

Р. Г. ГОСМАНОВ,
А. И. ИБРАГИМОВА,
А. К. ГАЛИУЛЛИН

МИКРОБИОЛОГИЯ И ИММУНОЛОГИЯ

Учебное пособие

*Издание второе,
переработанное и дополненное*



• САНКТ-ПЕТЕРБУРГ •
• МОСКВА • КРАСНОДАР •
2013

ББК 48я73

Г 72

Госманов Р. Г., Ибрагимова А. И., Галиуллин А. К.

Г 72 Микробиология и иммунология: Учебное пособие. — 2-е изд., перераб. и доп. — СПб.: Издательство «Лань», 2013. — 240 с.: ил. — (Учебники для вузов. Специальная литература).

ISBN 978-5-8114-1440-6

Учебное пособие состоит из пяти разделов. В первом разделе изложены вопросы общей микробиологии.

Второй раздел посвящен учению об инфекции и иммунитете.

В третьем разделе «Частная микробиология» описаны возбудители инфекционных болезней животных.

В четвертом разделе «Специальная микробиология» рассматриваются вопросы о микробиологии продуктов и сырья животного происхождения, кормов и навоза.

Пятый раздел «Лабораторные занятия» посвящен микробиологическим и серологическим методам диагностики инфекционных болезней животных, санитарно-микробиологическим методам исследования воздуха, воды, молока, молочных продуктов, мяса и кормов.

Учебное пособие предназначено для студентов высших учебных заведений, обучающихся по направлению подготовки «Зоотехния» (квалификация (степень) «бакалавр»).

ББК 48я73

Рецензенты:

Р. Т. МАННАПОВА — доктор биологических наук, профессор, зав. кафедрой микробиологии, паразитологии и вирусологии Башкирского государственного аграрного университета;

Я. Б. БЕЙКИН — доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедрой микробиологии и вирусологии Уральской государственной сельскохозяйственной академии.

Обложка

Е. А. ВЛАСОВА

*Охраняется законом РФ об авторском праве.
Воспроизведение всей книги или любой ее части
запрещается без письменного разрешения издателя.*

*Любые попытки нарушения закона
будут преследоваться в судебном порядке.*

© Издательство «Лань», 2013

© Р. Г. Госманов, А. И. Ибрагимова,
А. К. Галиуллин, 2013

© Издательство «Лань»,
художественное оформление, 2013

ВВЕДЕНИЕ

Микробиология и иммунология — фундаментальная биологическая наука, формирующая научное мировоззрение специалиста, помогающая анализировать сложные биологические процессы в природе, сельскохозяйственном производстве и организме животных. Цель преподавания микробиологии и иммунологии — показать многообразие микробного мира, его глобальную роль в жизни планеты, дать студентам теоретические и практические знания по микробиологическому исследованию молока и молочных продуктов, кормов, объектов внешней среды, ознакомить с возбудителями зооантропонозных инфекций.

В задачи преподавания дисциплины «Микробиология и иммунология» входит изучение принципов систематики, морфологии, строения, физиологии и экологии микроорганизмов, а также учения об инфекции и иммунитете.

В специальную микробиологию входит изучение микробиологии кормов, молока и молочных продуктов, мяса, яиц, кожевенно-мехового сырья и методов микробиологических исследований, а также ознакомление с возбудителями пищевых токсикоинфекций и токсикозов, передающихся человеку через мясные и яичные продукты, кожевенно-меховое сырье.

Освоение студентами указанной дисциплины обеспечит фундаментальные знания в области общей и сельскохозяйственной микробиологии и иммунологии, даст возможность будущему специалисту направленно регулировать

микрофлору кормов, молока и молочных продуктов; позволит грамотно применять профилактические и лечебные препараты, полученные с помощью микроорганизмов.

Настоящее учебное пособие написано в соответствии с ФГОС ВПО третьего поколения (утвержден 15.12.2010), дополнено новыми теоретическими и практическими данными для студентов высших учебных заведений, обучающихся по направлению подготовки 110401 — «Зоотехния», квалификация (степень) «бакалавр», и состоит из пяти разделов: общая микробиология, учение об инфекции и иммунитете, частная микробиология, специальная микробиология и лабораторные занятия. Издание содержит специальную терминологию.

Все критические замечания и пожелания будут приняты авторами с благодарностью.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АДФ — аденозиндифосфорная кислота
АТФ — аденозинтрифосфорная кислота
БГКП — бактерии группы кишечной палочки
ВИЭВ — Всероссийский институт экспериментальной ветеринарии
ВНИИМП — Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности
ГПС — глюкозопептонная среда
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
ЕД — единица действия
КМА — количество мезофильных аэробов
КРС — крупный рогатый скот
МАФАнМ — мезофильные факультативно-анаэробные микроорганизмы
мкм — микрометр
МПА — мясо-пептонный агар
МПБ — мясо-пептонный бульон
МПЖ — мясо-пептонный желатин
МПШБ — мясо-пептонный печеночный бульон
МППГА — мясо-пептонный печеночно-глюкозный глицириновый бульон
нм — нанометр
ОМЧ — общее микробное число
ПГА — печеночно-глюкозный глицириновый агар
ПГБ — печеночно-глюкозный глицириновый бульон
РА — реакция агглютинации
РНК — рибонуклеиновая кислота
РП — реакция преципитации
РСК — реакция связывания комплемента
СПФ — свободное от патогенных микробов животное
СРК — сульфит-редуцирующие клостридии
ЦНС — центральная нервная система
Bac. — *Bacillus*
Bact. — *Bacterium*
BCG — *Bacterium Calmett-Guerin*
Cl. — *Clostridium*
Ig — *Immunoglobulin*
Myc. — *Mycobacterium*

РАЗДЕЛ ПЕРВЫЙ

ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Т е м а 1

ПРЕДМЕТ И ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ, ЗАДАЧИ И ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ. ПРИНЦИПЫ КЛАССИФИКАЦИИ. МОРФОЛОГИЯ И СТРОЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Микробиология (от *греч.* *micros* — малый, *bios* — жизнь, *logos* — учение) — наука о жизни мельчайших, не видимых невооруженным глазом организмах, названных микроорганизмами или микробами. Их можно рассмотреть только с помощью светового или электронного микроскопа.

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

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

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

ной инженерии, начинают производить вещества, им не свойственные, но нужные человеку.

Без всякого сомнения, сельское хозяйство XXI века будет кардинальным образом отличаться от прошлого, благодаря широкому внедрению достижений биотехнологии и генной инженерии.

Микробиология включает в себя ряд самостоятельных дисциплин: общую, медицинскую, ветеринарную, промышленную, сельскохозяйственную, космическую и др. Отрасли микробиологии: бактериология, микология, вирусология и др.

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

Возникновение микробиологии как науки стало возможным после изобретения *микроскопа*. Первым, кто увидел и описал микроорганизмы, был голландский натуралист Антони ван Левенгук (1632–1723), который сконструировал микроскоп, дававший увеличение до 300 раз. Он установил наличие шаровидных, палочковидных и извитых форм микробов. Книга «Тайны природы, открытые А. Левенгуком», опубликованная в 1695 г., привлекла внимание ученых и побудила к изучению микроорганизмов.

Открытие Левенгука положило начало возникновению микробиологии. Период с конца XVII в. до середины XIX в. вошел в историю как описательный, или **морфологический**, который создал условия для перехода к **физиологическому** этапу в развитии микробиологии. Основоположник его — выдающийся ученый-химик Луи Пастер (1822–1895). Первые его работы были направлены на изучение природы брожения, он доказал, что причина брожения и гниения — микроорганизмы, вырабатывающие различные ферменты. Каждый бродильный процесс обусловлен жизнедеятельностью специфического возбудителя; гниение вызывается группой гнилостных бактерий, молочнокислый процесс — молочнокислыми бактериями и т. д.

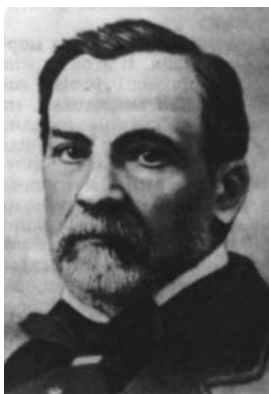
Занимаясь изучением природы заразных болезней, Пастер открыл возбудителя холеры кур, стафилококки, стреп-

тококки, установил этиологию сибирской язвы. В дальнейшем Пастер предложил методы получения вакцин против холеры кур, сибирской язвы, бешенства. С этого времени в микробиологии наступил **иммунологический** период. Работу Пастера в области иммунологии продолжили И. И. Мечников (1845–1916), Э. Беринг (1854–1917) и П. Эрлих (1854–1915).

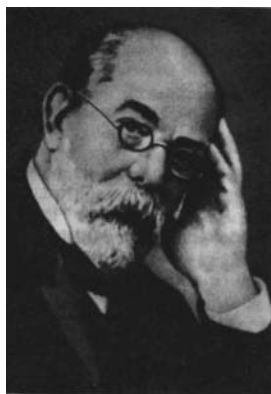
Одним из основоположников микробиологии наряду с Пастером был немецкий ученый Роберт Кох (1843–1910). Им разработаны методы микробиологических исследований, были предложены плотные питательные среды, что позволило выделять и изучать чистые культуры микробов. Он применил методы окраски микробов анилиновыми красителями, предложил для микроскопии иммерсионную систему. Кох выявил возбудителей сибирской язвы (1876), туберкулеза (1882), холеры человека (1883).

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

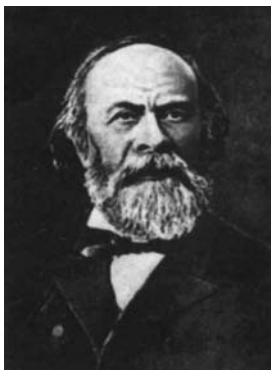
Велика заслуга в развитии микробиологии и иммунологии И. И. Мечникова (1845–1916). Он создал фагоцитарную



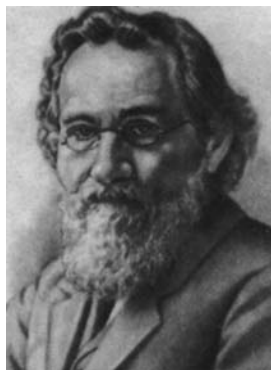
Л. Пастер (1822–1895)



Р. Кох (1843–1910)



Л. С. Ценковский
(1822–1887)



И. И. Мечников
(1845–1916)

теорию иммунитета, в основу которой положена способность клеток организма противостоять инородным телам, а также установил антагонизм между молочнокислыми и гнилостными микробами. На принципе антагонизма он обосновал теорию долголетия и предложил для этого использовать простоквашу, которая впоследствии получила название «Мечниковской».

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

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

Принципы классификации микроорганизмов. В настоящее время уже описано более 3,5 тыс. видов бактерий, и их число постоянно возрастает.

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

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

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

К международным определителям бактерий относится «Руководство по систематике бактерий» Д. Берджи, девятое издание которого вышло в 1997 г.

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

Для обозначения микроорганизмов принята двойная (бинарная) номенклатура, которая включает в себя названия рода и вида. Родовое название пишется с прописной буквы, видовое — со строчной. Например, кишечная палочка — *Escherichia coli*.

Вид — это совокупность популяций, имеющих общее происхождение и генотип, морфологические, физиологические и другие признаки и способных в определенных условиях вызывать одинаковые процессы.

Штамм — культура одного и того же вида, выделенная из разных объектов и отличающаяся незначительными изменениями свойств.

Культура — микроорганизмы, выращенные на питательных средах в условиях лаборатории.

Клон — это культура, полученная из одной клетки.

Имеются подразделения, которые основаны на отличии особей каким-либо наследственным признаком: антигенным — серовар, биохимическим — биовар, отношением к фагам — фаговар.

Морфология и строение бактериальной клетки. Величина микробов измеряется в микрометрах ($1 \text{ мкм} = 10^{-6} \text{ м}$) и нанометрах ($1 \text{ нм} = 10^{-9} \text{ м}$).

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

Кокки по форме напоминают шар (размер 0,7–1,2 мкм), но бывают овальные, односторонне вогнутые и др. В зависимости от взаимного расположения клеток после деления различают: микрококки, стафилококки, стрептококки, тетракокки и сарцины. Если деление происходит последовательно в одной плоскости и клетки соединены в виде цепочки — это стрептококки, при делении кокков в разных плоскостях образуются стафилококки и сарцины.

Палочковидные формы (размеры 1,6–10 мкм) делятся на неспоровые палочки — бактерии; палочки, образующие споры — бациллы. Палочки, у которых диаметр споры

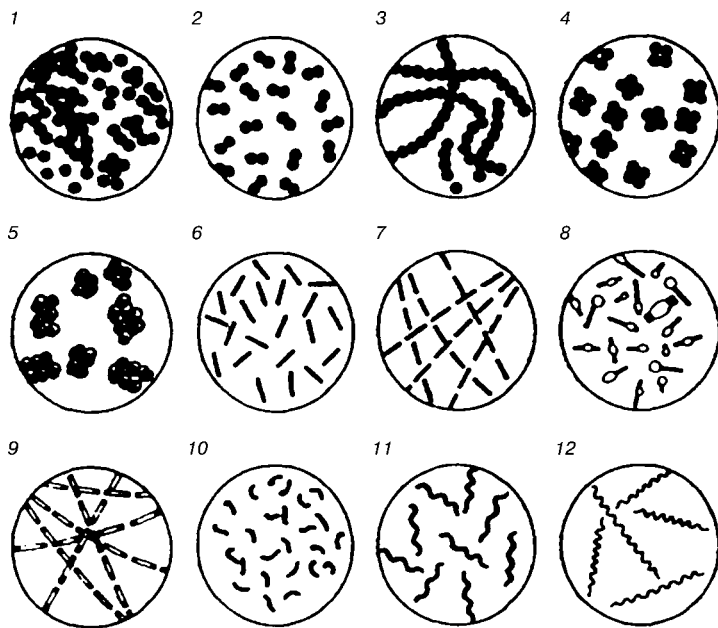


Рис. 1

Основные формы микроорганизмов (схема):

шаровидные: 1 — стафилококки, 2 — диплококки, 3 — стрептококки, 4 — тетракокки, 5 — сарцины; палочковидные: 6 — бактерии, 7 — стрептобактерии, 8 — бациллы, 9 — стрептобациллы; извитые: 10 — вибрионы, 11 — спириллы, 12 — спирохеты.

превышает ширину вегетативной клетки, принято называть кластридиями — веретенообразными.

Извитые бактерии обладают спиральной симметрией. К ним относятся: вибрионы, спириллы и спирохеты. Вибрионы напоминают по форме запятую. Спириллы образуют 3–5 крупных завитков. Спирохеты — тонкие длинные нити S- и С-образной формы с множеством микрозавитков вокруг осевой нити, которые видно только под электронным микроскопом.

Микробные клетки имеют такое же сложное строение, как и клетки животных и растений. Структурные компоненты бактериальной клетки делят на основные и временные. *Основными структурами являются:* клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана с ее производными, цитоплазма с рибосомами, различными включениями и нуклеоидом в центре клетки; *временными:* капсула, жгутики, ворсинки, эндоспores (рис. 2).

Клеточная стенка обладает ригидностью и придает микробной клетке определенную форму, толщина клеточной стенки бактерий колеблется от 0,01 до 0,04 мкм. Различные виды бактерий имеют разный химический состав, отличаются по строению клеточной стенки, которая пронизана по-

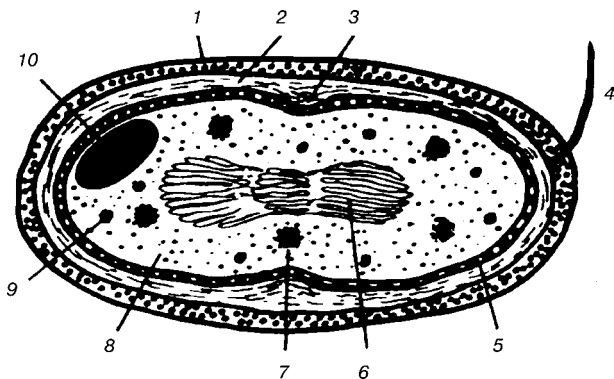


Рис. 2

Схематическое изображение строения бактериальной клетки:

- 1 — капсула; 2 — клеточная стенка; 3 — клеточная перегородка; 4 — жгутик; 5 — цитоплазматическая мембрана; 6 — нуклеоид в стадии деления; 7 — рибосомы; 8 — включения; 9 — плазмиды; 10 — спора.

рами различного диаметра, и поэтому неодинаково воспринимают окрашивание анилиновыми красками.

Отношение бактерий к различным красителям называют тинкториальными свойствами. Для дифференциации бактерий применяется метод окраски, предложенный в 1884 г. датским ученым Грамом. По отношению бактерий к этой окраске все бактерии разделены на две группы — грамтрицательные и грамположительные.

При окрашивании бактерий по Граму генцианом фиолетовым в присутствии ионов йода с компонентами клетки образуется прочный комплекс, который при действии на него этиловым спиртом не вымывается через узкие поры и бактерии остаются фиолетовыми. Грамтрицательные бактерии не образуют прочный комплекс, поэтому краситель под действием спирта вымывается через широкие поры и бактерии обесцвечиваются, их дополнительно окрашивают. В результате грамположительные микробы окрашиваются в цвет основного красителя (фиолетовый), а грамтрицательные — принимают красный цвет дополнительного красителя (фуксина).

