красящего раствора так, чтобы покрыть всю поверхность мазка. Красными красителями красят 1–2 мин, а синими — 3–5 мин. Затем краску смывают дистиллированной водой, а мазок просушивают между листочками фильтровальной бумаги или на воздухе. Микрографируют с помощью иммерсионной системы (увеличение $10,0 \times 1,0 \times 100$ или аналогичное). Зарисовывают поле зрения под микроскопом, отражая морфологию окрашенных культур.

1.3. Дифференциальные методы окраски

1.3.1. Окраска мазка по Граму

Если фиксированные клетки микроорганизмов обработать сначала кристаллическим фиолетовым, а затем йодом, на поверхности клеток образуется окрашенный комплекс. При последующей обработке спиртом в зависимости от строения клеточной стенки судьба комплекса будет различна: у грамположительных видов этот комплекс удерживается клеткой, и последние остаются окрашенными; у грамотрицательных видов окрашенный комплекс вымывается из клеток, и они обесцвечиваются. При докрасивании фуксином грамположительные бактерии имеют сине-фиолетовый цвет, грамотрицательные — красный.

Техника окрашивания:

- 1 Готовить бактериальный препарат до стадии фиксирования.
2. Фиксированный препарат окрасить через фильтровальную бумагу карболовым генцианвиолетом 2 мин.
- 3 Снять бумагу и, не промывая водой, 1 мин протравливать мазок раствором Люголя (при этом мазок чернеет).
- 4 Слить раствор Люголя и на 30 с нанести на препарат спирт с йодом (2 мл 10 %-го раствора йода на 100 мл этанола). Обработка спиртом проводится до прекращения отхождения лиловых струек.

5 Быстро промыть мазок водой. Высушить между полосками фильтровальной бумаги.

6 Докрасить мазок фуксином 2 мин через фильтровальную бумагу.

7 Смыть краску водой, высушить между полосками фильтровальной бумаги и микроскопировать.

Примечание: дифференциальный метод окраски по Граму дает четкие результаты при соблюдении ряда существенных условий:

- возраст культуры: обычно окраске по Граму подвергают суточные культуры бактерий, в «старых» культурах тинкториальные свойства микроорганизмов могут быть смазаны;

- концентрация бактерий в мазке: надо избегать скопления «глыбок», в них результаты могут быть искажены;

- сушка препарата не должна быть горячей;

- нельзя травмировать клетки петлей на предметном стекле в ходе приготовления мазка;

- фиксация препарата должна быть только над пламенем спиртовки (химические фиксаторы исключаются). Окрашивать можно лишь полностью остывший мазок.

8 Сделать вывод о грампринадлежности исследуемых культур.

9 Составить сводную таблицу на группу о грампринадлежности различных видов бактерий.

1.3.2. Окраска капсул по Ольту

Клетки многих микроорганизмов при росте их на богатых углеводами средах могут быть окружены рыхлым слоем – капсулой. По химическому составу эти поверхностные структуры в основном представлены полисахаридами и плохо фиксируют краситель, который легко смывается в процессе обработки препарата.

Техника окрашивания:

1 Готовить бактериальный препарат до стадии фиксирования.

2 Фиксированный препарат красить 2 %-м водным раствором сафранина в течение 1–2 мин.

3 Смыть краску водой, высушить между полосками фильтровальной бумаги.

4 Препарат рассматривать в воде: на мазок нанести каплю воды, накрыть покровным стеклом, на него капнуть иммерсионное масло. Тело бактерии и капсула различно преломляют лучи света. Тело микроба окрашивается в коричнево-красный цвет, капсулы — в бледно-желтый.

5 Сделать вывод о способности бактерий к капсулообразованию.

1.3.3. Приготовление препаратов «висячая» и «раздавленная» капля

Для наблюдения живых клеток (их морфологии, подвижности) используют микроскопию неокрашенных культур. Подвижность определяют у клеток молодой культуры (чаще суточной), поскольку с возрастом клетки могут её терять.

Способность к движению у большинства микроорганизмов обусловлена наличием жгутиков. Расположение и количество их у различных бактерий варьирует и имеет диагностическое значение. По характеру движения бактерий в препарате можно предположительно судить о типе жгутикования. Если жгутики расположены на одном или на двух полюсах клетки, то движение обычно очень быстрое, «ввинчивающееся», без покачивания из стороны в сторону. При латеральном расположении жгутиков клетки двигаются плавно, совершая колебательные отклонения от оси движения. Бактериальный жгутик неразличим в световом микроскопе, если он не окрашен особым способом, который увеличивает кажущуюся толщину жгутика.

Методика приготовления «висячей» капли:

1 Используют специальные стекла с луночкой, покровные стекла, вазелин. Края луночки покрыть небольшим слоем вазелина.

2 На покровное стекло нанести каплю дистиллированной воды, а затем внести в каплю культуру бактерий, выращенную на поверхности твердой питательной среды.

3 Осторожно стеклом с луночкой, края которой смазаны вазелином, покрыть покровное стекло с каплей культуры так, чтобы капля осталась в центре. Получается герметически закрытая камера. Склеившиеся стекла быстро перевернуть вверх покровным стеклом.

Если препарат приготовлен правильно, капля будет висеть в камере и не высохнет в течение длительного времени.

4 Сделать вывод о способе движения исследуемых культур.

Методика приготовления «раздавленной» капли

1 На предметное стекло в капельку дистиллированной воды внести исследуемую культуру бактерий.

2 Сверху накрыть покровным стеклом так, чтобы при этом не образовались пузырьки воздуха, мешающие изучению препарата под микроскопом.

1.3.4. Окраска спор по методу Пешкова

Метод основан на окрашивании споры и цитоплазмы при нагревании. Промывание препарата водой ведет к обесцвечиванию цитоплазмы, тогда как спора прочно удерживает краситель.

Техника окрашивания

1 Готовить бактериальный препарат до стадии фиксирования.

2 После фиксации в пламени мазок красить при нагревании метиленовым синим по Лефлеру, доведя краситель до кипения. Продолжительность окраски, считая с момента закипания, 10–20 с.

Не следует допускать высыхания красителя (по мере испарения добавляют новые порции красителя, предварительно охлаждая стекло).

3 Дать препарату остыть, а затем промыть водой.

4 Докрашивать

0,5 %-м раствором нейтрального красного или сафранина в течение 30 с.

5 Краситель смыть, препарат промыть водой, высушить между полосками фильтровальной бумаги.