Цитоплазматическая мембрана (ЦПМ) отделяет цитоплазму от клеточной стенки, обладает избирательной проницаемостью и играет роль осмотического барьера. Разрушение ЦПМ приводит к гибели микробной клетки.

Мезосомы представляют собой локальные выпячивания ЦПМ, функционально они эквивалентны митохондриям, участвуют в окислительно-восстановительных реакциях и снабжают клетку энергией.

Цитоплазма представляет собой сложную коллоидную систему, в ней находятся рибосомы (место синтеза белка), внутриклеточные включения (полисахариды, липиды, полифосфаты) различного химического состава и назначения.

Нуклеоид, расположенный в центре клетки, представляет собой двойную нить ДНК, свернутую в кольцо. Вся генетическая информация прокариот содержится в одной молекуле ДНК, длина молекулы в развернутом виде может составлять более 1 мм, т. е. почти в 1000 раз превышать длину бактериальной клетки. В период интенсивного деления в клетках можно обнаружить несколько нуклеоидов.

Особенности морфологии и строения других групп микроорганизмов. Актиномицеты (лучистые грибы; от лат. *actis* — луч, *myces* — гриб) — одноклеточные грамположительные микроорганизмы, внешне сходные с мицелиальными грибами. Их тело (мицелий) состоит из тонких и длинных гиф-нитей, способных к истинному ветвлению; гифы могут быть прямыми или спиралевидными. На плотных средах актиномицеты образуют субстратный, растущий в среду, и воздушный мицелий. Кроме мицелиальных встречаются палочковидные и кокковидные формы. Строение актиномицетов аналогично строению грамположительных бактерий, клеточная стенка содержит пептидогликан и не имеет, как у грибов, хитина и целлюлозы. Размножаются при помощи спор (конидий); из отдельных ветвей зрелых гиф воздушного мицелия образуются спораносцы, которые в результате фрагментации или сегментации превращаются в споры. В благоприятных условиях они прорастают в вегетативные клетки. Таким образом, у актиномицетов часть признаков — как у бактерий (прокариоты, сходный химический состав и строение клетки), а часть — как у микроскопических грибов (нити-гифы, специальные органы размножения спораносцы).

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

Риккетсии и хламидии. *Риккетсии* — облигатные внутриклеточные паразиты; полиморфные грамтрицательные микроорганизмы, имеющие форму коротких палочек с закругленными концами или кокков размером 0,2–0,6×0,4–2 мкм,

иногда нитей длиной 40 мкм и более. Относятся к микроорганизмам, занимающим промежуточное положение между бактериями и вирусами. Подобно вирусам, они являются внутриклеточными паразитами и не растут на искусственных питательных средах. Морфологические признаки аналогичны морфологии бактерий: клеточная стенка содержит пептидогликан, цитоплазматическая мембрана характеризуется высокой проницаемостью, имеются рибосомы, нуклеоид. Размножаются в цитоплазме, реже в ядрах пораженных клеток хозяина, поперечным делением, а нитевидные формы — дроблением.

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

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

Хламидии — облигатные внутриклеточные паразиты, возбудители инфекционных болезней животных и человека. Это особая группа микроорганизмов со сложным циклом развития: в процессе развития они проходят две стадии: инфекционного элементарного тельца и репродуктивного инициального (ретикулярного) тельца. По морфологии — округлые, диаметром до 250–350 нм, т. е. их размеры на грани разрешающей способности светового микроскопа. В условиях лаборатории хламидии культивируют на куриных эмбрионах, культурах клеток, белых мышах.

Инфекции, вызванные хламидиями, установлены у птиц (орнитоз), у крупного и мелкого рогатого скота (пневмония, полиартрит), у свиней (бронхопневмония, перикардит).

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

Они обладают выраженным полиморфизмом — от мелких сферических, эллипсоидных, кольцевидных клеток до

нитевидных, ветвящихся мицелиальных форм размером от 0,6 до 30 мкм. Основным компонентом мембраны являются стерины, в цитоплазме располагаются рибосомы и нуклеоид. В связи с отсутствием клеточной стенки микоплазмы не синтезируют пептидогликан, являются грамотрицательными, проходят через бактериальные фильтры. Микоплазмы не чувствительны к антибиотикам, угнетающим синтез клеточной стенки (например, к пенициллину). Микоплазмы можно культивировать в питательной среде, обязательно содержащей сыворотку крови лошади или крупного рогатого скота, витамины и глюкозу.

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

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

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

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

Плесневые грибы (гифомицеты)		Дрожжи (одноклеточные)
Высшие	Низшие	мицелий отсутствует, иногда образует псевдомицелий
Микомицеты многоклеточные	Фикомицеты одноклеточные	

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

У плесневых грибов различают мицелий *субстратный*, погруженный в питательную среду, и *воздушный*, возвышающийся над нею. Попадая в субстрат, гифы растут концевыми участками и ветвятся радиально. По строению мицелия плесневые грибы подразделяют на два класса.

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

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

Размножение грибов. Различают вегетативный и репродуктивный способы размножения.

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

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

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

Конидии образуются у высших грибов на специализированных ответвлениях гифов — конидиеносцах. Конидии могут быть одноклеточными и многоклеточными, различной формы, окраски и разных размеров (хорошо известно строение *Aspergillus*, *Penicillium*).

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

Грибы, способные к половому размножению, называют совершенными; грибы, у которых пока не обнаружен половой способ размножения, — несовершенными (*Deuteromycetes*). У совершенных грибов в цикле развития отмечены стадии бесполого и полового спороношения.

Особенности строения некоторых низших и высших грибов. К типичным представителям фикомицетов (низших) относят грибы рода *Mucor* (головчатая плесень). Размножаются фикомицеты вегетативно, половым путем, а также репродуктивным бесполом. От несептированного одноклеточного мицелия отходят плодоносящие гифы — спорангиеносцы с округлым спорангием на конце, внутри которого развиваются эндоспоры — спорангиеспоры. После созревания оболочка спорангий разрывается и эндоспоры попадают в окружающую среду.

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

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

Грибы рода *Aspergillus* (леечная плесень) характеризуются септированным мицелием и несептированными стоячими конидиеносцами, на вершине которых формируются расширения в виде головки. По окружности булавовидного расширения расположены стеригмы, из которых по мере созревания

ния выталкиваются цепочки конидий или экзоспоры. При микроскопии видны радиально расположенные цепочки спор, напоминающие струйки воды, вытекающие из лейки. Мицелий *Aspergillus* может быть зеленым различных оттенков или черным, например гриб *Aspergillus niger*.

У грибов рода *Fusarium* войлочный мицелий септирован, обычно окрашен в белый или розовый цвет, питательная среда под колониями имеет вишневый оттенок. На воздушном мицелии формируются макро- и микроконидии. Макроконидии веретенообразной или серповидной формы внутри имеют перегородки и состоят из нескольких крупных клеток. Микроконидии грушевидной формы чаще одноклеточные.

Грибы, для которых характерно только бесполое размножение, относятся к классу несовершенных грибов (*Fungi imperfecti*), включающему следующие роды: Альтернария (*Alternaria*), Кладоспориум (*Cladosporium*), Катенулярия (*Catenularia*), Оидиум (*Oidium*), Фома (*Phoma*).

Дрожжи — представители класса *Ascomycetes* — одноклеточные организмы круглой или овальной формы с двухконтурной оболочкой и ядром. Размножение дрожжей происходит почкованием или делением; у некоторых видов — половым путем: споры полового размножения — аскоспоры — развиваются эндогенно в сумках (асках), в которых образуется четное количество спор.

Дрожжи широко распространены в природе: почве, растениях, на поверхности плодов и ягод. Определенные штаммы *Saccharomyces cerevisiae* используют в пивоварении, виноделии, хлебопечении, при получении спирта.

В зависимости от вида дрожжей в продуктах происходит сбраживание углеводов, в ряде случаев они являются виновниками порчи продуктов и придают им прогорклый вкус. Некоторые виды дрожжей даже способны развиваться в консервированных продуктах, содержащих до 24% NaCl.

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

Вирус — мельчайший инфекционный агент, особая форма существования особой формы материи, не имеющая клеточной структуры, но обладающая инфекционностью и способностью к саморепродукции внутри живой клетки. Вирусы распространены всюду, где есть жизнь, где есть клетка. Размеры их составляют от 10 до 200 нм.

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

Контрольные вопросы

1. Каковы особенности строения прокариотной клетки?
2. Какие вы знаете морфологические формы бактерий?
3. Каковы особенности строения актиномицетов?
4. Каковы морфологические особенности риккетсий и микоплазм?
5. В чем особенности строения микроскопических грибов?

Тема 2

ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ: ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ, ПИТАНИЕ, ДЫХАНИЕ, РОСТ И РАЗМНОЖЕНИЕ

Химический состав микроорганизмов. Основная составная часть бактериальной клетки, приходящаяся на воду, — 75–85%, сухое вещество составляет 15–25%, в котором содержатся органогены и зольные элементы.

Органические вещества представлены белками, нуклеиновыми кислотами, углеводами и липидами.

Белки составляют 50–80% сухого вещества, служат основным структурным компонентом всех клеточных мембран и выполняют различные функции — каталитическую, транспортную, защитную, гормональную и др. Нуклеиновые кислоты представлены в виде РНК и ДНК. РНК преимущественно содержится в цитоплазме — в рибосомах, которые осуществляют синтез ферментов. ДНК находится в ядерном веществе бактерий — является носителем наследственности, в ее структуре закодирована генетическая информация биосинтеза белков.

Углеводы составляют 12–18% от сухого вещества, они представлены многоатомными спиртами, полисахаридами, моносахаридами. Углеводы выполняют энергетическую роль в метаболических процессах микробной клетки.

Липиды и липоиды играют роль резервных веществ, с ними связана кислотоустойчивость микобактерий, они влияют на проницаемость клеточных мембран.

Вода составляет основную часть бактериальной клетки — 75–85%. Вода находится в свободном и связанном состоянии. *Связанная* вода является структурным растворителем. *Свободная* вода служит дисперсной средой для коллоидов, растворителем для кристаллических веществ, источником водородных и гидроксильных ионов. Только с водой поступают питательные вещества и выходят продукты метаболизма.

Минеральные вещества составляют от 3 до 10% сухого вещества. Фосфор входит в состав нуклеиновых кислот, липидов, фосфолипидов. Сера содержится в аминокислотах, магний обеспечивает активность ряда ферментов, железо необходимо для осуществления процессов дыхания и энергетического обмена. Кальций, калий, натрий, кремний, хлор тоже есть в клетках. Наличие микроэлементов (молибден, кобальт, бор, марганец, цинк, медь, никель и др.) обязательно, они стимулируют процессы роста и размножения.

Питание микробов. Одно из основных свойств живого организма — обмен веществ. Он включает в себя два процесса:

1) поступление из окружающей среды питательных веществ, необходимых для синтеза составных частей микробной клетки;

2) выделение в окружающую среду продуктов жизнедеятельности. Хотя обмен веществ (метаболизм) делят на два процесса: анаболизм (ассимиляция) и катаболизм (диссимиляция), деление это условное, так как в живой клетке они взаимосвязаны и происходят одновременно.

Микробы могут получать углерод из неорганических и органических углеродсодержащих соединений, в связи с этим их делят на две большие группы: автотрофы и гетеротрофы. С учетом еще и источника энергии их делят на хемотрофы, хемоорганотрофы и фотоорганотрофы.

Автотрофы получают углерод из диоксида углерода (CO_2) воздуха и создают органическое вещество при помощи энергии, освободившейся в процессе окисления некоторых минеральных соединений, или энергии Солнца.

Фотолитотрофы обладают фотосинтезирующей способностью, так как содержат пигменты (близки к хлорофиллу).

Гетеротрофы используют углерод из готовых органических веществ живых и мертвых организмов.

Фотоорганотрофы могут развиваться как на свету, так и в темноте. Необходимую энергию они получают не только от Солнца, но и в результате окисления органических веществ.

В микробной клетке происходят сложные процессы превращения веществ. Велика роль в этих процессах ферментов — биологических катализаторов белковой природы.

Ферменты микробов делят на эндо- и экзоферменты. *Эндоферменты* прочно связаны с телом микробной клетки, осуществляют дальнейшее расщепление поступающих питательных веществ и превращение их в составные части клетки. *Экзоферменты* выделяются в окружающую среду, где производят превращение питательных веществ в более простые соединения, которые поступают через оболочку микробной клетки и служат пластическим материалом и источником энергии.

В настоящее время известно более 2000 ферментов, которые объединены в шесть классов:

- оксидоредуктазы — окислительно-восстановительные ферменты;
- трансферазы — ферменты переноса;
- гидролазы — ферменты, ускоряющие реакции гидролиза;
- лиазы — ферменты, отщепляющие от субстратов негидролитическим путем ту или иную группу;
- изомеразы — ферменты, ускоряющие перемещение внутри молекул водорода и фосфора;
- лигазы — ферменты, ускоряющие синтез сложных соединений из более простых.

Механизм метаболизма у микробов. Питательные вещества внутрь клетки проникают через всю ее поверхность разными способами:

- пассивной диффузией за счет разности концентрации питательных веществ в окружающей среде и цитоплазме;

- белками переносчиками — пермеазами;
- обменной адсорбцией — способностью электрически заряженной поверхности микробной клетки притягивать (адсорбировать) вещества с противоположным зарядом.

Труднорастворимые и крупномолекулярные органические соединения (белки, жиры, углеводы) проникают в микробную клетку после их гидролиза экзоферментами, а минеральные — при диссоциации на ионы. Поступившие в клетку вещества становятся затем источником строительного материала и энергии. Выход продуктов метаболизма из микробной клетки осуществляется с помощью пермеаз путем пассивной или облегченной диффузии.

Дыхание микробов. Дыхание микробов представляет собой биологическое окисление различных органических соединений и некоторых минеральных веществ. В итоге окислительно-восстановительных процессов образуется тепловая энергия, часть которой используется микробной клеткой, а избыток выделяется в окружающую среду. В настоящее время окисление определяют как процесс отнятия водорода (дегидрирование), а восстановление — его присоединения. Энергия, освобождаемая в процессе окислительно-восстановительных реакций, накапливается в АДФ и АТФ микробных клеток.

По типу дыхания микробы делятся на аэробов, облигатных анаэробов и факультативных анаэробов. Аэробы хорошо растут на поверхности питательной среды, которая соприкасается с воздухом. Анаэробы в жидкой среде жить не могут, поскольку они приспособлены к существованию при более низком окислительно-восстановительном потенциале.

Аэробное дыхание микробов — это процесс, при котором последним акцептором водорода является молекулярный кислород. В результате окисления сложных органических соединений образуется энергия. Различают полное и неполное окисление. Полное окисление происходит при расщеплении углеводов в аэробных условиях с образованием диоксида углерода и воды с выделением энергии. При избытке углеводов в среде образуются продукты неполного окисления, в которых заключена энергия. Например, при окислении этилового спирта образуются не диоксид углерода и вода, а уксусная кислота и вода.

Анаэробное дыхание осуществляется без участия молекулярного кислорода. Различают собственно анаэробное дыхание (нитратное, сульфатное) и брожение. При анаэробном дыхании акцептором водорода являются окисленные неорганические соединения, которые легко отдают кислород и превращаются в более восстановленные формы. Так проходят денитрификация и десульфификация. Брожение характеризуется расщеплением органических углеродсодержащих соединений в анаэробных условиях до промежуточных продуктов (спирты, органические кислоты), а образовавшаяся в небольших количествах энергия выделяется в окружающую среду. При этом акцептором водорода служит молекула органического вещества с ненасыщенными связями.

Рост и размножение микробов. В результате поступления питательных веществ и синтеза из них сложных органических соединений происходит рост — увеличение массы микробной клетки. Достигнув определенной стадии роста и зрелости, клетка начинает размножаться — увеличивать количество особей. Большинство микробов размножается путем простого деления клетки пополам (вегетативное размножение), реже путем почкования. Грибы размножаются при помощи спор, половым путем и почкованием (дрожжи).

Шаровидные формы микробов делятся в разных плоскостях, в результате чего образуются одиночные, парные клетки или расположенные в виде гроздьев, тьюков, цепочек и т. д. Палочковидные клетки делятся поперек. Сначала появляется перетяжка, а затем происходит разъединение образовавшихся клеток. Вместе с цитоплазмой в дочерние клетки переходит и нуклеоид, в котором находится ДНК спирального строения. После разрыва водородных связей образуются две нити ДНК, каждая из которых включается в состав новой клетки, где затем происходит их репликация (удвоение). Вместе с нуклеиновой кислотой передаются и наследственные признаки.

Скорость размножения микробных клеток зависит от вида микробов, возраста культуры, состава питательной среды, температуры, наличия или отсутствия кислорода воздуха и других факторов. Бактерии размножаются преимущественно простым поперечным делением. Так, у кишечной

палочки новое поколение образуется через 15–30 мин, у нитрифицирующих бактерий — через 5–10 ч, а у возбудителя туберкулеза — только через 18–24 ч.

Общую закономерность роста и размножения бактериальной популяции представляют в виде кривой (рис. 3), которая отражает зависимость логарифма живых клеток от времени.

Типичная кривая роста имеет S-образную форму и позволяет различать несколько фаз, сменяющих друг друга в определенной последовательности.

1. Исходная фаза. В это время микроорганизмы приспосабливаются к питательной среде. В микробной клетке увеличивается содержание РНК и с ее помощью происходит синтез необходимых ферментов.

2. Экспоненциальная (или логарифмическая) фаза роста. Она характеризуется максимальным увеличением числа клеток в культуре в геометрической прогрессии.

3. Стационарная фаза, или период зрелости. При этом наступает равновесие между числом вновь образовавшихся и числом погибших клеток.

4. Фаза отмирания. В этой фазе не только наблюдается уменьшение количества жизнеспособных клеток, но также появляются деградированные формы и споры. Через несколько

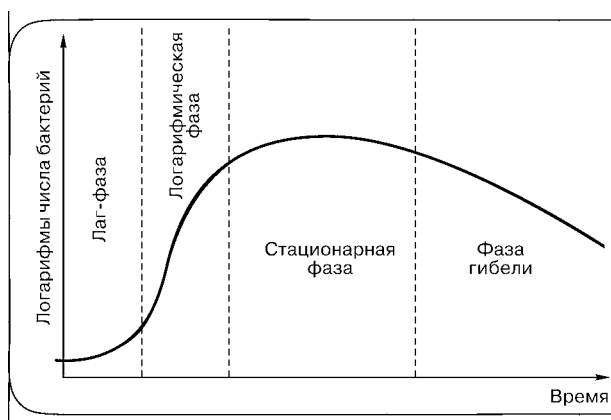


Рис. 3
Фазы роста бактерий

неделя или месяцев культура погибает. Это происходит потому, что ядовитые продукты жизнедеятельности не только тормозят, но и убивают микробные клетки. Знание этих закономерностей имеет большое значение в биотехнологии при получении большой микробной массы и при выращивании и сохранении культур на питательных средах.

Культивирование микробов проводят на питательных средах. Естественные среды, такие как молоко, пивное сусло, сенной отвар и др., могут иметь разное соотношение входящих в их состав компонентов. Искусственные среды готовят по рецептам, где количество и соотношение веществ строго определенное. Питательные среды должны содержать все вещества, необходимые для роста и развития микробов: азот, углерод, неорганические соединения в виде солей, витамины, микроэлементы и другие вещества. Среда считается оптимальной, если она имеет определенные показатели рН, окислительно-восстановительного потенциала, осмотического давления и т. д.

По консистенции различают плотные, полужидкие и жидкие питательные среды. Для выращивания определенных видов микробов применяют элективные среды.

К микробам относятся и вирусы — облигатные внутриклеточные паразиты, находящиеся на грани живой и неживой природы. Они не имеют клеточной структуры и не обладают автономными системами жизнеобеспечения (питания, дыхания, роста и размножения). Для этих целей они используют энергетические системы пораженной клетки, при взаимодействии с клеткой происходит их репродукция (воспроизведение себе подобных), которая состоит из следующих стадий: адсорбция, проникновение, депротенинизация, подавление метаболизма пораженной клетки, синтезирование вирусспецифических белков и нуклеиновых кислот, сборка и выход вирусов из клетки.

Контрольные вопросы

1. Назовите химический состав микроорганизмов.
2. На чем основана классификация микробных ферментов и их роль в физиологии?
3. Назовите типы питания микробов и раскройте их сущность.

4. Сущность дыхания микробов и классификация их по типу дыхания.
5. Перечислите способы и стадии размножения микробов.
6. Особенности строения и биологических свойств (репродукции и жизнедеятельности) вирусов.

Тема 3

НАСЛЕДСТВЕННОСТЬ И ИЗМЕНЧИВОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ

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

Наследственность неразрывно связана с другими свойствами и изменчивостью, то есть изменением специфических свойств под действием различных факторов. При этом у микробов появляются новые признаки, которые могут быть временными или постоянными, передающимися по наследству.

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

Проявление наследуемых морфологических признаков и физиологических процессов у микробов называется фенотипом. **Фенотипические** различия между микробами, одинаковыми по генотипу (постоянные свойства), называются **модификациями**. Модификации, как правило, существуют до тех пор, пока действует вызвавший их специфический фактор внешней среды, и они не наследуются.

Изменениям подвергается также генотип. В основе **генотипической** изменчивости лежат мутации и рекомбинации, которые происходят в структуре ДНК (геноме) и проявляются в изменении каких-либо свойств микробов.

Под мутацией понимают внезапные скачкообразные изменения наследственных свойств. Микробы с измененными

свойствами называются **мутантами**. Различают спонтанные (самопроизвольные) и индуцированные (направленные) мутации. **Спонтанные мутации** возникают под влиянием неизвестных причин, **индуцированные мутации** проявляются в результате обработки микробов специальными химическими веществами, физическими и другими факторами, называемыми мутагенами.

Рекомбинация — передача генетической информации от донорского микроба с одним генотипом реципиенту с другим генотипом. Эта передача осуществляется путем трансформации, трансдукции и конъюгации. В результате рекомбинации образуются микробы, обладающие свойством обоих родителей (рекомбинанты).

Трансформация — это процесс переноса участка генетического материала, содержащего одну пару нуклеотидов, от микроба-донора к микробу-реципиенту.

Трансдукция, при которой генетический материал от донора к реципиенту переносит трансдуцирующий (умеренный) фаг, не вызывающий разрушения микроба.

Конъюгация — форма полового процесса, при котором происходит непосредственное соединение двух микробных клеток и обмен между ними ядерным веществом, а в ядре, как известно, содержится ДНК. При этом генетический материал клетки-донора переходят в клетку-реципиент.

Благодаря знанию механизмов изменчивости микробов, исследователи научились перемещать генетический материал как в пределах одного генома, так и между разными геномами. Таким образом, возникает новое направление молекулярной биологии — **генная инженерия (1972)**, которая занимается конструированием, выделением и пересадкой определенных генов из одних микробных клеток в другие. В результате микробы приобретают новые свойства.

Методом генной инженерии можно решить следующие задачи:

а) генетически изменить микроорганизмы для увеличения количества вырабатываемого данным организмом необходимого продукта (антибиотиков, ферментов и др.);

б) осуществить перенос соответствующих генов млекопитающих и человека в микроорганизмы для получения спе-

цифических белков (гормонов, инсулина, интерферона, ферментов и др.).

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

Контрольные вопросы

1. Организация генетического аппарата у микроорганизмов.
2. Генетическая и фенотипическая изменчивость микроорганизмов.
3. Мутации и их разновидности.
4. Механизмы рекомбинации (трансформация, трансдукция, конъюгация) бактерий.
5. Назовите задачи, которые решает генная инженерия.

Тема 4

ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Взаимоотношениями организмов между собой и с окружающей средой занимается экология. Экология микроорганизмов исследует лишь отдельные части целостных экологических систем.

Основной единицей в экологии является экосистема. В нее входят как биотические, так и абиотические компоненты. Биотические компоненты составляют сообщество организмов, или биоценоз. Под абиотическими компонентами следует понимать физические и химические условия экосистемы, в которой живут организмы. Размеры микробных экосистем очень разнообразны. Это может быть, например, пруд, озеро и т. д. Возможны и такие малые экосистемы, как ротовая полость, рубец жвачного животного или участок кишечника. С незапамятных времен сложились сложные взаимоотношения между микроорганизмами, с одной стороны, и с высшими организмами растительного и животного царства, с другой. В настоящее время эти взаимоотношения можно представить в виде следующих форм. Тесное сожительство двух различных организмов называют симбиозом. Если говорить

об относительной пользе, извлекаемой партнерами из симбиоза, то можно выделить несколько вариантов:

1. Сожительство создает благоприятные моменты для обоих партнеров (взаимовыгодный симбиоз — мутуализм).

2. Один из партнеров по симбиозу испытывает вредное воздействие другого (в этом случае говорят о паразитизме, об антагонизме).

3. Во многих случаях партнеры могут не оказывать друг на друга никакого влияния (нейтрализм).

4. Партнерство может быть выгодно одному из организмов без оказания вредного воздействия на другого (комменсализм).

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

Из структурных частей почвы для микробиологии особый интерес представляет ее органическое вещество — *гумус*, состоящий из останков животных и растительных организмов и обитающих в почве микробов. Поверхностный слой почвы беднее микробами, так как на них вредно воздействуют факторы внешней среды: высушивание, ультрафиолетовые лучи, солнечный свет, повышенная температура и др. Наибольшее количество микроорганизмов находится на глубине 5–15 см, меньше их на глубине 20–30 и еще меньше на глубине 30–40 см. Почвы, богатые бактериями, биологически более активны. Между плодородием почвы и содержанием в ней микроорганизмов имеется определенная зависимость. Подсчеты показали, что на каждый гектар малоплодородной почвы приходится 2,5–3,0 т микробной массы, высокоплодородной — до 16 т. Число микроорганизмов в 1 г почвы может колебаться от $1-3 \cdot 10^6$ до $20-25 \cdot 10^9$.

Наиболее богаты микрофлорой возделываемые (культурные) почвы; бедны — песчаные, горные, а также почвы, лишенные растительности; количество микроорганизмов в почве увеличивается с севера на юг. Цвет и запах почвы зависят также от состава микроорганизмов. Запах почве при-

дают определенные виды актиномицетов. К типичным почвенным бактериям относятся *Bac. subtilis*, *Bac. mycoides*, *Bac. mesentericus*, *Cl. botulinum*, *Cl. Chauvoei*, а также термофильные, пигментные, непигментные и другие микроорганизмы, составляющие иногда 80–90% всей микрофлоры почвы.

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

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

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

Микрофлора воздуха. Качественный состав микрофлоры воздуха зависит от микрофлоры почвы и воды, откуда микробы вместе с пылью и капельками влаги увлекаются

в атмосферу. Воздух является неблагоприятной средой для размножения микроорганизмов. Отсутствие питательных веществ, солнечные лучи и высушивание обуславливают быструю гибель микроорганизмов в воздухе. Вследствие этого микрофлора воздуха не так обильна, как микрофлора почвы и воды.

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

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

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

Микрофлора организма животных. Животный организм после рождения вступает в контакт с различными микроорганизмами, которые проникают через дыхательные и пищеварительные пути и заселяют желудочно-кишечный тракт, половые и другие органы. Постоянными обитателями тела животных являются микроорганизмы, одни из которых составляют

облигатную микрофлору, другие находятся в организме временно, попадая из почвы, воздуха, с водой и кормом.

Микрофлора кожи. Постоянными обитателями кожи являются стафилококки, стрептококки, сарцины, актиномицеты, микрококки, которые вызывают нагноительные процессы, такие как фурункулы, флегмоны и др.

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

Микрофлора вымени. Микрофлору вымени составляют преимущественно микрококки (*M. luteus*, *M. flavus*), стафилококки, стрептококки, коринебактерии. Кожа вымени из-за наличия грубых и мелких складок — место скопления практически всех микробов, которые обитают в животноводческих помещениях, на пастбищах, в подстилке, кормах, на руках доярки и других объектах внешней среды. При недостаточно тщательной уборке и дезинфекции помещения обычно обнаруживаются более 10^5 микробов на 1 см^3 кожи вымени, в результате чего вымя может стать одним из главных источников загрязнения выдоенного молока.

Из патогенных микробов на коже вымени часто встречаются возбудители маститов (*Str. agalactiae*, *Staph. aureus*) и колимаститов (*Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Corynebacterium pyogenes*, *Bac. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*). Особое значение имеет *Str. agalactiae*, являющийся возбудителем 70–80% всех бактериальных маститов.

Микрофлора конъюнктивы. На конъюнктиве находят сравнительно небольшое количество микробов. Как правило, это стафилококки, стрептококки, сарцины, реже встречаются микоплазмы, микрококки, актиномицеты, дрожжевые и плесневые грибы.

Микрофлора дыхательных путей. У новорожденных животных в дыхательных путях микроорганизмов нет. При дыхании на слизистые оболочки верхних дыхательных путей оседают из воздуха различные бактерии, актиномицеты, плесневые и дрожжевые грибы, микоплазмы и др. Постоянными

обитателями слизистых оболочек носоглотки, зева в основном являются кокковые формы бактерий — стрептококки, стафилококки, микрококки.

Микрофлора пищеварительного канала наиболее обильна. У новорожденных животных желудочно-кишечный тракт стерилен и не содержит микробов. Через несколько часов организм животного заселяется микрофлорой, которая в процессе жизни может видоизменяться, но в основном остается стабильной до конца жизни животного. Микрофлору пищеварительного канала принято делить на ф а к у л ь т а т и в н у ю, которая может меняться в зависимости от вида корма, условий содержания и эксплуатации; и о б л и г а т н у ю, то есть обязательную, постоянную, приспособившуюся к условиям среды желудочно-кишечного тракта. К постоянной микрофлоре относятся молочнокислые стрептококки (*Str. lactis*), молочнокислые палочки (*Bac. acidophilum*), кишечная палочка (*E. coli*).

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

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

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

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

В желудке свиньи главные представители микрофлоры — молочнокислые бактерии, различные кокки, актиномицеты, дрожжи, спорообразующие аэробы; обнаруживаются *Cl. perfringens*. Микрофлора желудка лошади менее многочисленна и разнообразна: ближе к привратнику она бедна, в преддверии желудка микробы концентрируются в большом количестве; на дне желудка много молочнокислых бактерий, нет гнилостных.

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

Цельные компоненты грубых кормов были бы недоступны для использования, если бы в процессе эволюции не возникли симбиотические отношения с микробами, способными расщеплять клетчатку (целлюлозу). Рубец и сетка — это большая бродильная камера, в которой имеются идеальные условия для роста многочисленных микроорганизмов: анаэробные условия, температура 37–39°C, непрерывная подача забуференного минерального раствора (100–200 л слюны в сут.), питательные вещества в виде хорошо измельченного богатого целлюлозой корма и механическое перемешивание в результате движения рубца. Под действием микробных ферментов в преджелудках переваривается от 70 до 85% сухих веществ рациона. Среди обитателей рубца обнаружено 120 видов простейших и 150 видов микроорганизмов. В зависимости от вида корма соотношение между микроорганизмами и простейшими меняется. С функциональной точки зрения наиболее важными являются бактерии, количество их в 1 мл содержимого рубца достигает 40 млрд. С кормом поступает много новых микроорганизмов, но они проходят транзитом, так как своя облигатная микрофлора не позволяет развиваться посторонним видам. Микробы, заселяющие рубец, расщепляют белки, нитраты, мочевины, синтезируют все витамины, за исключением А, Е, D.

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

Микрофлора толстых кишок наиболее богата. Постоянными обитателями являются: энтерококки, стафилококки, стрептококки, целлюлозные бактерии, актиномицеты, ацидофильные и гнилостные бактерии, споровые формы, дрожжи и плесени. Обилие микроорганизмов в толстых кишках объясняется наличием в них больших объемов переваренной пищи. Установлено, что треть сухого вещества фекальных масс животных и человека состоит из микробов. Микробиологические процессы в толстых кишках идут очень активно, некоторые продукты жизнедеятельности микробов полезны и усваиваются макроорганизмом. У разных видов животных, в том числе птиц, пчел, микрофлора толстых кишок представлена разнообразными ассоциациями микробов; она может быть как постоянной, так и непостоянной.

У здоровых животных наряду с нормальной микрофлорой в ряде случаев обнаруживаются патогенные микроорганизмы — возбудители столбняка, ботулизма, инфекционного аборта кобыл, рожи свиней, пастереллеза, сальмонеллеза и других инфекций.

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

Матка, яичники, семенники и мочевого пузыря у здоровых животных стерильны. При заболеваниях мочеполовых органов (метриты, эндометриты) микрофлора влагалища изменяется.

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

Следует учесть, что у здоровой самки плод в матке стерилен до момента родов. Таким образом, в процессе филогенетического развития в открытых полостях животного организма сформировалась микроэкологическая система, характерная для определенного вида животного и для каждого отдела.

Под микроэкологической системой в широком смысле понимается состояние динамического равновесия, которое определяется, с одной стороны, физиологическими и иммунологическими особенностями макроорганизма, с другой — видовым и количественным составом микробных ассоциаций и разнообразием их биохимической активности.

При нормальном физиологическом состоянии взаимоотношения носят симбиотический характер, и флора при этом выполняет ряд весьма существенных функций. Во-первых, нормальной микрофлоре принадлежит важнейшая роль в формировании иммунологической реактивности организма. Во-вторых, представители нормальной микрофлоры благодаря продуцированию разнообразных антибиотических соединений и выраженной антагонистической активности предохраняют органы, сообщающиеся с внешней средой, от внедрения и безграничного размножения в них патогенных микроорганизмов. В-третьих, флора обладает выраженным морфокинетическим действием, особенно по отношению к слизистой оболочке тонкой кишки, что существенно отражается на физиологических функциях пищеварительного канала.

Нарушение видового состава нормальной микрофлоры под влиянием инфекционных и соматических заболеваний, а также в результате длительного и нерационального применения антибиотиков приводит к состоянию дисбактериоза, который характеризуется изменением соотношения различных видов бактерий, нарушением усвояемости продуктов

пищеварения, изменением ферментативных процессов. Для коррекции дисбактериоза следует устранить факторы, вызвавшие этот процесс.