При правильной окраске споры окрашиваются в голубовато-синий цвет, а бактериальные клетки — в красный.

6 Сделать вывод о способности бактерий к спорообразованию и методах окраски спор.

Практическая работа 3 Изучение методов выделения и селекции микроорганизмов. Исследование фенотипических характеристик штаммов бактерий

Содержание работы. Изучение этапов выделения чистых культур молочнокислых бактерий и бифидобактерий из различных источников. Изучение методов селекции микроорганизмов. Исследование фенотипических характеристик выделяемых штаммов бактерий. Освоение техники приготовления микроскопического препарата и работы на микроскопе.

Приборы и материалы. Термостаты; микроскопы; водяная баня; электрическая плитка; спиртовки; петли бактериологические; лабораторная стерильная посуда: пипетки, чашки Петри; стеклянные шпатели; стекла предметные; стерильные питательные среды: физиологический раствор; стерильное обезжиренное молоко; гидролизованное (разбавленное) молоко с массовой долей NaCl – 2, 4 и 6,5 %; гидролизованное (разбавленное) молоко с разной активной кислотностью (рН 9,2; 9,6; 5,0; 8,3); гидролизованное (разбавленное) молоко с 1,5 % агара; гидролизованное (разбавленное) молоко с агаром и добавлением 2 % сахарозы; гидролизованное (разбавленное) молоко с добавлением 20 и 40 % желчи; питательная среда для бифидобактерий (кукурузно-лактозная с разной массовой долей агара или ГМК-1 и ГМК-2) без добавок, а также с добавками (NaCl, желчи) и разной активной кислотностью; краски и реактивы для окрашивания препаратов; иммерсионное масло; этиловый спирт, фильтровальная бумага, вата.

Исходный посевной материал: образцы самоквасных молочных продуктов, смеси культур или другие источники для выделения бактерий.

Методы исследования. Метод выделения чистой культуры на твердых средах, метод разбавления Пастера. Методы селекции: рассев популяции, развитие в неблагоприятных условиях и после воздействия мутагенных факторов. Методы изучения морфологических, физиолого-биохимических и генетических свойств выделенных штаммов. Метод приготовления микроскопических препаратов и их окраски.

Порядок выполнения работы. По заданию преподавателя каждый студент проводит работу в следующей последовательности:

1. Изучает методы выделения: метод разбавления Пастера, метод Коха.

Знакомится с методами селекции: рассев популяции идентифицированной культуры; методы культивирования бактерий в питательных средах, содержащих инородные для развития штаммов вещества (например, антибиотики) или бактериофаги в достаточно высоком количестве; методы воздействия мутагенов на бактериальную клетку; генно-инженерные методы.

2. Проводит выделение конкретного вида молочнокислых бактерий, бифидобактерий, пропионовокислых бактерий или других микроорганизмов по индивидуальному заданию преподавателя.

3. Знакомится с методами определения морфологических и культуральных признаков бактерий.

Изучает морфологию, овладевая техникой приготовления препаратов и микроскопирования.

Изучает культуральные признаки выделенных штаммов, определяя характер образуемых колоний (размер, форму, цвет, поверхность, профиль, край, консистенцию колоний и их оптические свойства) на жидких и твердых средах.

4. Изучает физиологические и биохимические свойства выделенных штаммов микроорганизмов.

При изучении физиолого-биохимических свойств молочнокислых бактерий и бифидобактерий, применяемых в молочной промышленности, уделяют внимание следующим характеристикам: отношение микроорганизмов к температуре (определяют предельную максимальную и минимальную температуру

развития); способность к ферментированию углеводов (сахаролитическая способность); протеолитическая способность; способность образовывать аммиак из аргинина; способность развиваться в питательных средах с добавлением 0,4 % фенола, NaCl (2; 4; 6,5 %), желчи (20; 40 %), метиленового голубого (0,005; 0,01; 0,1; 0,3 %); с разной активной кислотностью среды (рН 4,0; 8,3; 9,2) и др.

5. Студент проводит идентификацию выделенных штаммов бактерий на основании изученных признаков в соответствии с Определителем бактерий Берджи.

Порядок оформления работы.

В тетради студент отражает основные методы, используемые для выделения и селекции микроорганизмов. Зарисовывает схему выделения и описывает порядок выделения и идентификации бактерий, с которыми он работает по индивидуальному заданию. Полученные результаты изучения морфологических, культуральных, физиологических и биохимических свойств отражает в сводной таблице по форме:

/п	Наименование свойства	Полученный результат для штамма	
		контрольного	выделенного
	Отношение к температуре: -предельная минимальная -предельная максимальная -оптимальная		
	Отношение к метиленовому голубому		
	Отношение к щелочной и кислой реакции среды: -рН 4,0 -рН 8,3 -рН 9,2		
	И т.д.		

Вопросы для самопроверки:

1. Назовите основные питательные среды, используемые для выделения и идентификации молочнокислых бактерий, бифидобактерий. Чем отличаются искусственные (неорганические) питательные среды от естественных (органических)?
2. Какие методы выделения и селекции применяются в настоящее время и с какой целью?
3. Опишите последовательность этапов выделения и идентификации культур молочнокислых бактерий, бифидобактерий и пропионовокислых бактерий?
4. В чем отличие приготовления мазков для микроскопирования и их окраски при изучении молочнокислых бактерий, бифидобактерий и пропионовокислых бактерий?
5. С какой целью проводят идентификацию бактерий и какую роль в этом играют физиолого-биохимические свойства?

Практическая работа 4.

Изучение технологических показателей штаммов микроорганизмов

Содержание работы. Освоение методов определения технологических показателей штаммов молочнокислых и других видов бактерий, применяемых в молочной промышленности. Изучение технологических показателей у выделенных и контрольных штаммов бактерий.

Приборы и материалы. Термостаты; микроскопы; водяная баня; центрифуга; рН-метр; вискозиметр «Реотест-2»; электрическая плитка; спиртовки; петли бактериологические; лабораторная стерильная посуда: пипетки, чашки Петри, колбы, бутылочки, пробирки, центрифужные пробирки; стерильные питательные среды: физиологический раствор; обезжиренное молоко и обработанное текучим паром; гидролизованное (разбавленное) молоко; гидролизованное (разбавленное) молоко с 1,5 % агара; питательная среда для бифидобактерий (кукурузно-лактозная с разной массовой долей агара или ГМК-1 и ГМК-2); этиловый спирт; реактивы для определения титруемой кислотности, иммерсионное масло, вата, марля.