Возникает вопрос: возможна ли жизнь животных без микробов? Уже в прошлом веке было известно, что у птиц и животных арктических мест очень редко в организме обнаруживались бактерии. Еще Луи Пастер пытался вывести безмикробных животных, но техника и возможности того времени не позволили решить эту задачу.

В настоящее время развивается новая отрасль биологии — **гнотобиология**, изучающая безмикробную жизнь макроорганизмов. Выращены в специальных камерах путем вскармливания стерильной пищей безмикробные цыплята, крысы, мыши, морские свинки, поросята и другие животные.

Гнотобиоты привлекли внимание ученых в связи с необходимостью более глубокого изучения роли нормальной микрофлоры в механизмах инфекционной патологии и иммунитета. У гнотобиотов по сравнению с обычными животными недоразвита лимфоидная ткань, у них меньше масса внутренних органов, объем крови, понижено содержание воды в тканях.

Гнотобиология позволяет более точно выяснить роль нормальной микрофлоры в процессе синтеза витаминов, аминокислот, проявления врожденного и приобретенного иммунитета. Большое значение придается гнотобиологии при изучении космоса, условий жизни человека и животных в полете. Далее получены животные, свободные только от патогенных микроорганизмов (СПФ-животные).

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

Контрольные вопросы

1. Назовите основную микрофлору почвы.
2. Какая микрофлора присутствует в воде?
3. Какая микрофлора присутствует в воздухе?
4. Какую микрофлору рубца вы знаете и какова ее роль в пищеварении?
5. Перечислите микрофлору толстого отдела кишечника.

Тема 5

**ПРЕВРАЩЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМАМИ
СОЕДИНЕНИЙ АЗОТА И УГЛЕРОДА**

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

Круговорот азота. Азот (N) — важнейший биогенный элемент, входящий в состав белковой молекулы каждого живого существа. Запасы газообразного азота в атмосфере огромны. Столб воздуха над гектаром почвы содержит до 80 тыс. тонн азота. Однако ни растениям, ни животным он недоступен, так как растения могут использовать для питания азот минеральных соединений, а животные потребляют азот в форме органических соединений. Только специфическая группа микроорганизмов обладает способностью фиксировать и строить из него все разнообразие азотсодержащих органических соединений своей клетки.

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

Фиксация атмосферного азота. Способностью фиксировать атмосферный азот и строить из него тело своей клетки обладают микроорганизмы, получившие название азотфиксирующих. Они обуславливают значительное повышение плодородия почвы.

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

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

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

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

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

В хозяйствах с целью повышения плодородия почвы используют азотобактерин и нитрагин, приготавливаемые в специальных лабораториях. Азотобактерин состоит из живой культуры азотобактера, выращенной на нейтральном торфе или садовой почве. Вместе с посевным материалом его вносят под небобовые культуры (картофель, свекла).

Выпускают две формы нитрагина: ризотрофин и ризобин. Ризотрофин представляет собой смесь клубеньковых бактерий со стерильным торфом. Ризобин (сухой нитрагин) представляет собой высушенную культуру клубеньковых тканей. Препараты вносят в почву под растительные культуры.

Аммонификация белков. Значительные запасы органического азота сохраняются в растительных и животных тканях. Компоненты тканей погибших растений и животных подвергаются действию микроорганизмов и азотистые соединения разрушаются с образованием аммиака. Этот процесс называют аммонификацией, или минерализацией, азота. Процесс аммонификации может происходить как в аэробных, так и в анаэробных условиях при участии разнообразных микроорганизмов: бактерий, бацилл, клостридий, актиномицетов, плесневых грибов.

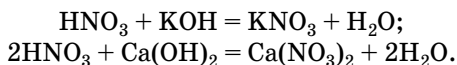
Расщепление белковых веществ происходит за счет протеолитических ферментов, выделяемых микроорганизмами, получивших название гнилостных. Глубина расщепления белковых веществ зависит от вида микробов и условий их жизнедеятельности. Аэробная гнилостная микрофлора совершает глубокий распад белка, конечными продуктами которого являются аммиак, CO_2 , сульфаты и вода. При распаде белка в анаэробных условиях образуются аммиак, CO_2 , органические кислоты, а также индол, скатол, обладающие неприятным запахом. *Аммонификация остатков растений, трупов, других органических субстратов ведет к обогащению почвы азотистыми продуктами.* Одновременно гнилостные микробы выполняют огромную санитарную роль, очищая почву и гидросферу от разлагающегося органического субстрата.

К аэробным аммонификаторам относятся широко распространенные в природе спорообразующие грамположительные палочки: *Bac. mycoides*, *Bac. subtilis*, *Bac. megatherium*. Из анаэробных микроорганизмов наиболее активны: *Cl. putrificum*, *Cl. sporogenes* — подвижные палочки, грамположительные, обнаруживаются в кишечнике, почве, навозе.

Аммонификация мочевины. Подсчитано, что весь животный мир земного шара за сутки выделяет более 150 тыс. т

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

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



Селитра хорошо растворяется в воде и усваивается растениями, благодаря чему *повышается плодородие почвы*. Бактерии рода *Nitrosomonas* имеют форму палочек, подвижные, грамотрицательные, с одним жгутиком, широко распространены в почве. Род *Nitrococcus* способен образовывать зооглеи (кокковые формы микробов, окружены общей капсулой). Бактерии рода *Nitrospira* имеют правильную спиральную форму. Род *Nitrobacter* — полиморфные мелкие палочки, неподвижные, грамотрицательные.

Денитрификация. Это процесс, обратный нитрификации. Различают прямую и косвенную денитрификацию. Прямая

денитрификация вызывается бактериями, широко распространенными в почве, навозе, водоемах. Среди них наибольшее значение имеют: *Thiobacillus denitrificans* — палочка, не образующая спор, факультативный анаэроб; *Pseudomonas fluorescens* — подвижная палочка, грамотрицательная, образует зеленоватый пигмент; *Ps. stutzeri* — палочка, образующая цепочки; *Paracoccus denitrificans* — имеет форму кокков. Денитрифицирующие бактерии восстанавливают нитраты до молекулярного азота. В почве развиваются без доступа воздуха и в щелочной среде, т. е. для предотвращения потерь азота необходимо рыхление почвы.

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

Круговорот углерода. Углерод (CO_2) входит в состав органических соединений, которые являются продуктами фотосинтеза. В воздухе его содержится немногим более 0,03% (по объему). Такая концентрация углекислоты в атмосфере поддерживается относительно постоянной в результате динамического равновесия между фотосинтезом и минерализацией. О значимости круговорота углерода в природе свидетельствует расчет: весь углерод атмосферы в случае отсутствия пополнения был бы полностью исчерпан при современной скорости фотосинтеза менее чем за 20 лет. Велика роль микроорганизмов в поддержании равновесия и круговорота CO_2 на нашей планете. При минерализации органических веществ они образуют почти столько же углерода, сколько используются растениями в процессе фотосинтеза.

Роль микробов в разложении клетчатки. В состав клетчатки (целлюлозы) входит более 50% всего органического углерода биосферы. Клетчатка — наиболее распространенный полисахарид растительного мира; высшие растения на 15–50% состоят из целлюлозы. После гибели растений она подвергается разложению, в результате чего освобождается

углерод. Разложение клетчатки происходит в аэробных и анаэробных условиях. В природе распад клетчатки происходит повседневно в почве, водоемах, навозе, пищеварительном тракте травоядных благодаря ферментам, которые выделяют различные микроорганизмы.

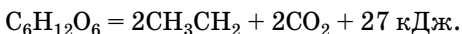
Аэробное разложение (брожение) клетчатки наиболее интенсивно происходит под влиянием следующих трех широко распространенных в природе родов микроорганизмов: *Cytophaga* — подвижные с заостренными концами палочки; *Cetacicula* — короткие с заостренными концами палочки; *Ceivirio* — длинные палочки, слегка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

Анаэробное брожение клетчатки происходит в два этапа. На первом этапе клетчатка осаживается, а затем сахар разлагается в зависимости от типа брожения на спирты, молочную, масляную кислоты, углекислоту, водород, метан и др. Известно, что в природе имеется два типа анаэробного брожения клетчатки — водородное и метановое, которые осуществляются двумя анаэробными бактериями-целлюлозоразрушителями: *Cl. omelianskii* и *Cl. cellobioparum*. Оба микроба представляют собой крупные грамположительные палочки, подвижные, образуют споры, обитают в почве и навозе. Водородное и метановое брожение клетчатки происходит также в преджелудках крупного рогатого скота при поедании большого количества зеленой массы бобовых, особенно влажной от дождя или утренней росы, что обуславливает развитие острой тимпании рубца.

Следует особо отметить, что в рубце жвачных животных имеются специфические облигатные целлюлозоразлагающие бактерии. Они разлагают целлюлозу кормов до глюкозы, которая затем сбраживается с образованием органических кислот (уксусной, пропионовой, масляной, молочной, муравьиной, янтарной и др.), спиртов и газов (CO_2 и H_2). Разложение целлюлозы в рубце животных осуществляют кокковидные и палочковидные бактерии: *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Butyrovibrio fibrisolvens*, *Ruminobacter parvum*. Указанные бактерии имеют большое значение в питании жвачных животных.

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

Спиртовое брожение. При спиртовом брожении микроорганизмы превращают углеводы (сахара) с образованием этилового спирта как основного продукта и углекислоты:



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

пивоварения, производства спирта, хлебопечения. Дрожжи используют и для приготовления кормового белка.

Молочнокислое брожение. При молочнокислом брожении происходит распад углеводов, а также многоатомных спиртов и белков до молочной кислоты. В зависимости от того, какие продукты образуются при сбраживании глюкозы — только молочная кислота или также и другие органические продукты и CO_2 , — молочнокислые бактерии принято подразделять на гомоферментативные и гетероферментативные. Это деление отражает различия в путях катаболизма углеводов.

Гомоферментативное молочнокислое брожение. Гомоферментативные молочнокислые бактерии образуют практически только одну молочную кислоту. Среди них имеются кокковидные и палочковидные бактерии. Кокковые формы включены в род *Streptococcus*, к которому отнесены виды *Str. lactis*, *Str. cremoris*, *Str. diacetylactis*, *Str. thermophilus*.

Str. lactis (молочнокислый стрептококк) — кокки имеют овальную форму, располагаются в виде цепочки. Они неподвижные, грамположительные. Кроме моносахаридов сбраживает лактозу и мальтозу. Оптимальная температура для развития 30–35°C. *Str. cremoris* (сливочный стрептококк) — клетки овальной формы, расположенные в виде длинных цепочек. Образует летучие кислоты. Используют при производстве кисломолочных продуктов (оптимальная температура 25°C). *Str. diacetylactis* образует в молоке и молочных продуктах повышенное количество летучих кислот и ароматические вещества, обладает способностью сбраживать лимонную кислоту (оптимальная температура 25–35°C). *Str. thermophilus* может развиваться при повышенной температуре (около 40–45°C), сбраживает сахарозу.

Палочковые бактерии включены в род *Lactobacillus*, которые характеризуются значительным разнообразием форм — от короткой до длинной нитевидной. Располагаются в виде единичных клеток, парами или цепочками. Бактерии этого рода разделены на две группы. Первая представлена организмами, которые хорошо растут при 45°C, слабо развиваются при 20°C и не растут при 15°C. К ним относятся

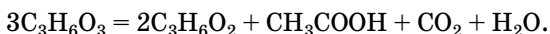
виды *L. delbrueckii*, *L. lactis*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* и др. Представители второй группы при развитии в молоке образуют короткие цепочки. Это группа менее активных молочнокислых палочек. Хорошо развивается при температуре 15–38°C, оптимум 30°C. К ним относятся виды *L. casei* и *L. plantarum*.

Гетероферментативное молочнокислое брожение. Его осуществляют представители родов *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*. Бактерии рода *Leuconostoc* имеют вид сферических клеток, располагающихся одиночно, парами или короткими цепочками. Факультативные анаэробы, неподвижные, грамположительные, оптимум температуры 20–30°C. Род включает виды *L. mesenteroides*, *L. dextranicum*, *L. citrovorum* и др. Род *Lactobacillus* включает виды *L. fermentum*, *L. brevis*, которые обычно встречаются на растениях, обнаруживаются в хлебных заквасках. Это небольшие палочки, грамположительные, температурный максимум около 45°C. К роду *Bifidobacterium* отнесены бактерии, имеющие вид прямых или разветвленных палочек, в виде римской цифры-V, неподвижные, грамположительные, анаэробы, температурный оптимум для них 36–38°C. Бифидобактерии — постоянные обитатели кишечника человека и животных. Типичный представитель рода — *B. bifidum*.

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

Пропионовокислое брожение. Пропионовокислое брожение осуществляется бактериями рода *Propionibacterium*. Они представляют собой неподвижные грамположительные палочки, полиморфные, образующие булавовидные формы; располагаются одиночно, парами, цепочками; спор не образуют; анаэробы, оптимальная температура роста 30–37°C, рН 7,0. Эти бактерии встречаются на растениях, в почве, в желудочно-кишечном тракте жвачных животных. Источниками энергии для них служат углеводы, органические

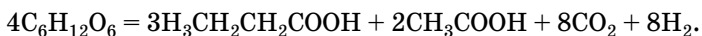
кислоты, спирты и другие вещества. Пропионовокислые бактерии способны сбраживать молочную кислоту, образовавшуюся в результате брожения, вызванного молочнокислыми бактериями. Пропионовокислое брожение находит применение при изготовлении твердых сортов сыра, благодаря их деятельности образуются глазки правильной формы. Конечные продукты пропионовокислого брожения — пропионовая и уксусная кислоты, CO_2 и вода:



Пропионовокислые бактерии используют для получения витамина B_{12} , который они образуют в значительных количествах.

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

Маслянокислое брожение начинается с разложения сахаров в пировиноградную кислоту. Конечные продукты из пировиноградной кислоты образуются в результате цепи реакций, катализируемых несколькими ферментными системами. Суммарное уравнение маслянокислого брожения имеет следующий вид:



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

Уксуснокислое окисление — микробиологический процесс, при котором этиловый спирт окисляется до уксусной

кислоты под влиянием уксуснокислых бактерий. Бактериальная природа этого процесса была установлена в 1868 г. Л. Пастером.

Получение уксуса известно еще со времен Вавилона. Добавляя уксус, люди консервировали пищевые продукты: его использовали как первый антибиотик и как обычный напиток для солдат и рабов Римской империи.

Уксуснокислые бактерии могут использовать не только спирт, но и сахаристые вещества, входящие в состав субстрата. В промышленности их используют для получения различных видов уксуса: солодового, виноградного, плодово-ягодного, спиртового. Самые приятные на вкус солодовый и виноградный, но наиболее распространен самый дешевый — спиртовой уксус.

По морфологии уксуснокислые бактерии — короткие палочки, подвижные и неподвижные, грамотрицательные, не образующие спор, строгие аэробы. Все виды (25) уксусных бактерий объединены в род *Acetobacter*. Типичными представителями являются *A. aceti*, *A. pasteurianum* и др. *A. Aceti* — короткая палочка, неподвижная, грамотрицательная, располагается цепочками. На поверхности субстрата, пива, не крепленых сухих вин образует сухую складчатую пленку. Оптимальная температура роста 34°C. Окрашивается йодом в желтый цвет. *A. pasteurianum* по своей морфологии напоминает *Acetobacter aceti*.

Уксуснокислые бактерии используют для производства пищевого уксуса из вина и спирта в промышленных условиях. Незначительное уксуснокислое брожение идет параллельно молочнокислому брожению при силосовании кормов.

Контрольные вопросы

1. Значение аммонификации белка.
2. Значение процессов нитрификации и денитрификации, происходящей в почве.
3. Назовите начальные и конечные продукты спиртового брожения.
4. Расскажите о гомо- и гетероферментативном молочнокислом брожении.
5. Назовите область применения пропионовокислого брожения.

Тема 6

**ФОРМЫ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ
В МИРЕ МИКРООРГАНИЗМОВ. АНТИБИОТИКИ**

Существует царство животных, растений, микроорганизмов. Каждое царство представлено большим числом видов, внутри каждого сообщества складываются различные взаимоотношения. Эти взаимоотношения складываются как внутри вида, так и между царством растений, микроорганизмов и животных. Сложившийся биоценоз это результат длительной эволюции. В природе микроорганизмы также не живут в виде чистых культур, они вступают между собой в сложные взаимоотношения. Все взаимоотношения, их совместную жизнь обозначают термином «симбиоз» — совместная жизнь. Наука, изучающая эти взаимоотношения, носит название «**биоценология**».

Мир устроен так, что все живые существа в борьбе за существование превращаются в смертельных врагов. Каждый из них отвоевывает для себя пищу, пространство. Иногда они дополняют друг друга, один организм питается отбросами другого, в таких случаях возможна их совместная жизнь.

В одних случаях взаимоотношения благоприятны, эти взаимоотношения можно подразделить на две группы: *комменсализм (нахлебничество)* — когда один из партнеров привлекает выгоду, не причиняя вреда другому партнеру; *мутуализм* — взаимовыгодное сожительство, когда оба партнера пользуются услугами друг друга.

Нас больше интересуют **антагонистические**, т. е. **враждебные**, взаимоотношения, возникающие в мире микробов, которые также могут быть двух видов: *непосредственный антагонизм* — имеет форму паразитизма, когда один вид непосредственно уничтожает другой вид, эта форма антагонизма в мире микробов широко распространена (вирусы, бактериофаги, риккетсии); *посредственный антагонизм* заключается в том, что бактерии действуют на партнера не сами, а продуктами метаболизма.

Явление антагонизма было открыто во времена становления науки микробиологии Луи Пастером, который отметил угнетение сибиреязвенных бацилл культурой синегнойной палочки.

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

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

В 1922 г. А. Флеминг обнаружил, что таким же свойством обладают слезы, слизь из носа, экстракты из животных тканей, и назвал это вещество **лизоцим**, так как оно лизировало некоторые бактерии (лизоцим из куриного белка в 200 раз активнее, чем в слезе).

Первооткрывателем первого антибиотика из плесневых грибов — пенициллина — является шотландский микробиолог А. Флеминг, который, начиная с 1929 г., изучал антибактериальные свойства зеленой плесени — гриба рода *Penicillium*. Но только в 1940 г. биохимик Э. Чейн выделил пенициллин из культуральной жидкости в чистом виде и установил его химическое строение, а медик Х. Флори впервые применил стойкую соль пенициллина с лечебной целью. С 1943 г. в США было развернуто промышленное производство пенициллина. В 1945 г. присуждена Нобелевская премия А. Флемингу совместно с Х. Флори и Э. Чейном. Это событие, ознаменовавшее начало эры антибиотиков, является выдающимся в области биологии. Явление антагонизма в мире микробов привело к открытию антибиотиков.

Антибиотики (греч. *anti* — против чего-нибудь, *bios* — жизнь) — биологически активные вещества, вырабатываемые микроорганизмами, растениями и животными, обладающие свойством в минимальных количествах губительно действовать на микроорганизмы. Получены также противоопухолевые антибиотики. Антибиотики могут оказывать на микроорганизмы бактериостатическое (подавляющее рост и

размножение) и бактерицидное (вызывающее гибель) действие.

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

Большим преимуществом антибиотиков является их избирательная токсичность против бактерий, не повреждающая при этом клетки живого организма. Это обусловлено тем, что их мишенью являются структуры, свойственные только микроорганизмам, в состав которых входит пептидогликан.

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

По происхождению антибиотики можно разделить на пять групп.

1. Антибиотики, образуемые грибами и лишайниками, являются продуцентами активных антибиотиков. Так, из культуральной жидкости *Penicillium notatum* выделен пенициллин, *Cephalosporium acremonium* — цефалоспорин.

2. Антибиотики, образуемые актиномицетами, нашли самое широкое применение в практике. Из культуральной жидкости актиномицетов были выделены следующие антибиотики: *Streptomyces greseus* — стрептомицин, *Str. fradiae* — неомицин, *Str. canamyceticus* — канамицин.

3. Антибиотики, выделенные из бактерий, имеют меньшее практическое значение, так как эффективность их значительно ниже, чем антибиотиков грибкового и актиномицетного происхождения. К антибиотикам этой группы относятся грамицидин, полимиксин, колицин, пиоционин, субтилин. Большинство из них токсичны при парентеральном введении, поэтому их рекомендуют применять наружно.

4. Антибиотики животного происхождения. Биологически активные вещества, выделяемые животными тканями, не только обладают антибиотическим действием, но и активизируют защитные силы макроорганизма. Эти свойства позволяют применять их для профилактики и лечения ряда заболеваний. К ним относятся лизоцим (обладает свойством ли-

зировать бактерии), интерферон (препятствует проникновению вируса в клетку), эритроин (выделяемый из эритроцитов животных), экмолин (полученный из тканей рыб).

5. Антибиотики растительного происхождения. Развитие многих растений сопровождается выделением летучих веществ, обладающих антимикробным действием. Эти вещества в 1928 г. Б. П. Токиным названы фитонцидами. Фитонциды обнаружены почти у всех растений (в листьях, плодах и соках). Наиболее активны фитонциды, образуемые луком, чесноком, алоэ, крапивой, березой, черемухой, летучие фракции которых убивают за несколько минут стафилококки, стрептококки и кишечную палочку. В хвойном лесу воздух почти стерильный, деревья на площади 1 га за сутки летом выделяют 5 кг летучих фитонцидов.

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

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

1. Антибиотики, ингибирующие синтез бактериальной стенки (пенициллины, цефалоспорины, бацитрацин).

2. Антибиотики, нарушающие функционирование цитоплазматической мембраны (полипептиды, полиены, грамицидин).

3. Антибиотики, сдерживающие синтез белка (тетрациклины, хлормицетины, аминогликозиды, макролиды).

4. Антибиотики, избирательно подавляющие синтез нуклеиновых кислот.

Антимикробная активность антибиотиков определяется наименьшим количеством антибиотика, которое оказывает антимикробное действие, его принято выражать

в международных единицах действия (ЕД) или в весовых единицах. Так, за единицу пенициллина принимают 0,6 мкг чистой кристаллической соли, а за единицу действия других антибиотиков — 1 мкг сухого препарата.

В настоящее время известно более 5000 антибиотиков, из которых на практике используются лишь около 50–100. Антибиотики применяют значительно шире, чем другие химиотерапевтические препараты. Антимикробная активность антибиотиков измеряется тем наименьшим количеством антибиотика, которое оказывает противомикробное действие, и выражается либо в единицах действия — ЕД, либо в единицах массы. Основными причинами применения антибиотиков являются специфический механизм их действия, эффективность в очень малых дозах, сохранение активности в условиях макроорганизма и быстро проявляющееся лечебное действие.

Применение антибиотиков в животноводстве. А. Р. Миленков в 1943 г. заметил, что при включении в рацион некоторых антибиотиков рост и развитие животных улучшаются. В опытах А. Х. Саркисова с сотрудниками (1957), проведенных на 200 тыс. цыплят, добавление в корм пенициллина (40 мг на 1 кг) или биомицина (20 мг на 1 кг) позволило сократить отход цыплят в 2–3 раза, а привесы молодняка повысить на 6–15%. В свиноводстве антибиотики также нашли широкое применение. Так, добавка антибиотика в корм свиньям за период откорма привела к увеличению массы животных на 15–20%.

Ученые отметили, что антибиотики, применяемые в животноводстве, используются и в медицине, при этом возникает опасность появления в окружающей среде резистентных бактерий и снижения лечебного эффекта при лечении заболевших людей и животных. Поэтому изданы рекомендации, ограничивающие применение антибиотиков для кормовых целей и консервирования продуктов. Решен вопрос об использовании специальных антибиотиков не для лечебных целей.

В связи с появлением антибиотикоустойчивых штаммов бактерий антибиотики, применяемые для лечения людей, не следует использовать в животноводстве ни в целях получения привесов, ни в целях профилактики инфекционных болезней. Запрещение использования определенных антибио-

тиков в животноводстве должно сопровождаться предложением альтернативных препаратов и подкрепляться строгим контролем рынка. Антибиотики, предназначенные для использования в животноводстве в лечебных целях, следует назначать и применять под строгим ветеринарным контролем. Следует четко указывать и строго соблюдать сроки прекращения применения этих антибиотиков. Рациональное использование антибиотиков и химиотерапевтических препаратов для лечения людей и животных должно стать главной задачей в связи с проблемой появления резистентных бактерий к противомикробным средствам.

Н. А. Красильниковым предложены кормовые антибиотики: витаминин, кормогрizin, стимулирующие рост молодняка. Кормогрizin — антибиотик актиномицетного происхождения, не всасывается из пищеварительного тракта. Антибиотик витаминин — ускоряет рост животных и экономит корма, а также компенсирует недостачу витамина А в кормах. При применении бацитрацина также получены хорошие результаты.

Как же влияют антибиотики, добавляемые в небольших количествах в корм, на организм животных? Антибиотики усиливают аппетит, секрецию пищеварительных ферментов, повышают общий тонус защитных сил организма. Таким образом, ростовой эффект антибиотиков является сложным и комплексным.

Организм животного находится в сложном постоянном взаимоотношении с большим количеством микроорганизмов, в частности, населяющих желудочно-кишечный тракт. При высоких бактериостатических или бактерицидных концентрациях антибиотиков в кишечнике исчезают некоторые виды микроорганизмов, подавляется основная микрофлора кишечника, размножаются не свойственные для кишечника микроорганизмы, что приводит к возникновению дисбактериоза.

Контрольные вопросы

1. Какие признаки учитывают при классификации антибиотиков?
2. С какой целью применяются антибиотики?
3. С какой целью определяют чувствительность бактерий к антибиотикам?

Тема 7

**ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ
НА МИКРООРГАНИЗМЫ**

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

Для каждого вида бактерий определена оптимальная температура развития. В зависимости от пределов этой температуры микроорганизмы разделены на следующие три физиологические группы:

- психрофильные — оптимальная температура 10–15°C;
- мезофильные — оптимальная температура 30–37°C;
- термофильные — оптимальная температура 45–55°C.

Высокие и низкие температуры по-разному влияют на микробы. При низких температурах микробная клетка переходит в состояние анабиоза, в котором она может существовать несколько месяцев. Так, эшерихии остаются жизнеспособными при –190°C до 4 мес., холерный вибрион при –45°C — до 2 мес., возбудитель листериоза при –10°C — до 3 лет. Жизнедеятельность некоторых микроскопических грибов прекращается лишь при температуре –11°C, к этой группе принадлежат микроорганизмы, вызывающие порчу продуктов в холодильнике.

Низкие температуры приостанавливают гнилостные и бродительные процессы. На этом принципе основано хранение продуктов в ледниках, погребах и холодильнике. Микроорганизмы, выжившие в процессе хранения мороженого мяса, при его оттаивании начинают размножаться в благоприятных условиях. Высокая температура, в особенности нагревание паром под давлением, губительно действует на микробы. Чем больше температура выходит за пределы максимума, тем быстрее погибают вегетативные формы микроорганизмов: при 60°C — через 30 мин, при 70°C — через 10–15, при 80–100°C — через 1 мин.

Споры бактерий более устойчивы к действию высокой температуры. Применение высокой температуры является самым распространенным, удобным и надежным способом стерилизации (*sterilis* — бесплодный), обеспложивания — уничтожения различных микробов и их спор в разнообразных объектах.

Существуют разные способы стерилизации при помощи высокой температуры: прокалывание на огне, кипячение, стерилизация сухим жаром в печах Пастера (электрический сушильный шкаф), стерилизация паром под давлением в автоклавах, без давления в аппарате Коха, тиндализация (дробная стерилизация при температуре 56–58°C) и пастеризация. *Пастеризация* — это метод, предложенный Л. Пастером с целью сохранения биологической ценности молока, вина, различных консервов, которые прогревают при 80°C в течение 30 мин, а затем быстро охлаждают до 4–6°C. При пастеризации погибают вегетативные формы микробов, споры же сохраняются, но быстрое охлаждение и хранение продукта при 4–6°C препятствует их прорастанию и последующему размножению микробов.

Стерилизация это полное уничтожение всех видов микроорганизмов в питательной среде, посуде, продуктах питания. Стерилизации подвергаются также перевязочный материал, хирургические инструменты, различные растворы. Система мер, полностью предотвращающих проникновение микроорганизмов в макроорганизм при ранении, хирургических вмешательствах, названа *асептикой*. Уничтожение микроорганизмов в ранах при помощи химических средств (растворы хлора, йода, перекиси водорода, калия перманганата, метиленового синего, бриллиантового зеленого, азотнокислого серебра и др.) называется *антисептикой* (от греч. *anti* — против, *septikos* — гнилостный).

Влияние высушивания. Многие микроорганизмы надолго сохраняются после высушивания, хотя расти и размножаться при недостатке влаги не могут.

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

Действие ультрафиолетовых лучей. Ультрафиолетовые лучи с длиной волны от 400 до 300 нм химически активны, от 330 до 295 нм — биологически активны, а в интервале от 295 до 200 нм — бактерицидно активны.

Ионизирующую радиацию применяют для уничтожения микробов на инструментах, в перевязочном материале, биопрепаратах — холодная стерилизация (при этом не снижается их

качество, так как не происходит денатурация составных ингредиентов, как при тепловой стерилизации).

Влияние электричества. Электричество малой и высокой частоты убивает микроорганизмы.

Влияние ультразвука. Ультразвук (волны с частотой около 20 000 Гц/с) используется для стерилизации пищевых продуктов и дезинфекции предметов.

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

При бактерицидном действии химический агент вызывает гибель клеток. Бактерицидное действие химических веществ имеет огромное значение, так как этот факт учитывается при использовании химического вещества в качестве дезинфектанта. Противомикробные вещества с учетом химического строения и механизма их бактерицидного действия на бактерии можно подразделить на следующие группы: окислители, галогены, соединения металлов, кислоты и щелочи, поверхностно-активные вещества, спирты, красители, производные фенола и формальдегида.

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

Контрольные вопросы

1. На какие группы по отношению к температуре разделены микроорганизмы?
2. Что такое стерилизация, пастеризация, дезинфекция?
3. Отличие между бактериостатическим и бактерицидным действием препаратов.

РАЗДЕЛ ВТОРОЙ

**УЧЕНИЕ ОБ ИНФЕКЦИИ
И ИММУНИТЕТЕ**

Тема 8

УЧЕНИЕ ОБ ИНФЕКЦИИ И ИММУНИТЕТЕ

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

Комплекс биологических процессов, возникающих в результате проникновения патогенных микробов в макроорганизм, называется инфекцией. Взаимоотношения между микро- и макроорганизмом динамичны. Динамику реакций взаимодействия между микро- и макроорганизмами называют инфекционным процессом. Инфекционный процесс включает в себя следующие периоды:

- 1) инкубационный — определенный промежуток времени от момента проникновения микроба до появления первых клинических признаков болезни;
- 2) продромальный — период предвестников болезни, характеризуется первыми, не всегда специфичными для данной болезни симптомами;
- 3) клинический — разгар болезни;
- 4) выздоровление.

Наиболее яркой формой проявления инфекции является инфекционная болезнь, которая характеризуется определенной клинической картиной.

Возникновение и развитие инфекции в основном зависит от следующих причин: степени патогенности микроба, иммунологического состояния макроорганизма и условий внешней среды.

Патогенность микроба — видовой генетический признак, его потенциальная возможность вызывать при благоприятных условиях инфекционный процесс. *Вирулентность* — это степень патогенности конкретного микроба. За единицу вирулентности принята минимальная смертельная доза — *dosis letalis minima*, выражающаяся количеством микробных клеток в 1 мл.

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

Длительное выращивание культур вне организма на обычных питательных средах, при максимальной температуре, пассирование на маловосприимчивых животных, добавление к культурам антисептических веществ ослабляют вирулентность.

Для повышения вирулентности возбудителя его многократно пассируют через организм молодых восприимчивых животных, и из трупа погибшего животного выделяют культуру бактерий, восстановивших вирулентность.

Факторы патогенности микробов:

1) адгезия — способность микроба адсорбироваться (прилипать) на чувствительные клетки макроорганизмов;

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

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

4) токсины — ядовитые вещества, образуемые микробами. Эндотоксины связаны с телом микробов, поэтому выделяются лишь при гибели (разрушении) микробных клеток. Экзотоксины выделяются в окружающую среду (в организм животного, в питательную среду).

Адгезия, ферменты и капсулы обуславливают инвазивность, а токсины — токсичность микробов.

Таким образом, перечисленные факторы патогенности микробов приводят основные системы макроорганизма к дис-

функции, в силу чего он погибает. Следует отметить, что не все микробы обладают суммой указанных факторов патогенности: одного-двух признаков иногда бывает достаточно, чтобы ослабить реактивность животного и вызвать его гибель.

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

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

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

Иммунитет (от лат. *immunitas* — освобождение, избавление) представляет собой комплекс физиологических приспособлений, которые сохраняют относительное постоянство внутренней среды и предохраняют организм от проникновения

в него живых тел и веществ, несущих в себе признаки генетически чужеродной информации.

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

Иммунитет подразделяют на *врожденный* и *приобретенный*. Врожденный иммунитет включает видовой, породный и индивидуальный иммунитет. Приобретенный подразделяют на естественный и искусственный. Естественный приобретенный включает активный (постинфекционный) и пассивный (плацентарный, колостральный). Активно приобретенный иммунитет может быть антимикробным (стерильный и нестерильный) и антитоксическим. Искусственно приобретенный иммунитет может быть активным (антимикробный, поствакцинальный и антитоксический) и пассивным (сывороточный). На рисунке 4 представлена классификация видов иммунитета.

Иммунитет формируется в органах лимфоидной системы, которая называется **иммунной системой организма**.

Лимфоидная система подразделяется на центральную (тимус, костный мозг, фабрициева сумка (у птиц), пейеровы бляшки (у животных)) и периферическую (селезенка, лимфатические узлы, кровь).

Главным компонентом иммунной системы являются лимфоциты. Костный мозг является основным органом гемопоэза, в нем находится самоподдерживающаяся популяция стволовых клеток, из которых в дальнейшем образуются Т- и В-лимфоциты. В тимусе происходит дифференцировка Т-лимфоцитов. Фабрициева сумка (у птиц), пейеровы бляшки (у животных) ответственны за гуморальный иммунитет.