Исходный посевной материал: штаммы бактерий, которые выделены студентом и типичные культуры из коллекции микроорганизмов кафедры «Технология молока и молочных продуктов»; закваски, полученные на молоке с использованием изучаемых штаммов.

Методы исследования. Титруемую и активную кислотность определяют по ГОСТ 3624-92; предел кислотообразования по титруемой кислотности сгустков, образуемых штаммами на молоке через 7 суток; влагоудерживающую способность сгустка – методом центрифугирования; вязкость сгустков – вискозиметрическим методом на приборе «Реотест-2»; ароматообразование – по креатиновой пробе; органолептические показатели – сенсорным методом с 5-балльной оценкой.

Порядок выполнения работы.

Каждый студент проводит работу со штаммами, выделенными им самим и контрольной культурой, полученной из музея коллекционных культур, в следующей последовательности:

1. Осваивает методы и определяет технологические показатели штаммов бактерий: активность сквашивания молока, которую оценивает по времени образования сгустка в молоке; энергию кислотообразования за определенный период времени, выражаемую в °Т; предел кислотообразования при развитии штамма в молоке в течение 7 суток; органолептические показатели сгустка, образуемого на обезжиренном и цельном молоке; влагоудерживающую способность и вязкость образованного сгустка на молоке; способность к ароматообразованию и другие.

2. Изучает методы, позволяющие определять взаимоотношения между штаммами молочнокислых бактерий разных видов или бифидобактерий или других при их сочетании и получении консорциумов бактерий.

Порядок оформления работы.

Студент записывает в тетради объекты и методы исследования, применяемые при изучении технологических показателей заквасок, полученных с использованием изучаемых штаммов. Результаты, полученные в ходе изучения технологических свойств, отражает в виде таблицы по форме:

Технологические показатели изучаемых штаммов бактерий

№ п/п	Наименование показателя	Полученные результаты для штамма	
		контрольного	выделенного
	Активность сквашивания молока, ч		
	Энергия кислотообразования штамма, °Т		
	Предел кислотообразования, °Т		
	И т.д.		

Вопросы для самопроверки:

1. С какой целью определяют технологические свойства каждого выделенного штамма бактерий? Перечислите свойства, которые следует проверять для микроорганизмов, применяемых в молочной промышленности.
2. Какой метод применяется для определения показателей вязкости сгустка, образуемого в молоке. Расскажите порядок работы на приборе «Реотест-2».
3. Как следует определять технологические свойства у бифидобактерий и пропионовокислых бактерий?
4. В чем отличие показателей: активность сквашивания молока, энергия кислотообразования, предел кислотообразования?
5. Какие методы используют при определении влагоудерживающей способности сгустков, способности культур к ароматообразованию?

Практическая работа 5 Исследование пробиотических свойств культур микроорганизмов

Содержание работы. Знакомство с методами определения устойчивости штаммов к антибиотикам и антагонистической активности по отношению к патогенным и условно-патогенным тест-микробам; способности к ферментации лактозы. Изучение пробиотических свойств у выделенных и контрольных штаммов бактерий.

Приборы и материалы. Термостаты; микроскопы; водяная баня; анализатор потенциометрический для контроля pH; электрическая плитка; спиртовки; петли бактериологические; лабораторная стерильная посуда: пипетки, чашки Петри, колбы, бутылочки, пробирки; стерильные питательные среды: физиологический раствор; обезжиренное молоко и обработанное текущим паром; гидролизованное (разбавленное) молоко; гидролизованное (разбавленное) молоко с 1,5 % агара или МРС-среда; питательная среда для бифидобактерий (кукурузно-лактозная с разной массовой долей агара или ГМК-1 и ГМК-2); среда Эндо; среда для учёта стафилококков; этиловый спирт; антибиотики; фильтровальная бумага; эталон мутности; реактивы для определения титруемой кислотности, иммерсионное масло, вата.

Исходный посевной материал: штаммы бактерий, которые выделены студентом, и типичные культуры из коллекции микроорганизмов кафедры «Технология молока и молочных продуктов»; закваски, полученные на молоке с использованием изучаемых штаммов; сыворотки, полученные из продуктов и заквасок, приготовленных с использованием изучаемых пробиотических культур; тест-культуры.

Методы исследования. Титруемую кислотность определяют по ГОСТ 3624-92; антагонистическую активность – методом развивающихся смешанных популяций в сравнении ростом тест-культур в монокультуре и ГОСТ 30726-2001; количество клеток – методом предельных разведений по ГОСТ 9225 и

ГОСТ 10444.11; количество клеток пробиотических культур по ГОСТ Р 51331-99 и МУК 4.2.999-00; отношение к антибиотикам – методом развития изучаемых штаммов в питательных средах, содержащих различные концентрации антибиотиков.

Порядок выполнения работы.

1. Ознакомиться с методами определения устойчивости штаммов молочнокислых бактерий и бифидобактерий к различным концентрациям антибиотиков в питательной среде. Провести планирование и подготовку экспериментов по определению устойчивости штаммов к антибиотикам, широко применяемым в медицинской практике.

При определении антибиотикоустойчивости молочнокислых бактерий в стерильное обезжиренное молоко с исследуемой культурой последовательно вносят различные концентрации растворов антибиотиков, затем термостатируют при оптимальной температуре развития исследуемой культуры в течение 24 часов. Об антибиотикоустойчивости молочнокислых бактерий судят по разнице показателей титруемой кислотности после культивирования на молоке с раствором антибиотика и без него, если разница составила не более 30 °Т, то культура устойчива к данной концентрации антибиотика, если разница показателей больше 30 °Т, то культура – не устойчива.

При определении антибиотикоустойчивости бифидобактерий наращивание микроорганизмов в присутствии различных концентраций антибиотиков ведут на стерильном гидролизованном молоке. Об устойчивости бифидобактерий к антибиотикам судят по наличию (количество биомассы сравнивают с количеством, полученным на чистом гидролизованном молоке) или отсутствию биомассы в пробирке с гидролизированным молоком в присутствии антибиотика.

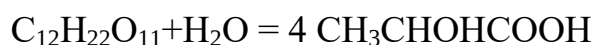
2. Изучить методы определения антагонистической (метод штрихов и метод развития в смешанных популяциях) и антибиотической активности культур микроорганизмов к тест-культурам. В соответствии с индивидуальным заданием под контролем преподавателя выявить антагонистическую активность изучаемых пробиотических культур.