Рис. 4
Виды иммунитета

Лимфатические узлы служат как бы фильтрами на пути бактерий и участвуют в образовании гуморального и клеточного иммунитета.

Селезенка в основном участвует в иммунных реакциях. Кровь, являясь периферическим органом иммунной системы, представлена отдельными лимфоидными клетками различного назначения и разной степени зрелости, а также гранулоцитами и моноцитами.

Защита организма от инфекции складывается из последовательного включения в борьбу с проникшим возбудителем трех различных эшелонов этой защиты, составляющих, в конечном счете, единый функциональный комплекс факторов естественной резистентности, раннего индуцибельного ответа и приобретенного иммунного ответа.

Неспецифический противомикробный иммунитет обеспечивают:

- 1) общие физиологические факторы (кожа, слизистые оболочки, секреты);
- 2) гуморальные факторы (лизоцим, пропердин, комплекс, интерферон, ингибиторы);
- 3) клеточные факторы (фагоцитарная активность микро- и макрофагов).

Специфический иммунный ответ у животных осуществляет иммунная система, обладающая уникальной способностью

распознавать множество разнообразных микробов, других чужих агентов и молекул, называемых антигенами, и вырабатывать в ответ на их вторжение специфические антитела и sensibilizированные лимфоциты.

В микробной клетке различают следующие антигены:

- 1) капсульные (К-антиген);
- 2) соматические (О-антиген);
- 3) жгутиковые (H-антиген).

К специфическим гуморальным факторам относятся *антитела* — специфические белки (иммуноглобулины), образующиеся в организме определенным типом клеток под воздействием антигена и обладающие свойством специфически с ним связываться.

Имуноглобулины состоят из четырех полипептидных цепей: двух L-легких и двух H-тяжелых, которые соединены между собой дисульфидными мостиками. По физико-химической структуре, молекулярной массе, функциям, биологическим и другим показателям иммуноглобулины объединены в 5 основных классов *Ig G*, *Ig M*, *Ig A*, *Ig D*, *Ig E*.

Ig G является основным, наиболее изученным классом антител. Составляет от 70 до 85% всех *Ig*, играет ведущую роль в защите от многих вирусных и бактериальных инфекций.

Ig M образуется на ранней стадии развития организма (у плода и новорожденного). Содержание иммуноглобулинов этого класса в сыворотке человека составляет около 10%. *Ig M* обладает способностью агглютинировать, преципитировать или лизировать антигены. Не проходит через плаценту и не участвует в аллергических реакциях.

Имуноглобулины класса *Ig A* представлены двумя видами: сывороточный и секреторный, они составляют до 20% всех *Ig*. *Ig A* синтезируется в селезенке, лимфатических узлах и в слизистых оболочках, поступает в молозиво, слюну, слезную жидкость, содержится в сыворотке крови и серозно-слизистых секретах, поэтому его называют секреторным.

Ig D локализуется на стенках кровеносных сосудов и входит в состав рецепторов В-лимфоцитов (концентрация не превышает 1%).

Имуноглобулины *Ig E* класса образуются в лимфоидной ткани органов дыхания и др. Содержание их около 0,1%. При

аллергических заболеваниях концентрация *Ig E* в сыворотке крови увеличивается. Считают, что *Ig E* играет защитную роль при гельминтозных заболеваниях, способствует усилению фагоцитарной активности макрофагов и эозинофилов.

Основное свойство антител — их специфичность, т. е. способность реагировать с тем антигеном, который был причиной их образования. В процессе взаимодействия антитела с антигеном происходит инактивация последнего.

Реакция между антигеном и антителом протекает в две стадии, первая из которых — специфическая (непосредственное соединение активного центра антител с антигенной детерминантой), вторая — неспецифическая, когда иммунный комплекс антиген — антитело выпадает в осадок. Если антитела корпускулярные, имеет место феномен агглютинации (склеивания). Когда в реакции участвуют растворимые антигены, наблюдается феномен преципитации (осаждения). Кроме того, антитоксины нейтрализуют токсины, лизины растворяют микробы и эритроциты.

Иммунопрофилактика и иммунотерапия. Для иммунопрофилактики используют вакцины. *Вакцины* — это биологические препараты, содержащие взвесь микроорганизмов или продукты их жизнедеятельности, которые применяют для активной иммунизации с целью создания иммунитета (невосприимчивости) организма к определенным инфекционным болезням. Различают вакцины живые и инактивированные (корпускулярные), а также химические и анатоксины (некорпускулярные).

Живые вакцины представляют собой *взвесь бактерий*, приготовленных из аттенуированных возбудителей, ослабленных ультрафиолетовыми лучами, длительным выращиванием на искусственных питательных средах, иногда в присутствии ингибитора и т. д. В результате целенаправленного воздействия микроорганизмы, потеряв вирулентность, должны сохранить антигенные и иммуногенные свойства.

Убитые вакцины обычно готовят из взвеси вирулентных и иммуногенных штаммов бактерий, поэтому в процессе приготовления вакцин их инактивируют. Для инактивирования бактерий используют высокую температуру или химические

вещества, в основном применяют формалин, добавляя от 0,2 до 0,5%, в зависимости от биологических особенностей микроорганизмов.

Выращивание бактериальной массы для живой и убитой вакцины проводят в жидкой обогащенной питательной среде в котлах-реакторах, аэрируемых подаваемым кислородом. После накопления максимальной концентрации бактериальная масса отделяется от жидкой части путем центрифугирования. Полученная бактериальная масса служит основой для получения вакцин. Концентрацию бактерий в 1 мл готовой вакцины доводят до 1–4 млрд в 1 мл (в зависимости от вида возбудителя) при помощи стандартного эталона мутности, фотометрически подогнанного к мутности определенной концентрации бактерий.

Приготовленную вакцину проверяют на стерильность, безвредность и активность (иммуногенность). Все инактивированные препараты должны быть *стерильными*. Для контроля на стерильность из препарата делают высев на МПА, МПБ, МППБ и среды для выявления микроскопических грибов. При высеве из живой вакцины должна вырасти только одна культура, указанная на этикетке. Важнейшим элементом контроля на *безвредность* является проверка вакцины на лабораторных животных. Обычно используют от 3 до 5 животных на каждую серию изготовленной партии. Вакцина безвредна, если у привитых животных она не вызывает никаких патологических симптомов. *Активность* вакцины (иммуногенность) определяют следующим методом: животных иммунизируют проверяемой вакциной, через две недели иммунизированным и контрольным животным вводят смертельную дозу культуры микробов, за зараженными животными наблюдают в течение определенного времени. Иммунизированные животные должны остаться живыми и здоровыми, а контрольные — погибнуть.

Анатоксины — экзотоксин, утративший свою токсичность, но сохранивший антигенные и иммуногенные свойства. Широко применяемыми анатоксинами являются вакцины против столбняка и ботулизма. При приготовлении столбнячного анатоксина к фильтрату токсинсодержащей бульонной культуры добавляют 0,5% формалина, инактиви-

руют при 38–39°C в течение 30 суток. Контроль качества био-препарата проводят по обычным параметрам.

Все флаконы с биопрепаратами должны быть опечатаны и снабжены этикетками, на которых указывают наименование препарата, биофабрику, дату выпуска, срок годности, серию, номер госконтроля, дозировку.

Действующим началом вакцин являются антигены микроорганизмов, после введения вакцин иммунитет у животных возникает через 10–14 дней. Продолжительность иммунитета зависит от вида вакцин: при использовании живых вакцин — до 1 года и более, после введения инактивированной — до 6 мес.

Иммунные сыворотки и иммуноглобулины выпускаются предприятиями биологической промышленности. В качестве продуцентов иммунных сывороток используют лошадей, мулов, ослов, волов и реже другие виды животных. Гипериммунизацию проводят нарастающими дозами антигенов по утвержденным производственным схемам, отличающимся продолжительностью иммунизации, интервалами между циклами иммунизации, дозами для каждого цикла введения антигена и реакцией продуцента.

После окончания цикла иммунизации, когда в сыворотке крови животных-продуцентов находится максимальное количество специфических антител, у животных частично или тотально берут кровь. Кровь помещают в термостат для свертывания, при этом отделяется прозрачная сыворотка, ее отсасывают и стерилизуют, пропуская через бактериальные фильтры. Сыворотку консервируют, добавляя 0,25–0,5% фенола, разливают во флаконы с этикеткой.

Гипериммунные сыворотки применяют для лечебных и профилактических целей, они создают лишь кратковременный пассивный иммунитет. Иммунитет после введения сыворотки наступает в ближайшие часы, но не превышает 2–3 недель.

Безвредность каждой серии сывороточных препаратов проверяют на лабораторных животных, которым подкожно вводят 10 мл сыворотки. Животные должны оставаться здоровыми, без выраженных проявлений местной и общей реакции.

Контроль бактериальной чистоты сывороточных препаратов проводят по общепринятой методике высевами из препарата на специальные питательные среды (МПА, МПБ, МППБ и на агар Сабуру).

Диагностические антительные диагностикумы выпускают предприятия биологической промышленности. Антительные диагностикумы применяют как известный компонент в серологических реакциях при определении вида возбудителя, выделенного из исследуемого материала.

Диагностические антигенные диагностикумы готовят на предприятиях биологической промышленности по принципу приготовления инаktivированных вакцин. Например, приготовление бруцеллезного антигенного диагностикума проводят по следующей методике: на обогащенном печеночном агаре выращивают бруцеллезную биомассу из вакцинного штамма 19, инаktivируют нагреванием, устанавливая концентрацию 10 млрд микробных тел в 1 мл, консервируют фенолом, разливают во флаконы с этикеткой.

Сальмонеллезный антигенный диагностикум — представляет собой 10 млрд взвесь сальмонелл — применяют при серологической диагностике сальмонеллеза.

Стандартный сибиреязвенный антиген для РП — представляет собой прозрачный экстракт из убитых нагреванием бацилл вирулентного штамма сибирской язвы — применяют для контроля качества компонентов при постановке РП при исследовании кожевенного сырья, мяса на сибирскую язву.

Аллергены — выпускают предприятия биологической промышленности. Представляют собой экстракты из бактериальной массы, они *не должны обладать антигенными* свойствами. Аллергены применяют для аллергической диагностики туберкулеза (туберкулин), бруцеллеза (бруцеллин), сибирской язвы (антраксин) и др.

Например, туберкулин готовят путем выращивания культур микобактерий туберкулеза человеческого вида на мясопептонном глицериновом бульоне в течение 6–8 недель. Затем культуру автоклавируют, выпаривают до 1/10 объема, фильтруют через бактериальные фильтры Зейтца и добавляют 50% глицерина от общего объема. Контроль качества ал-

лергена включает в себя установление стерильности и специфической активности. Специфическую активность проверяют на здоровых и реагирующих на аллерген животных параллельно со стандартным аллергеном.

Контрольные вопросы

1. Проведите классификацию биопрепаратов по целевому назначению.
2. Какие требования предъявляются к живым аттенуированным вакцинам?
3. Какие требования предъявляются к инактивированным вакцинам?
4. Принцип получения гипериммунных сывороток.
5. С какой целью применяются антительные и антигенные диагностикумы?

РАЗДЕЛ ТРЕТИЙ

ЧАСТНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Тема 9

**МИКРООРГАНИЗМЫ —
ВОЗБУДИТЕЛИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

Возбудитель туберкулеза. Возбудитель — микроорганизм рода *Mycobacterium* (mycos — гриб, bacterium — палочка), включает в себя много видов (49), как патогенных, так и непатогенных. К патогенным относятся микобактерии, вызывающие туберкулез у людей (*Myc. tuberculosis*), у животных (*Myc. bovis*), в частности у птиц (*Myc. avium*), у мышей (*Myc. murium*).

Наряду с истинными возбудителями туберкулеза человека и животных с объектов внешней среды изолируют так называемые атипичные, неклассифицированные микобактерии, отличающиеся по своим свойствам от туберкулезных и друг от друга.

Туберкулез — инфекционная, хронически протекающая болезнь человека, животных, в том числе птиц, особенно кур. Патологоанатомически он характеризуется образованием туберкул (бугорков) и творожисто перерожденных туберкулезных очагов. Возбудителей туберкулеза человека и крупного рогатого скота открыл Р. Кох в 1882 г. Птичий вид установили Штраус и Гамалея (1891).

Морфология. Микобактерии туберкулеза — кислото-, спирто- и щелочеустойчивые микроорганизмы, неподвижны, спор и капсул не образуют, жгутиков не имеют. Их типичная форма — стройные или слегка изогнутые палочки. В электронном микроскопе микобактерии всех видов имеют вид палочки с закругленными концами. Размеры клеток одной и той же культуры могут значительно варьироваться: длина от 1,5 до 4,0; ширина от 0,2 до 0,5 мкм.

Микобактерии характеризуются высоким содержанием липидов (от 30,6 до 38,9%), вследствие этого с трудом вос-

принимают анилиновые красители. Для окрашивания применяют метод окраски по Циль-Нильсену, который основан на применении концентрированного карболового фуксина при подогревании.

Культивирование. Микобактерии туберкулеза способны размножаться в строго аэробных условиях на соответствующих элективных питательных средах. Следует отметить, что микобактериям туберкулеза присущ медленный обмен веществ, а следовательно, они характеризуются замедленным ростом культур на средах. Рост их проявляется через 7–30 дней и более.

Устойчивость. Микобактерии туберкулеза обладают значительной устойчивостью к химическим и физическим воздействиям, особенно к высушиванию. В высушенной мокроте, кусочках пораженной ткани, пыли микобактерии жизнеспособны от 2 до 7 мес. и более. В воде микроб выживает 5 мес., в почве — 7 мес., при гниении материала — 76–167 дней и дольше. Холод не влияет на жизнеспособность микобактерий.

Микобактерии весьма чувствительны к воздействию прямых солнечных лучей, в жаркие дни, в мокроте они погибают через 1,5–2 ч. Особенно губительны для микобактерий ультрафиолетовые лучи. Большое значение в санитарно-профилактическом отношении имеет высокая чувствительность микобактерий к нагреванию. Во влажной среде микобактерии гибнут при 60°C в течение 1 ч, при 65°C — через 15 мин, при 70–80°C — через 5–10 мин. В свежем молоке возбудитель туберкулеза сохраняется 9–10 дней, в скисшем молоке гибнет под воздействием молочной кислоты. В масле микобактерии сохраняются неделями, а в некоторых сырах — даже месяцами. Микобактерии туберкулеза по сравнению с другими неспорообразующими бактериями значительно более устойчивы к химическим дезинфицирующим веществам, 5% -ный раствор фенола и 10% -ный раствор лизола разрушают возбудителя через 24 ч, 4% -ный формалин — после 12 ч.

Из дезинфицирующих растворов при туберкулезе рекомендуют: 15% -ный раствор смеси, приготовленной из равных частей сернокарболовой кислоты и 16% -ного раствора гидроксида натрия, время воздействия до 4 ч; 3% -ный щелочной раствор формальдегида при 3-кратном нанесении на объект

и 3 часовой экспозиции; хлорную известь в виде порошка, растворов и взвесей, содержащих не менее 5% активного хлора при экспозиции не менее 3 ч; 3–5%-ный раствор хлорамина Б.

Лабораторная диагностика. Выделить чистую культуру возбудителя туберкулеза трудно. Для исследования посылают пораженные органы и ткань, молоко, навоз, почву, соскобы с различных объектов животноводческих помещений. В каждом случае необходимо выбирать соответствующий метод обработки материала для уничтожения сопутствующей микрофлоры.

Бактериологическая диагностика проводится по обычной схеме: готовят мазки из исследуемого материала, окрашивают по Циль — Нильсену, делают посев на специальные питательные среды, заражают восприимчивых лабораторных животных.

Аллергическая диагностика туберкулеза. В практике ведущее значение для прижизненного распознавания туберкулеза у животных и птиц имеет аллергическая диагностика при помощи туберкулина (Р. Кох, 1890). Диагностика с помощью туберкулина завоевала прочное положение в медицине и ветеринарии. В настоящее время основным методом проверки животных на туберкулез является внутрикожная туберкулиновая проба. Диагностический препарат туберкулин готовят только из штаммов одного бычьего вида.

Иммунитет и средства специфической профилактики. При туберкулезе он не стерильный, длящийся до тех пор, пока в организме находятся живые микобактерии туберкулеза.

Живую вакцину против туберкулеза (БЦЖ) предложили в 1924 г. французские ученые Кальметт и Герен.

В ветеринарной практике вакцину БЦЖ применяют в неблагополучных по туберкулезу хозяйствах в соответствии с наставлением, утвержденным в 1985 г. (М. А. Сафин).

Возбудитель сибирской язвы — *Bacillus anthracis* (Р. Кох, 1872) — типичный представитель патогенных бацилл. Относится к семейству *Bacillaceae* и роду *Bacillus*. Этот микроб часто называют бациллой антракса.

Сибирская язва (Anthrax) — зооантропоноз. К ней восприимчивы животные многих видов, особенно травоядные, и человек. Инфекционный процесс протекает преимущественно остро с явлениями септицемии или с образованием различ-

ной величины карбункулов. Болезнь регистрируют в виде спорадических случаев, возможны энзоотии и даже эпизоотии. Название болезни (сибирская язва) предложил в 1789 г. С. С. Андриевский, который изучал ее на Урале и в Сибири.

Морфология. Бацилла антракса — довольно крупная (3,0–10,0 мкм) палочка, неподвижная, образующая капсулы и споры. Микроб встречается в трех формах: в виде вегетативных различной величины клеток (капсульных и бескапсульных) и в виде спор.

Культивирование. Сибиреязвенный микроб по способу дыхания относят к факультативным аэробам: он одинаково хорошо развивается в условиях повышенной аэрации, в том числе и в атмосфере кислорода, и в анаэробных условиях.

Бацилла антракса нетребовательна к питательным средам и хорошо растет на универсальных средах (МПБ, МПА, МПЖ, картофеле, молоке).

Устойчивость. Устойчивость и длительность выживания у вегетативных клеток и спор возбудителя сибирской язвы различны. Первые относительно лабильны, вторые достаточно устойчивы и сохраняются в почве веками.

Лабораторная диагностика. При подозрении на сибирскую язву категорически запрещается вскрывать трупы павших животных. Для лабораторного исследования на сибирскую язву чаще всего направляют ухо павшего животного. Исследуют также пробы почвы, фуража, воды, шерсти и кожевенно-мехового сырья; объектами для серологического исследования в реакции преципитации служат пробы кожевенно-мехового сырья и разложившиеся ткани.

Исследование проводят по схеме: микроскопия мазков, выделение и изучение свойств чистой культуры, биопроба на лабораторных животных, при необходимости применяют серологические исследования — реакцию преципитации и иммунофлюоресцентный анализ.

Иммунитет и средства специфической профилактики. В результате естественного заражения и переболевания сибирской язвой у животных возникает длительный иммунитет.

Активная защита животных от сибирской язвы проводится путем вакцинации, в настоящее время применяют вакцину

из бескапсульного авирулентного штамма 55. Вакцину вводят животным, начиная с 3-месячного возраста, однократно, подкожно. Иммунитет наступает через 10 суток и сохраняется около 1 года.

Для лечения и пассивной профилактики применяют антибиотики, противосибиреязвенную сыворотку и гамма-глобулин. Пассивный иммунитет наступает через несколько часов и сохраняется до 14 дней.

Возбудитель колибактериоза. Возбудитель колибактериоза — *Escherichia coli*. Впервые ее выделил в 1885 г Т. Эшерих из фекалий больного ребенка. *Колибактериоз* (колиэнтерит, колисептицемия, эшерихиоз, колиинфекция) — остропротекающая инфекционная болезнь молодняка сельскохозяйственных животных, включая птиц и пушных зверей. Возбудитель болезни — патогенные серологические варианты *E. coli*. Болезнь протекает в септической, энтеротоксемической и энтеритной формах. У поросят отъемного возраста болезнь иногда проявляется в виде отечной формы при 100%-ной летальности. У молодняка птиц колибактериоз протекает преимущественно в септической, а у взрослых — в хронической форме.

Морфология. *E. coli* — полиморфные палочки с закругленными концами, длиной 1–3 и шириной 0,3–0,6 мкм. Располагаются одиночно, реже парно. По Граму красятся отрицательно, спор не образуют, отдельные серовары (08, 09, 0101) образуют капсулы, подвижные (перетрихи), но встречаются и неподвижные.

Культуральные свойства. *E. coli* — аэроб или факультативный анаэроб, оптимальная температура роста 37–38°C, рН среды 7,0–7,4. Хорошо растет на обычных питательных средах — МПА, МПБ. На МПА через 24 ч появляются сочные, круглые, с ровными краями (S-форма), серо-белого цвета колонии. В МПБ — интенсивное помутнение среды и наличие незначительного осадка, легко разбивающегося при встряхивании.

Устойчивость. Эшерихии устойчивы к воздействию факторов внешней среды. В почве они сохраняют жизнедеятельность от 6 до 11 мес., в навозе — до 11 мес., в воде — до 300 дней. Неустойчивы к воздействию высокой температуры. При нагревании среды до 60°C погибают в течение 10 мин,

при 100°С — моментально. Губительно действуют многие дезинфицирующие растворы: 2% -ный раствор активного хлора; 2,5% -ный раствор формальдегида, 2% -ный раствор гидроокиси натрия, 3% -ный раствор однохлористого йода.

Лабораторная диагностика. Для бактериологического исследования в лабораторию направляют свежий труп или тяжелобольное животное. Если доставить труп невозможно, то посылают голову (головной мозг), трубчатую кость и кусочки паренхиматозных органов. Для диагностики колибактериоза птиц, кроме свежих трупов, направляют 5–6 больных птиц.

Бактериологический диагноз на колибактериоз у млекопитающих считают установленным при выделении культур эшерихий из селезенки, костного или головного мозга без определения их патогенности и серологической принадлежности; при выделении не менее чем из двух органов больного животного кишечной палочки, патогенной для белых мышей или принадлежащих к патогенным O-серогруппам. У птиц — при выделении патогенных для цыплят эшерихий из костного мозга, крови или печени.

Иммунитет и средства специфической профилактики. Известно, что у новорожденных факторы естественной защиты развиты еще слабо и не в состоянии обеспечить защиту от патогенных эшерихий. Поэтому в неблагополучных хозяйствах с целью создания колострального иммунитета вакцинируют стельных коров, супоросных свиноматок, суягных овец. За 1–2 мес. до отела, опроса, окота вводят ГОА-формолтиомерсоловую вакцину согласно наставлению. Для профилактики и терапии колибактериоза используют поливалентную иммунную сыворотку согласно наставлению. С целью профилактики применяют бактериофаг паратифа и колибактериоза с питьем по определенной схеме в течение нескольких дней. Из средств активной терапии используют антибиотики с учетом чувствительности к ним эшерихий.

Возбудитель сальмонеллеза. Американские ветеринарные врачи Сальмон и Смит в 1885 г. выделили из органов свиней, павших от чумы, микроб, названный позже *Bact. suipestifer*. В 1888 г. Гертнер при выяснении этиологии пищевого отравления людей обнаружил один и тот же микроб в мясе коровы и селезенке умершего человека. Он был назван *Bact. enteritidis*.

В 1892 г. Леффлер выделил от павших мышей микроб, получивший название *Bact. typhimurium*. В честь Сальмона микроорганизм, выделенный им, был назван сальмонеллой, а пищевое отравление, вызываемое микробом, — сальмонеллезом.

В настоящее время известно более двух тысяч серовариантов сальмонелл, объединенных в один род — *Salmonella*. Род включен в семейство *Enterobacteriaceae*.

Сальмонеллезы — группа инфекционных болезней преимущественно молодняка сельскохозяйственных и промысловых животных (телят, поросят, жеребят, ягнят, пушных зверей, птиц).

Морфология. Сальмонеллы — мелкие палочки с закругленными концами от 1 до 4 мкм длины и 0,3–0,8 мкм ширины, в мазках располагаются одиночно, беспорядочно, подвижны (за исключением *S. pullorum-gallinarum*), спор и капсул не образуют, по Граму красятся отрицательно.

Культуральные свойства. Сальмонеллы — аэробы и факультативные анаэробы, оптимальная температура роста 37°C, рН среды 7,0–7,2. Хорошо растут на обычных питательных средах: МПА и МПБ, на дифференциально-диагностических и элективных средах Эндо, Левина, Плоскирева, висмут-сульфитном агаре.

Устойчивость. Сальмонеллы устойчивы к воздействию факторов внешней среды. При температуре 60°C погибают в течение 1 ч, при 100°C — моментально. В почве и других объектах внешней среды сохраняются от 30 до 270 дней, в трупах — до 100 дней, в открытых водоемах и питьевой воде — от 11 до 120 дней, в замороженном мясе — от 6 до 13 мес., в колбасных изделиях — от 60 до 130 дней, в яйцах — до 13 мес., в яичном порошке — до 9 мес., на замороженных овощах и фруктах — от 2 недель до 2,5 мес.

Лабораторная диагностика. Бактериологическая прижизненная диагностика основана на исследовании крови в первые четыре дня заболевания, истечений из родовых путей, носовой слизи и фекалий. Для серологического исследования с целью выявления специфических антител посылают сыворотку крови на 10–14 день болезни. Посмертно в лабораторию направляют свежий труп мелких животных, в том числе птиц, от трупов крупных животных — паренхиматозные органы или части их.

Полученный материал засевают в МПБ и МПА в пробирках, на дифференциальные и элективные среды — Эндо, Плоскирева или висмут-сульфитный агар (ВСА). При подозрении на хроническое течение болезни дополнительно высевают материал на одну из сред накопления (селенитовую, Мюллера). Сыворотку крови исследуют в РА с фабричным сальмонеллезным антигеном для установления титра специфических антител.

Возбудитель бруцеллеза. Бруцеллы обнаружил Брюс в 1886 г, микроскопируя мазки из селезенки солдата, умершего от мальтийской лихорадки, а в 1887 г. он выделил чистую культуру возбудителя, который назвал *Micrococcus melitensis*. Банг и Стриболт (1897) из околоплодной жидкости коровы выделили второй вид *Vac. abortus suis*. В 1920 г. Майер и Фезье объединили микробы в одну группу и назвали бруцеллами в честь открывшего их Брюса. Они отнесены к роду *Brucella*, в который входят: *B. abortus* — возбудитель бруцеллеза крупного рогатого скота; *B. melitensis* — овец и коз; *B. suis* — свиней.

Бруцеллы являются возбудителями *бруцеллеза* — хронической инфекционной болезни животных и человека, проявляющейся абортными, эндометритами, задержанием последа, орхитами, рецидивирующей лихорадкой, у лошадей — преимущественно бурситами в области холки и воспалением связок затылочного сустава. *B. ovis* вызывает эпидидимит у баранов, яловость, аборты и рождение нежизнеспособных ягнят.

Морфологии. Бруцеллы — мелкие коккобактерии (0,3–0,6 мкм) или палочки (0,6–2,5 мкм), в окрашенных препаратах располагаются одиночно, парами и небольшими группами. Бруцеллы не подвижны, спор не образуют. Мукоидные и гладкие варианты синтезируют нежную микрокапсулу.

Культивирование. Бруцеллы могут расти на обычных питательных средах при температуре 36–38°C и pH 6,8–7,2, однако для их культивирования используют специальные среды: мясо-пептонный печеночный бульон (МППБ), мясо-пептонный печеночно-глюкозно-глицериновый агар (МППГА), печеночно-глюкозно-глицериновый бульон и агар (ПГТБ, ПГГА) с 1% глюкозы и 2–3% глицерина, картофельный агар, сывороточно-декстрозный агар и др.

Устойчивость. Бруцеллы малоустойчивы к действию различных физических и химических факторов.

Иммунитет и средства специфической профилактики. Иммунитет при бруцеллезе клеточный и обеспечивается Т-системой лимфоцитов.

Для специфической профилактики бруцеллеза были предложены живые и убитые вакцины. Применяется живая вакцина из штамма 19 *Br. abortus*.

У нас в стране кроме указанной вакцины в производственных условиях широко применяют сухую живую вакцину из слабоагглютиногенного штамма 82 *Br. abortus* против бруцеллеза крупного рогатого скота и сухую живую вакцину из штамма Рев-1, приготовленную из бруцелл вида мелитензис против бруцеллеза мелкого рогатого скота.

Тема 10

МИКРООРГАНИЗМЫ — ВОЗБУДИТЕЛИ ГРИБКОВЫХ ИНФЕКЦИЙ (ДЕРМАТОМИКОЗОВ)

Возбудители трихофитии. *Трихофития* — *Trichophytia* (стригущий лишай) — заразная болезнь, характеризующаяся появлением на коже резко ограниченных безволосых очагов с шелушащейся отрубевидной поверхностью или с выраженной воспалительной реакцией кожи и фолликулов.

Трихофитию у животных вызывают грибы, относящиеся к роду *Trichophyton*. У крупного рогатого скота трихофитию вызывают *Tr. faviforme* и *Tr. tonsurans*. В нашей стране крупный рогатый скот чаще всего поражает гриб *Tr. verrucosum*.

Культивирование осуществляют на глюкозном агаре, среде Сабуро или сусло-агаре с оптимальным для них рН 6,5–6,8, при температуре 26–28°C.

Устойчивость. Находясь под защитой роговых масс волоса, возбудители трихофитии сохраняют вирулентность до 4–7 лет, а споры — до 9–12. При температуре 60–62°C гриб погибает в течение двух часов, а при 100°C — в течение 15–20 мин.

При воздействии щелочного раствора формальдегида в соотношении 1:2, горячего 10%-ного раствора серно-карболовой смеси при двукратном нанесении грибы погибают в течение 1 ч.

Диагноз ставят на основании характерных клинических признаков и эпизоотологических данных. В сомнительных случаях проводят микроскопические исследования соскобов кожи и волос из пораженных участков.

Иммунитет и средства специфической профилактики. Животные, переболевшие трихофитией в первый год жизни, повторно не болеют. Зарегистрированы отдельные случаи естественной невосприимчивости животных как к трихофитии, так и к микроспории.

Для специфической профилактики трихофитии в неблагополучных хозяйствах используют вакцины ЛТФ-130. Телятам их вводят в область крупа двукратно с интервалом 10–14 дней в дозах 5, 8, 10 мл, в зависимости от возраста. Через месяц у животных формируется иммунитет длительностью не менее 4 лет.

При появлении болезни больных животных изолируют и лечат с помощью юглона, препарата РОСК, однохлористого йода, фенолтиазина, трихотецина, условно здоровых вакцинируют.

Возбудители микроспории — *Microsporiasis* (микроспороз или стригущий лишай) — заразная болезнь кожи и волос, клинически характеризующаяся образованием очагов поверхностного воспаления кожи, обламыванием волос и поражением ногтей. Восприимчивы лошади, кошки, собаки, от которых заражаются дети. Возбудители микроспории — грибы из рода *Microsporum*.

Устойчивость. Споры гриба в пораженных волосах, кожных соскобах способны сохраняться до 2–5 лет. В сухожаровых камерах при температуре 140°C гриб погибает за 30 мин, при 80°C — за 2 ч, при кипячении — за 2–3 мин. Под действием 3% -ного раствора формальдегида и 5–8% -ных растворов гидроксида натрия грибы погибают в течение 20–30 мин.

Диагноз ставят на основании характерных клинических признаков и эпизоотологических данных. В сомнительных случаях проводят микроскопические исследования соскобов кожи и волос с пораженных участков.

С целью дифференциации грибов рода *Trichophyton* от *Microsporum* у кошек и собак используют люминесцентный метод: исследуемый материал рассматривают под ультрафиолетовым излучением ртутно-кварцевой лампы типа ПРК-4

с фильтром Вуда на расстоянии 20 см в затемненной комнате. Пораженные возбудителем микроскопии волосы дают яркое зеленоватое свечение, споры трихофитон свечение не дают.

Для специфической профилактики применяют вакцину «Ментовак». С лечебной целью используют мазь юглон или 2% -ную мазь перихотетина на рыбьем жире, препарат РОСК. На протяжении 2–3 недель с кормом задают гризеофульвин из расчета 25–30 мг на 1 кг живой массы.

Тема 11

МИКРООРГАНИЗМЫ — ВОЗБУДИТЕЛИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ. БАКТЕРИОФАГИ

Вирус бешенства. Вирус бешенства вызывает остро протекающую болезнь теплокровных животных, характеризующуюся поражением ЦНС. Восприимчивы домашние и дикие животные всех видов и человек.

Вирус относится к семейству рабдовиридае, роду лисса-вирусы, имеет пулевидную форму, длина — 180 нм, содержит РНК, количество капсомеров 1200–1700, спиральный тип укладки, имеет наружную оболочку с булавовидными выпячиваниями, является чувствительным к эфиру, хлороформу, фенолу и формалину, репродукция происходит в цитоплазме нервных клеток.

Устойчивость. Низкие температуры консервируют вирус, высокие — инактивируют. Вирус быстро инактивируется при воздействии обычно используемых дезинфицирующих растворов лизола (1–2% -ный), щелочей, формалина, хлорамина (2–3% -ный). Наилучшим консервантом вируса является 50% -ный глицерин.

Культивирование. Вирус бешенства хорошо культивируется на естественно-восприимчивых животных, белых мышцах, кроликах, развивающихся куриных эмбрионах и культурах клеток.

Клинические признаки. Инкубационный период при бешенстве может варьироваться в пределах от нескольких дней до года и более, но чаще всего составляет 3–6 недель. Его продолжительность зависит от места и силы укусов, количества и вирулентности внесенного в рану вируса, степени устойчивости покусанного животного или человека. Срок инкубации

у молодняка короче, чем у взрослых животных. Для бешенства характерно острое течение. Клинические признаки в принципе сходны у животных всех видов, но лучше изучены у собак. Они у них обычно проявляются в буйной или тихой форме, очень редко в атипичной форме.

Методы диагностики. Предположительный диагноз на бешенство ставят на основании эпизоотологических данных и клинических признаков болезни. Окончательный диагноз ставят на основании результатов лабораторных исследований (обнаружение телец Бабеша — Негри в мозговой ткани, выделения вируса из исследуемого материала).