При определении антагонистической активности методом развития в смешанных популяциях используют смывы тест-штаммов микроорганизмов, выращенных на скошенном мясопептонном агаре. По оптическому стандарту мутности готовят микробную взвесь, соответствующую 10 ед. стандарта мутности ГИСК. Затем 1 см³ взвеси и 1 см³ фильтрата вносят в пробирку с гидролизированным молоком. Контролем служит то же количество взвеси тест-штамма, внесенное в питательную среду. Посевы инкубируют в течение 24 часов при температуре (37±1) °С. Перед культивированием и после него из образцов делают ряд предельных разведений, далее разведения рассеивают на селективные среды и снова инкубируют, после этого ведут подсчет количества выросших клеток. Сравнивая показатели чистого тест-штамма и смешанной культуры судят об антагонистической активности.

При определении антагонистической активности методом штрихов на чашке Петри с мясопептонным агаром делают бактериологической петлей поверхностный посев штрихом тест-штамма. На этой же чашке Петри перпендикулярно посеву бактериологической петлей наносят штрихи изучаемых культур вплоть до пересечения с уже имеющимся посевом. Затем ведут термостатирование в течение 24 часов при температуре (37±1) °С. Об антагонистической активности культур судят по размеру образовавшихся при пересечении штрихов зон лизиса.

3. Способность к ферментации лактозы или лактозосбраживающую активность молочнокислых бактерий определяют по их кислотообразующей активности в молоке путём вычисления образовавшейся в процессе сквашивания молочной кислоты. Для этого в молоко вносят 5 % исследуемой культуры и термостатируют при оптимальной температуре до образования сгустка, при этом определяют титруемую кислотность молока непосредственно после внесения молочнокислых бактерий и после образования сгустка.

При молочнокислом брожении из молекулы лактозы образуется 4 моля молочной кислоты:



342 г

18 г

360 г

Количество образовавшейся молочной кислоты экспериментально определяют по нарастанию титруемой кислотности молока из расчёта, что 1 °Т соответствует 1 см³ 0,1н раствора щёлочи или 1 см³ 0,1н раствора молочной кислоты. Таким образом, 1 °Т соответствует:

$$\frac{90}{10 \times 100} = 0,09 \text{ г молочной кислоты.}$$

При этом количество сброженной лактозы определяли по формуле:

$$Л = \frac{342 \times 0,09 \times (K_2 - K_1)}{360},$$

где Л - количество сброженной лактозы, г;

K₁ - начальная кислотность заквашенного молока, °Т;

K₂ - кислотность сгустка после сквашивания, °Т;

0,09 - количество молочной кислоты, соответствующее 1 °Т, г;

342 - молекулярный вес лактозы;

360 - молекулярный вес четырёх молекул молочной кислоты.

По полученным результатам вычисляют показатель — индекс лактозосбраживающей активности (Ил) по формуле:

$$Ил = \frac{Л}{Л_{\max}},$$

где Л — количество лактозы, сброженной конкретным штаммом, г;

Л_{max} — максимальное из выборки количество сброженной лактозы, г.

Порядок оформления работы.

Студент записывает в тетради объекты и методы исследования, используемые при изучении пробиотических свойств культур. Результаты, полученные в ходе изучения технологических свойств, отражает в виде таблицы.

Результаты определения устойчивости штаммов к антибиотикам заносит в таблицы. В одной таблице указывает наименование используемых антибиотиков и их концентрации, а в другой – полученные результаты.

Результаты изучения антагонистической активности представляет в виде таблицы и диаграмм, построенных по полученным данным.

Вопросы для самопроверки:

1. Назовите наиболее распространенные методы определения антибиотикоустойчивости культур. В чем сущность и особенности этих методов?

2. Назовите последовательность определения антагонистической активности методом развития в смешанных популяциях. С какой целью определяют это свойство у микроорганизмов?

3. Чем отличается антибиотическая активность от антагонистической? Расскажите о порядке определения антибиотической активности.

4. Какова последовательность выявления антибиотикоустойчивости штаммов на плотных питательных средах? Какие меры предосторожности следует соблюдать при определении антибиотикоустойчивости и антагонистической активности?

5. В чем сущность методов определения способности штаммов бактерий к ферментации лактозы? Какова последовательность этапов подготовки и определения данной способности у микроорганизмов?

Практическая работа 6 Изучение методов выявления и этапов проведения мониторинга бактериофагов по ходу технологических процессов кисломолочных продуктов и сыров

Содержание работы. Изучение методов выявления бактериофагов в молоке, закваске, нормализованной смеси, готовом продукте, сыворотке, воздухе, смывов с оборудования. Знакомство с последовательностью подготовки и проведения мониторинга бактериофагов по ходу технологических процессов кисломолочных продуктов и сыров.

Приборы и материалы. Термостаты; микроскопы; водяная баня; анализатор потенциометрический для контроля pH; электрическая плитка; спиртовки; шпатель Дригальского; петли бактериологические; лабораторная стерильная посуда: пипетки, чашки Петри, колбы, бутылочки, пробирки, стеклянные воронки, репликатор; фильтры Зейтца или «milipore», стерильные питательные среды: физиологический раствор; обезжиренное молоко в пробирках; гидролизованное (разбавленное) молоко в пробирках; гидролизованное (разбавленное) молоко с 1,5 % агара или МРС-среда; спирт; молочная или серная кислота; фильтровальная бумага; хлороформ; реактивы для определения титруемой кислотности; тест-культура для выявления бактериофагов лактококков, иммерсионное масло, вата, марля.

Исходный посевной материал: штаммы лактококков и термофильного молочнокислого стрептококка; закваски; сыворотка из-под творога или сыра; смывы с оборудования; сырое молоко; кисломолочные продукты.

Методы исследования. Для выявления бактериофагов применяют косвенные и прямые методы. Прямой метод изложен в «технологической инструкции по приготовлению и применению заквасок для кисломолочных продуктов»[5].

Косвенные методы выявления бактериофагов. Косвенными методами выявления фаголизиса на предприятии могут служить: увеличение продолжительности свертывания молока, низкая титруемая кислотность в конечный пе-

риод сквашивания заквасок или продукта; невыраженный вкус закваски или продукта (снижение газо- и ароматообразования); торможение или отсутствие нарастания кислотности сыворотки при получении и обработке зерна, формировании сырной массы, высокий уровень рН сыра после прессования и в первые 3 – 5 суток созревания.

Одним из распространенных косвенных методов выявления фагов в закваске или заквашенной смеси является микроскопирование мазков, приготовленных из образцов. В случае наличия фагов в образце при микроскопировании окрашенных препаратов обнаруживаются агглютинация (склеивание) клеток и неестественно утолщенные или вытянутые клетки.

Прямые методы выявления бактериофагов. В момент лизиса бактерий под влиянием бактериофага резко изменяется окислительно-восстановительный потенциал. На этом свойстве основан метод обнаружения бактериофага в молоке, предложенный Д. А. Яковлевым. Данный метод предназначен для выявления бактериофагов в заквасках и заквашенной смеси. Сущность метода состоит в том, что в пастеризованное молоко, охлажденное до оптимальной температуры развития исследуемой закваски, вносят рабочий раствор метиленового голубого до получения светло-голубого окрашивания молока, затем вносят 5 % закваски, перемешивают и ставят в термостат. Пробу выдерживают в термостате при температуре оптимальной для развития микрофлоры изучаемой закваски, и наблюдают за изменением цвета молока через каждые 15 мин. (в течение 3 – 6 часов). Если молоко обесцвечивается (приобретает белый цвет), а затем в момент лизиса культуры, под действие бактериофага, молоко вновь синеет, то закваска чувствительна к фагам и ее нельзя использовать на производстве.

Более чувствительным методом выявления фагов в различных образцах является метод, основанный на способности фага лизировать клетки чувствительных бактерий на плотной среде (гидролизованном молоке с агаром).

Для обнаружения фагов молочнокислых бактерий исследуемый образец, подготовленный определенным образом, наносят на поверхность агара с гидро-

лизованным молоком, на который предварительно нанесена индикаторная тест-культура (чувствительная) в фазе логарифмического роста. Затем чашки термостатируют при температуре 30 °С в течение 17 – 18 ч (при изучении мезофильных культур) или при температуре 37 °С в течение 4 – 6 ч (при изучении термофильных культур), после чего отмечают наличие или отсутствие зон лизиса в месте нанесения исследуемого образца. Если в образце имеются бактериофаги, то на месте нанесения исследуемого фильтрата появляется большая зона лизиса (прозрачная зона) индикаторной нелизогенной культуры или отдельные негативные (прозрачные) колонии.

Каждый студент получает задание от преподавателя изобразить схему технологического процесса производства кисломолочного продукта или сыра с указанием контрольных критических точек, в которых наиболее часто могут выявляться фаги и нарушать процесс ферментации.

Порядок выполнения работы. Каждая группа студентов получает исследуемые образцы, в которых следует определить наличие бактериофага. Изучить косвенные и прямые методы, которые используют для выявления фагов в полученных образцах.

Порядок оформления работы.

Записать в тетради объекты и изучаемые методы выявления бактериофагов. Результаты изучения образцов на наличие бактериофагов следует отразить в виде таблицы. Каждый студент самостоятельно приводит схему технологического процесса производства молочного продукта (в соответствии с заданием преподавателя) в аппаратурном изображении, на которой указывает точки возможного проявления действия бактериофагов.

Вопросы для самопроверки:

1. Почему необходимо осуществлять мониторинг бактериофагов по ходу технологических процессов выработки кисломолочных продуктов и сыров? Назовите методы, используемые для обнаружения бактериофагов.

2. В чем сущность прямых методов выявления бактериофагов? Какова последовательность определения бактериофагов в заквасках и заквашенной смеси методом Яковлева?

3. Как осуществляется пробоподготовка для выявления бактериофагов в сыром и пастеризованном молоке, заквашенной смеси, готовом кисломолочном продукте чашечным методом?

4. Какова последовательность обнаружения бактериофагов в смывах с оборудования, воздухе, сыворотке?

5. В каких контрольных критических точках чаще всего следует контролировать наличие фагов по ходу технологии кисломолочных продуктов и производства сыров?

Лабораторная работа 7. Изучение способов активизации, применения бактериальных концентратов и заквасок;

освоение методов их контроля

Содержание работы. Изучение способов активизации и применения лиофилизированных культур, сухих бактериальных концентратов, а также сухих и жидких заквасок (традиционного и прямого внесения). Освоение методов контроля бактериальных концентратов и заквасок.

Приборы и материалы. Термостаты; микроскопы; спиртовки; петли бактериологические; анализатор потенциометрический для контроля pH; установка для титрования, предметные стекла; лабораторная стерильная посуда: пипетки, колбы, стаканчики, пробирки; стерильные питательные среды: обезжиренное молоко в пробирках, бутылочках и колбах; специальные питательные среды для бифидобактерий, пропионовокислых бактерий, лактозосбраживающих дрожжей; реактивы для определения титруемой кислотности, краски для окрашивания препаратов, этиловый спирт, иммерсионное масло, вата, марля.

Сухие бактериальные концентраты и закваски, включая DVS.

Методы исследования. Закваски и бактериальные концентраты, получаемые в сухом или жидком виде из специализированных цехов или лабораторий, следует использовать в течение их срока годности при соблюдении условий хранения. Замороженные закваски и бактериальные концентраты хранят в морозильных камерах при отрицательных температурах, обеспечивающих их сохранение в замороженном виде. Сухие бактериальные закваски и бактериальные концентраты хранят до использования при температуре от 0 до – 10 °С в течение срока годности, указанного на этикетке.

Не допускается использование сухой бактериальной закваски и бактериального концентрата, полученных от специализированных цехов и лабораторий, с просроченным сроком годности.

Способы восстановления сухой бактериальной закваски и сухого бактериального концентрата изложены в «Технологической инструкции по

приготовлению и применению заквасок для кисломолочных продуктов» [5] и НД на производство конкретных видов сыров.

Общую подготовку к восстановлению (активизации) бактериальных заквасок и бактериальных концентратов осуществляют в следующей последовательности. Перед внесением в питательную среду бактериальной закваски и бактериального концентрата проверяют целостность упаковки, включая укупорку флакона. Если при осмотре обнаружено нарушение целостности упаковки или герметичности, трещина в стекле или плохая укупорка, данную упаковку с бактериальной закваской или бактериальным концентратом выбраковывают.

Флаконы с сухими культурами открывают следующим образом: край флакона обжигают над пламенем спиртовки, вынимают пробку и сухую биомассу во флаконе растворяют в 6 – 7 см³ стерильного молока, воды или физиологического раствора. Растворенную порцию переносят над пламенем спиртовки в стерильное молоко.

Флаконы с жидкими культурами открывают следующим образом: пробку флакона или пробирки проводят над пламенем спиртовки и быстро вынимают, открытый край флакона еще раз проводят над пламенем, после чего содержимое флакона выливают в подготовленное стерильное молоко или из флакона (пробирки) стерильной пипеткой отбирают необходимое для заквашивания количество биомассы и над пламенем спиртовки переносят ее в подготовленное стерильное молоко. Объем молока, в которое вносят традиционную закваску или бактериальный концентрат, зависит от их вида. Например, при активизации отечественных заквасок, состоящих из лактококков, 1 порцию вносят в 2 дм³ молока; заквасок, состоящих из термофильных молочнокислых стрептококков или палочек, а также симбиотических заквасок – в 100 см³ стерильного молока.

После внесения биомассы молоко тщательно перемешивают и помещают в термостат при оптимальной температуре сквашивания. В случае активизации заквасок емкость с молоком и закваской выдерживают в термостате до образования сгустка. При активизации бактериальных концентратов емкость с

молоком и концентратом выдерживают в термостате в течение 2 - 4 часов до достижения титруемой кислотности 28-35 °Т в зависимости от видового состава заквасочной микрофлоры.

Сухую закваску бифидобактерий восстанавливают на специальных для них средах (кукурузно-лактозной среде – КЛС, ГМК-1). Из пробирки с 10 см³ стерильной питательной среды стерильной пипеткой отбирают 5 см³ среды, и соблюдая правила асептики, вносят во флакон с сухим бактериальным концентратом или с сухой бактериальной закваской. Тщательно перемешивают до полного растворения сухой биомассы, после чего суспензию переносят обратно в пробирку с оставшейся питательной средой, тщательно перемешивают и делают ряд последовательных разведений. Для этого 1 см³ суспензии стерильной пипеткой переносят во вторую пробирку со стерильной питательной средой и т.д. до четвертой пробирки. Засеянную культуру в пробирках культивируют при 37±2 °С в течение 24 – 48 часов до образования выраженной мути (на поверхности среды роста быть не должно). Из каждого разведения готовят препарат и просматривают его под микроскопом.

Существует несколько способов применения бактериальных заквасок и бактериальных концентратов.

Традиционные закваски. В настоящее время закваски в жидком виде практически не применяются, так как они имеют очень короткий срок годности (не более 7 суток). Закваски молочнокислых бактерий реализуются в пробирках или бутылочках. Закваски в жидком виде на предприятии хранят при температуре 2 – 6 °С не более 1 суток после чего перевивают в свежую питательную среду, культивируют при оптимальной температуре развития, затем контролируют и только после этого используют в качестве лабораторной закваски. Для определения количества необходимой лабораторной, пересадочной и производственной закваски следует знать объемы получаемого продукта с использованием конкретного вида закваски. Типовая схема получения производственной закваски следующая:

Лабораторная закваска  пересадочная (в бидонах или ушатах)

⇒ производственная ⇒ продукт.

Сухие закваски восстанавливают в соответствии с «Технологической инструкцией по приготовлению и применению заквасок для кисломолочных продуктов» или НД на производство конкретных сыров. Пакеты или флаконы вскрывают в асептических условиях (в пламени спиртовки), переносят в питательные среды с соблюдением условий асептики, затем термостатируют в требуемом объеме обезжиренного молока или питательной среды до образования сгустка или плотной мути (для бифидобактерий). Далее закваску контролируют и используют ее в качестве лабораторной:

пакет (или флакон) ⇒ емкость со стерильной средой (в термостате)
⇒ лабораторная закваска.

Дальнейшая схема применения такая же, как при использовании жидкой закваски.

Закваски прямого внесения. Замороженные закваски прямого внесения вносят либо с предварительным оттаиванием, либо без него. Без предварительного оттаивания закваску вносят непосредственно в емкость для получения продукта, где уже внесено небольшое количество нормализованной смеси с оптимальной температурой развития, затем при перемешивании подаются закваска и остальное молоко.

Оттаивание закваски производят в стерильном контейнере на водяной бане при температуре 25 – 30 °С, после оттаивания закваску вносят непосредственно в молоко. Последовательность внесения такая же, как и закваски без оттаивания.

Сухие закваски прямого внесения вносят непосредственно в наполняющую молоком емкость в конкретный рекомендуемый для данного вида закваски объем молока:

пакет (или флакон) ⇒ емкость для заквашивания продукта.

Бактериальные концентраты. Инструкции по порядку применения отечественных бакконцентратов предусматривают два способа: использование бакконцентрата без активизации, использование бакконцентрата с активизацией.

Без активизации бакконцентрат вносится сразу в емкость, в которую одновременно подается нормализованная смесь с оптимальной температурой, при этом все тщательно перемешивается. Предварительно бакконцентрат растворяют в небольшом количестве стерильного молока, или стерильного раствора, или воды. После полного заполнения емкости еще раз проводят перемешивание для равномерного распределения биомассы бакконцентрата.

При активизации бакконцентрата его вносят в стерильное молоко с оптимальной температурой для микрофлоры бакконцентрата. Затем биомассу термостатируют при той же оптимальной температуре до кислотности 28 – 35 °Т. Активизированный концентрат используют для приготовления производственной закваски или непосредственного получения продукта. Активизация:

пакет (или флакон) $\Rightarrow$ стерильное молоко $\Rightarrow$ емкость для заквашивания продукта.

Методы контроля заквасок.

На предприятии осуществляют три типа контроля заквасок:

- входной – после получения партии заквасок бакконцентратов и их активизации;
- технологический – по ходу выработки производственной закваски;
- приемочный – контроль готовой закваски.

Закваски контролируют по следующим показателям:

- микроскопическому препарату;
- активности сквашивания;
- динамике изменения кислотности (как активной, так и титруемой);
- органолептическим показателям, включая ароматообразование;
- наличию посторонней микрофлоры: БГКП, дрожжей и плесневых грибов, споровых бактерий.

Порядок выполнения работы. Каждый студент получает образец бактериальной закваски или бактериального концентрата, который восстанавливает в стерильном молоке или в стерильной питательной среде. Студент изучает

способы активизации сухих или жидких бактериальной закваски и бактериального концентрата.

Порядок оформления работы.

Студент записывает в тетради объекты и методы исследования, используемые при освоении способов активизации бактериальных концентратов и заквасок. Результаты, полученные в ходе работы, отражает в записях.

Вопросы для самопроверки:

1. Какие требования предъявляются к качеству молока, используемого для получения лабораторной и производственной заквасок?
2. Расскажите о порядке восстановления сухих заквасок и бактериальных концентратов. В чем главное отличие процесса активизации заквасок и бактериальных концентратов?
3. Какова последовательность выработки производственной закваски, начиная от жидкой и сухой форм применяемых заквасок?
4. В чем особенности и преимущества применения замороженных и сухих заквасок прямого внесения?
5. Назовите виды контроля заквасок. По каким показателям осуществляется контроль заквасок?

Практическая работа 8 Изучение и освоение методов микробиологического контроля по ходу осуществления технологических процессов, а также готовых молочных продуктов

Содержание работы. Изучение последовательности проведения микробиологического контроля по ходу технологических процессов и готовых молочных продуктов. Освоение методов: выявления в продуктах бактерий группы кишечных палочек (БГКП); определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ); определения дрожжей и плесеней; определения промышленной стерильности. Знакомство с методами определения патогенных микроорганизмов, в том числе сальмонелл, *Staphilococcus. aureus* и листерий (*L.monocytogenes*).

Приборы и материалы. Термостаты; микроскопы; водяная баня; весы; спиртовки; стерильные: пипетки, чашки Петри, колбы, бутылочки, пробирки; обратные пробирки (поплавки); предметные стекла; скальпель; шпатели; ложки; ступки с пестиками; стерильные питательные среды: среда Кесслер, среда для определения КМАФАнМ, физиологический раствор, среда для определения дрожжей и плесеней, среда для определения молочнокислых бактерий и бифидобактерий, этиловый спирт, иммерсионное масло, вата. Пастеризованное молоко и сливки, кисломолочные продукты, масло, сыры, творог, молочные консервы, мороженое.

Методы исследования. Микробиологические показатели молочных продуктов нормируются СанПиН 2.3.2.1078–01, в котором имеется и перечень методов исследований. Отбор проб и подготовку их к анализу проводят в соответствии с СанПиН 2.3.2.1078–01 по ГОСТ 26668–85, ГОСТ 26809–86, ГОСТ 13928–84, ГОСТ 9225–84. Микробиологические исследования проводят в соответствии с ГОСТ 51446–99 (ИСО 7218–96) «Продукты пищевые. Общие правила микробиологических исследований». Выявление и определение бактерий группы кишечных палочек проводят по ГОСТ 30726–01 «Продукты пищевые.

Выявление и определение количества бактерий вида *Escherichia coli*», КМА-ФАнМ проводят методом предельных разведений по ГОСТ 10444.15–94. Определение молочнокислых бактерий и бифидобактерий осуществляют по ГОСТ Р 51331–99 «Продукты молочные. Йогурты. Общие технические условия» и в соответствии с методическими указаниями МУК 4.2.999–00 «Определение количества бифидобактерий в кисломолочных продуктах», ГОСТ 10444.11–89 «Продукты пищевые. Методы определения молочнокислых микроорганизмов». Определение дрожжей и плесневых грибов проводят по ГОСТ 10444.12–88.

Стерилизованное молоко и сливки контролируют на промышленную стерильность в соответствии с ГОСТ 30425–97 «Консервы. Метод определения промышленной стерильности».

Порядок выполнения работы. Студент получает образец молочного продукта, из которого отбирает пробу и исследует ее по микробиологическим показателям, в соответствии с нормативной документацией на данный вид продукта.

Порядок оформления работы.

Студент записывает в тетради объекты и методы исследований, используемые при микробиологическом контроле технологического процесса производства и готовых молочных продуктов. По полученным данным делает вывод об эффективности тепловой обработки сырья и соответствии показателей безопасности продукта требованиям СанПиН 2.3.2.1078–01. Студент самостоятельно приводит схему технологического процесса производства молочного продукта (в соответствии с заданием преподавателя) в аппаратурном исполнении, на которой указывает точки микробиологического контроля.

Вопросы для самопроверки:

1. Перечислите, какие микробиологические показатели и в соответствии с какими документами нормируются и должны контролироваться в молочных продуктах.

2. Каким методом и в соответствии с каким документом выявляются БГКП в молочных продуктах?

3. Расскажите, как проводится определение количества КМАФАнМ и промышленной стерильности в молочных продуктах. По каким микробиологическим показателям определяется эффективность пастеризации молока?

4. Назовите источники и методы определения дрожжей и плесневых грибов в кисломолочных продуктах, в том числе сметане, твороге, молочных консервах, сырах плавленых.

5. Чем характеризуются лечебно-профилактические и пробиотические свойства молочных продуктов? Какие при этом микроорганизмы и какими методами должны определяться?

Практическая работа 9 Изучение методов контроля санитарно-гигиенического состояния производства молочных продуктов

Содержание работы. Изучение методов микробиологического контроля санитарно-гигиенического состояния производства молочных продуктов. Освоение методов взятия смывов с рук, санодежды и оборудования; контроль чистоты воздуха; контроль воды.

Приборы и материалы. Термостаты; водяная баня; электрическая плитка; спиртовки; лабораторная стерильная посуда: пипетки, чашки Петри, колбы, бутылочки, пробирки; стерильные тампоны, пинцеты; стерильные питательные среды: среда Кесслер, среда для определения КМАФАнМ, среда для определения дрожжей и плесневых грибов, среда Эндо, физиологический раствор, этиловый спирт, вата, марля.

Методы исследования. Контроль санитарно-гигиенического состояния производства производят в соответствии с методами, изложенными в «Инструкции по микробиологическому контролю производства на предприятиях молочной промышленности» и «Санитарных правилах и нормах. Производство молока и молочных продуктов. СанПиН 2.3.4.551–96». Отбор проб и подготовку их к анализу проводят в соответствии с СанПиН 2.3.2.1078–01 по ГОСТ 9225–84. Посевы воздуха ведут седиментационным методом.

Порядок выполнения работы. Студент делает смывы с рабочих поверхностей оборудования, с рук, халата; контролирует воздух и засекает на специализированные среды. В смывах определяют КМАФАнМ в расчете на единицу площади поверхности, с которой взят смыв, а также определяют отсутствие БГКП на 100 см² поверхности оборудования или инвентаря.

Смывы берут пинцетом со стерильным ватным или марлевым тампоном; или стерильным тампоном, закрепленным на проволоке в пробке пробирок. Тампон увлажняют в пробирке, содержащей 5 см³ стерильного физиологического раствора хлорида натрия или пептоно-солевого раствора, приготовленно-

го по ГОСТ 26972 – 86. Увлажненным тампоном протирают 100 см² поверхности (стерильный трафарет из металла 10х10 см) различных участков молочных цистерн, фляг, ванн для заквасок и производства творога, вакуум-аппаратов, вакуум-кристаллизаторов, транспортеров у автоматов для розлива, разливно-закаточных машин, деревянного оборудования, стола в боксе и т.п. (т.е. оборудования, имеющего достаточно открытые внутренние поверхности). После взятия смыва тампон вновь погружают в пробирку с физиологическим раствором.

После энергичного встряхивания отбирают из смыва 1 см³ физиологического раствора хлорида натрия в чашку Петри, заливают 12 см³ питательного агара, приготовленного по ГОСТ 9225 – 84 и остуженного до 45 °С, размешивая вращательными движениями, охлаждают до застывания агара, после чего чашки, перевернутые крышками вниз, инкубируют при температуре 30 °С. Через 72 часа подсчитывают все выросшие колонии.

При нормальном санитарно-гигиеническом состоянии предприятия в смывах количество колониеобразующих единиц не должно превышать 100 КОЕ/см³.

КМАФАнМ на 1 см² поверхности оборудования и инвентаря рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 5 \cdot 10}{100 \cdot B},$$

где X – количество колоний (КОЕ) на 1 см² поверхности оборудования и инвентаря;

A – количество колоний (КОЕ), выросших на чашке Петри;

5 – количество изотонического раствора хлорида натрия;

10 – коэффициент, учитывающий разведение;

100 – площадь, с которой взяли смыв;

B – количество посевного материала, внесенного в чашку Петри (1 см³ или 0,1 см³).

Оставшийся физиологический раствор вместе с тампоном засевают в пробирки с 10 см³ среды Кесслер с поплавком, инкубируют при температуре 37

°С от 18 до 24 часов. Отсутствие газа в поплавке свидетельствует об отсутствии бактерий группы кишечных палочек.

При нормальном санитарно-гигиеническом состоянии предприятия бактерии группы кишечных палочек (колиформы) в смывах не обнаруживаются.

Только в тех случаях, когда проводят анализ на содержание бактерий группы кишечных палочек, допускается в подготавливаемые для смывов пробирки с тампоном вносить 5 см³ среды Кесслер и поплавок. Тампон увлажняют при взятии смыва средой Кесслер и протирают им исследуемую поверхность, погружают его в пробирку и инкубируют от 18 до 24 ч при температуре 37 °С.

Отсутствие газа в поплавке свидетельствует об отсутствии бактерий группы кишечных палочек в смыве. В случае присутствия газа в поплавке проводят посев на чашку со средой Эндо, термостатируют при температуре 37±1 °С в течение 24 ч, после чего учитывают результаты.

Смывы с санитарной одежды проводят аналогично смывом с оборудования.

Анализ чистоты рук проводят перед началом производственного процесса. Пред анализом стерильный тампон смачивают стерильным изотоническим раствором хлорида натрия. Затем тампоном обтирают обе руки, проводя не менее 5 раз по каждой ладони, пальцы, межпальцевые пространства и особенно ногтевые ложа у каждого проверяемого лица. Далее анализ продолжают как и в случае контроля смывов с оборудования.

КМАФАнМ на обе руки работающего рассчитывают по формуле:

$$X=A \cdot 5 \cdot 10 / B ,$$

где А – количество колоний, выросшее на чашке Петри;

В – количество посевного материала (1 см³ или 0,1 см³);

5 – количество изотонического раствора хлорида натрия;

10 – коэффициент, учитывающий разведение.

Контроль воздуха студент проводит в следующей последовательности. Чашки с различными плотными средами, используемыми для определения КМАФАнМ, дрожжей и плесневых грибов, оставляют открытыми в месте кон-

троля на 10 мин. После чего чашки закрывают и термостатируют при температуре 30 ± 1 °С в течение 24 часов. Затем проводят учет результатов путем подсчета выросших колоний. Результаты исследований вносят в тетрадь.

При контроле воды определяют ее на соответствие по микробиологическим показателям требованиям СанПиН 2.1.4.1074–01 определение соответствия воды требованиям СанПиН проводят по МУК 4.2.1018–01 Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды

Порядок оформления работы. Студент записывает в тетради объекты и методы исследований, используемые при оценке санитарно-гигиенического состояния производства. По полученным данным оценивает эффективность мойки и дезинфекции оборудования, рук и воздуха помещений.

Вопросы для самопроверки:

1. Как проводят отбор смывов с оборудования, инвентаря? Какие микробиологические показатели в них определяют и почему?
2. Каким образом осуществляют контроль чистоты воздуха? Как чистота воздуха влияет на качество продуктов?
3. Расскажите о целях проведения контроля санитарно-гигиенического состояния производства и его периодичности.
4. В чем отличие мойки оборудования от его дезинфекции? Назовите косвенные и прямые методы определения эффективности мойки и дезинфекции оборудования.
5. Опишите методы, которые используются для определения БГКП и КМАФАнМ в смывах с оборудования, инвентаря. С какой целью контролируется вода на предприятиях молочной промышленности?

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК:

Основной

1. Степаненко П.П. Микробиология молока и молочных продуктов: Учебник для вузов. – Сергиев Посад: ООО «Все для Вас – Подмоскowie», 1999. – 415 с.
2. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы СанПиН 2.3.2.1078-01. – М.: ФГУП «ИнтерСЭН», 2002. – 168 с.
3. Технологическая инструкция по приготовлению и применению заквасок для кисломолочных продуктов. – М., 1992. – 72 с.

Дополнительный

1. Королева Н.С., Семенихина В.Ф. Санитарная микробиология молока и молочных продуктов. – М.: Пищевая промышленность, 1980. – 256 с.
2. Производство молока и молочных продуктов: Санитарные правила и нормы 2.3.4.551-96. – М.: Информационно-издательский центр Госкомсанэпиднадзора России, 1996. – 80 с.
3. Инструкция по порядку и периодичности контроля за содержанием микробиологических и химических загрязнителей в молоке и молочных продуктах на предприятиях молочной промышленности. – М., 1996. – 69 с.
4. Инструкция по микробиологическому контролю производства молочной промышленности. – М., 1988. – 122 с.
5. ТУ 10-02-02-789-65-91. Закваски бактериальные, дрожжи и тест-культуры. – М., 1991. – 37 с.

Учебно-методическое издание

Иванова Е.В., Романова Н.В.

ТЕХНИЧЕСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ
Методическое пособие

ФГБОУ ВО Смоленская ГСХА
214000 г. Смоленск, ул. Б. Советская, 10/2