Лечение больных животных не проводят. Заболевших животных немедленно убивают, так как их передержка связана с риском заражения людей.

В настоящее время для специфической профилактики бешенства применяют инактивированные и живые вакцины.

Профилактика. Со времени изготовления Пастером в 1885 г. первой вакцины против бешенства, историю антирабических вакцин можно разделить на три периода:

1) до 1948 г., когда вакцины готовили из мозга взрослых животных (кролики, овцы, козы), в которых вирус частично инактивирован (фенолом, эфиром, хлороформом);

2) с 1949 по 1955 г., когда готовили живые аттенуированные вакцины;

3) с 1956 г. — живые или инактивированные вакцины из штаммов вируса бешенства, адаптированных в культуре клеток.

В последние годы разработаны генноинженерные (рекомбинантные) вакцины с использованием в качестве вектора вируса оспы.

В настоящее время для специфической профилактики бешенства применяют инактивированные вакцины.

Вирус гриппа. Все вирусы гриппа относятся к семейству *Orthomyxoviridae* и включают три рода — род вирусов гриппа А, В и С. Эти вирусы относятся к РНК-содержащим, РНК-однонитевая, содержат 32 капсомера со спиральным типом укладки и вторую оболочку, размеры вирионов составляют от 80 до 120 нм.

Устойчивость. Вирусы гриппа устойчивы к эфиру, хлороформу, термолабильны, чувствительны к кислотам,

протеолитическим и липолитическим ферментам. Растворы хлорамина, хлорной извести, формалина, карболовой кислоты в принятых для дезинфекции концентрациях инактивируют возбудитель за 5–10 мин.

Культивирование. Культивирование вирусов гриппа хорошо удается в организмах белых мышей, хомяков и хорьков при интраназальном заражении, на куриных эмбрионах при заражении их в аллантаоисную или амниотическую полости и в культурах клеток почек белых мышей, хомяков, поросят, телят и человека.

Клинические признаки. Инкубационный период при гриппе длится от 1 до 7 дней. На степень проявления клинических признаков заболевания большое влияние оказывают условия содержания, индивидуальная резистентность животных. Течение болезни может быть острым, подострым и хроническим. При типичном проявлении гриппа повышается температура. Слизистые оболочки глаз набухшие, отечные, из угла глаз выделяется серозно-катаральный экссудат, животные кашляют, чихают и т. д. Возможно поражение желудочно-кишечного тракта (поносы), развитие плевропневмонии. Гибель взрослых животных не превышает 2–4%, а молодняка до 70%, птиц до 100%.

Методы диагностики. Предварительный диагноз на грипп ставят на основании эпизоотологических, клинических и патологоанатомических данных. Для окончательного диагноза необходимо провести лабораторные исследования (РИФ, РГА, риноцитоскопия, выделение вируса и его идентификация).

Иммунитет. Приобретенный в естественных условиях иммунитет высоко-штаммспецифичен, длительность и напряженность его у животных и птиц мало изучены. Специфических средств лечения нет.

Для специфической профилактики гриппа животных и птиц применяются живые и инактивированные вакцины.

Вирус ящура. Вирус ящура относится к семейству пикорнавиридае, роду афтовирус. Вирионы ящура состоят из РНК и белковой оболочки, состоящей из 32 капсомеров, имеют сферическую (кубическую) симметрию. На долю белка приходится 68,5% вирусной частицы, а РНК — 31,5%. Размер вирионов около 20 нм.

Устойчивость. Вирус ящура сравнительно устойчив к факторам внешней среды. Не чувствителен к эфиру. В стенках афт он сохраняет вирулентность 67 дней, в навозной жиже — 39, в сточных водах — до 103 дней. Лучшие дезинфицирующие средства — 2–3%-ные горячие растворы NaOH и 1%-ный раствор формальдегида.

Методы культивирования. Вирус культивируется на естественно восприимчивых и лабораторных животных: новорожденных мышатах и крольчатах, морских свинках, хомяках 60-дневного возраста. Хорошо репродуцируется в культуре клеток почек чувствительных животных, в культуре эксплантантов эпителия языка крупного рогатого скота и в некоторых перевиваемых линиях клеток (ВНК-21, СПЭВ и др.) с выраженным ЦПД.

Клинические признаки и патологоанатомические изменения. Инкубационный период продолжается 1–3 дня, иногда до 7–10 дней. Самый характерный признак данного заболевания у животных — везикулярное поражение слизистых оболочек рта и кожи венчика и вымени. У крупного рогатого скота и свиней ящур протекает остро и, как правило, у взрослых животных доброкачественно. Заболевание быстро распространяется среди животных. В начале отмечают ухудшение аппетита, повышенную саливацию, повышение температуры тела (до 40,5–41,5°C). На 2–3-й день на внутренней поверхности губ и языка появляются афты. У некоторых животных афты образуются в области межкопытной щели и на вымени. Заболевание конечностей сопровождается хромотой. Через сутки афты разрываются и образуются эрозии. У молодняка ящур обычно протекает злокачественно (гибель 80% и более), как правило, афт нет, отмечают геморрагическое воспаление кишечника и дегенеративные изменения в мышце сердца («тигровое сердце»), подобные изменения находят и в скелетных мышцах.

Диагностика болезни осуществляется прежде всего на основании эпизоотологических данных, клинических признаков и патологоанатомических изменений. Лабораторные методы диагностики используются для уточнения поставленного диагноза и определения типов и вариантов (выделение вируса и идентификация его в РСК).

Иммунитет. Продолжительность иммунитета у животных, переболевших ящуром, составляет 8–12 мес., у свиней — 10–12, у овец — 18 мес. При ящуре возникает тканевой и гуморальный иммунитет.

Специфическая терапия и профилактика. Для лечения ящюра используют сыворотку (кровь) реконвалесцентов. Для специфической профилактики ящюра в нашей стране используются моновалентные гидроокисьалюминиевые формолвакцины из лапинизированного вируса ящюра, выращенного в организме 2–3-дневных крольчат, и тривалентная — типов А, О, С вакцина из вируса, культивируемого по методу Френкеля на эпителии языка крупного рогатого скота.

В последнее время для профилактики ящюра у крупного рогатого скота и овец стали использовать также бивалентную вакцину из культурального вируса. Сконструированы генно-инженерные и синтетические вакцины. Доказана возможность пассивной передачи поствакцинального клеточно-го иммунитета.

Бактериофаги. Бактериофагами называют вирусы бактерий. Явление бактериофагии изучали Н. Ф. Гамалея (1898), Ф. Творт (1915), Ф. Д’Эррель (1917). В результате агент, разрушающий бактерии, был назван бактериофагом (от *греч.* *phagos* — пожирающий).

Бактериофаг способен инфицировать бактериальную клетку, репродуцироваться в ней, образуя многочисленное потомство, и вызывать ее лизис, сопровождающийся выходом фаговых частиц в среду обитания бактерий.

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

Хозяевами бактериофагов являются эшерихии и сальмонеллы, стафилококки и стрептококки, микобактерии, листерии, коринебактерии и другие микроорганизмы. Взаимодействие фага с бактериальной клеткой определяется:

1) наличием рецепторов, на которых может фиксироваться фаг;

2) наличием в клеточной оболочке и цитоплазме ферментов, способствующих проникновению нуклеиновой кислоты фага, из которой строятся гены;

3) наличием в клетке ферментов, материалов и энергетических ресурсов, обеспечивающих синтез компонентов фага и формирование частиц фага (вирионов).

В зависимости от этого процесс взаимодействия фага с клеткой протекает по типу продуктивной инфекции или лизогении. В зависимости от этого различают вирулентные и умеренные фаги. *Вирулентные фаги* при проникновении в клетку бактерий размножаются в ней и вызывают лизис (растворение клетки); *умеренные фаги* не вызывают лизиса, а остаются в состоянии лизогении.

По степени специфичности фаги разделяют на три группы: полифаги — лизируют родственные бактерии, монофаги — лизируют бактерии только одного вида, а фаговары — только определенные варианты данного вида бактерий.

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

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

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

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

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

Пятая стадия — выход вирусных (фаговых) частиц из клетки. Он происходит в результате лизиса зараженных бактерий, за счет фагового лизоцима, накапливающегося в процессе репродукции фага. Количество зрелых вирионов у разных клеток различно — от единиц до нескольких тысяч.

Вирионы высвобождаются и вновь внедряются в еще не зараженные бактерии. Процесс вновь повторяется.

При внедрении умеренного бактериофага в микробную клетку она не лизируется и становится носителем бактериофага. Это явление получило название лизогении, а бактериальные культуры, обладающие этим свойством, называются лизогенными.

При лизогении бактериофаг находится в состоянии профага, при котором бактериальная клетка не погибает. Профаг представляет собой геном вируса, ассоциированный с бактериальной хромосомой. Поэтому профаг в отличие от генома вирулентного фага воспроизводится как часть бактериальной ДНК и синхронно с ней реплицируется.

Методы выделения и титрования фагов. Для выделения фагов обычно используют испражнения животных, гной ран, сточные воды, молоко, старые культуры и другие субстраты. Суспензии фильтруют через мелкопористые фильтры, поры фильтра не задерживают бактериофаги. Затем фильтрат вносят в соответствующие молодые бульонные культуры бактерий. При наличии фага в исследуемом материале бактерии растворяются, бульон просветляется, а на поверхности плотной питательной среды на месте нанесения фильтратов образуются стерильные пятна.

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

Контрольные вопросы

1. Какова схема микробиологической диагностики инфекционных болезней животных?
2. Какой материал берется для прижизненной и посмертной диагностики?
3. Какой характер роста микроорганизмов на плотной и жидкой питательной среде?
4. Каковы особенности выделения чистых культур в зависимости от вида возбудителя?
5. При каких инфекционных болезнях применяют аллергические методы диагностики?
6. С какой целью применяют вакцины и гипериммунные сыворотки?

РАЗДЕЛ ЧЕТВЕРТЫЙ

СПЕЦИАЛЬНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Тема 12

МИКРОБИОЛОГИЯ МОЛОКА И МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Молоко и источники его загрязнения. Молоко — секрет молочной железы млекопитающих. Состав коровьего молока: вода — 87,5%; молочный сахар — 4,7%; молочный жир — 3,8%; белки — 3,2%; минеральные вещества — 0,7%; витамины, ферменты.

«Молоко, — писал академик И. П. Павлов, — это изумительная пища, приготовленная самой природой». Установлено, что этот продукт содержит свыше ста ценнейших компонентов. В него входят все необходимые для жизнедеятельности организма вещества белки, жиры, углеводы, минеральные соли, витамины. Таким образом, в молоке природа «подобрала» все компоненты в очень удачных пропорциях.

Молоко является хорошей средой для размножения и сохранения микроорганизмов. Получить стерильное молоко невозможно, так как в сосковом канале (сообщающемся с внешней средой) находятся представители нормальной микрофлоры вымени: маммококки, микрококки, молочнокислые стрептококки и палочки.

Происхождение микрофлоры молока. Источники загрязнения. Молоко по составу представляет благоприятную среду для развития и размножения различных микроорганизмов, поэтому в нем всегда можно встретить то или иное количество микробов.

Молоко на пути от вымени до потребителя соприкасается с целым рядом источников загрязнения. Эти источники

далеко не равноценны как по обилию, так и по видовому составу попавших бактерий.

Микрофлора, получаемая молоком из вымени. Этот источник поставлен на первое место в силу его чрезвычайного постоянства и абсолютной неустранимости. В сосковом канале всегда содержатся бактерии: облигатные — микрококки, маммококки (кокки вымени безвредны) и факультативные — молочнокислые стрептококки, могут попасть и патогенные стафилококки и стрептококки. Они образуют бактериальную пробку соскового канала, если ее не сдаивать отдельно, то это приведет к увеличению количества бактерий в общем удое на 5%.

Большое влияние на бактериальное загрязнение молока при доении оказывает и санитарное состояние животных: кожа животного, руки доярки, пыль от подстилок, молочное оборудование и посуда.

Кожа животного как источник загрязнения характеризуется обилием и трудной устранимостью. Ввиду загрязнения кожи частицами навоза во время дойки с поверхности кожи на молоко, должно быть, падает «настоящий дождь» из энтерококков, кишечных палочек, дрожжей и плесневых грибов, аэробов и анаэробов и др. (перечень этих микроорганизмов очень важен, так как именно они будут составлять нормальную микрофлору молока). Следовательно, степень бактериального загрязнения молока зависит от способа обработки вымени перед доением. На практике часто для обмывания вымени используют одно ведро, одно полотенце для всей группы, на 1 см² такого полотенца может быть обнаружено 214 млн бактерий.

При машинном доении коров исключаются многие источники загрязнения, однако при содержании доильных аппаратов в антисанитарном состоянии они становятся значительным источником микробного загрязнения (в основном психрофильных бактерий). Например, если после дезинфекции 0,2% раствором хлорамина новые молочные шланги становятся почти стерильными, то на старых шлангах, имеющих на внутренней поверхности трещины, после такой же обработки обнаруживалось на 1 см² до 940 тыс. бактерий. Таким образом, роль молочной аппаратуры двойственна: с одной

стороны, молочная аппаратура является наиболее совершенной защитой от загрязнения, а с другой — она может отдать молоку свою собственную микрофлору.

Источником загрязнения молока может быть пыль, образующаяся при раздаче кормов и сухой уборке. Применение в качестве подстилки прелой соломы увеличивает число микроорганизмов, особенно спорообразующих и плесневых грибов в воздухе, вместе с пылью в молоко попадают и микробы.

Рекомендуется в качестве подстилки использовать свежую солому, опилки или торф, которые хорошо поглощают влагу, газы и в некоторой степени препятствуют развитию гнилостных и патогенных микроорганизмов.

Можно сделать вывод, что источники загрязнения могут быть устранены при соблюдении зоогигиенических правил содержания коров и процесса получения молока. Познакомившись с источниками загрязнения молока, мы имеем представление о составе микрофлоры свежего молока.

Изменения микрофлоры молока при хранении и транспортировке. Количественные и качественные изменения микрофлоры молока зависят от температуры, продолжительности хранения и состава ее при получении. Так, при хранении молока при 10°C происходит последовательная смена фаз.

Бактерицидная фаза — сущность этой фазы в том, что количество микроорганизмов в свежесвыдоенном молоке в процессе хранения уменьшается. Эти свойства молока объясняются наличием в молоке различных противомикробных веществ: лактенинов, бактериолизининов и лизоцима. Продолжительность бактерицидной фазы изменяется в широких пределах и зависит от следующих факторов:

1) количества бактерий, попавших в молоко во время дойки;

2) температуры хранения и скорости охлаждения (бактерицидные свойства молока сохраняются в течение суток, если температура не выше $4 \pm 2^\circ\text{C}$, и только 6 ч — при температуре 25°C);

3) от индивидуальных свойств организма животного и периода лактации.

Фаза смешанной микрофлоры. После окончания бактерицидной фазы, когда в молоке уже нет веществ, задержива-

ющих развитие микробов, а температура хранения выше 10°C, в молоке начинают размножаться все оставшиеся к этому моменту микроорганизмы. Эта фаза является периодом наиболее быстрого возрастания числа микроорганизмов. В течение этого периода, который продолжается 12–18 ч, микрофлора возрастает в сотни тысяч раз. Рассматриваемая фаза смешанной микрофлоры с практической точки зрения особенно важна, так как именно в этой фазе молоко попадает к потребителю.

Молочнокислая фаза. За начало этой фазы принимается момент, когда в молоке обнаруживается заметное нарастание кислотности. С определенного момента перевес над всеми имеет *Str. lactis*, по мере их размножения кислотность молока снижается до рН 4,0. Такая кислотность неблагоприятна для стрептококков, для которых 120° по Тернеру является губительной, на смену им начинают развиваться кислотоустойчивые (рН до 3,6) молочнокислые палочки, для которых пределом кислотности является 200–300° по Тернеру. Таким образом, здесь можно говорить о двух ясно различимых фазах, сменяющих одна другую в определенной последовательности. Повышение кислотности оказывается губительным для гнилостной микрофлоры, а также для бактерий группы кишечной палочки.

Продолжительность молочнокислой фазы дольше, чем какой-либо другой фазы, может тянуться месяцами без заметного изменения в микрофлоре при соответствующей температуре. Но надо учитывать, что молочнокислая фаза в целом охватывает то состояние молока, в котором оно квалифицируется уже как кисломолочный продукт.

Фаза развития плесневых грибов и дрожжей. Эта фаза не представляет практического интереса, и вряд ли придется наблюдать ее в практических условиях (мы даем ее для полноты картины). Обычно молоко не доживает до этой фазы, будучи потребленным в течение молочнокислой фазы. Внешняя картина развития этой фазы такова: еще во время молочнокислой фазы на поверхности сгустка образуются отдельные колонии *Oidium lactis*, постепенно смыкающиеся в сплошную белую пушистую пленку. В это же время можно наблюдать появление пленчатых дрожжей, позднее появля-

ются пигментированные колонии плесневых грибов *Penicillium*, *Aspergillus*, вытесняющие *Oidium*. В молоке появляется прогоркание за счет разлагающегося жира, «плесневый» и «дрожжевой» привкусы. Затем над плесневой пленкой начинают появляться первые признаки разложения белков, пептонизации в виде жидкости от светло-желтого до темно-бурого цвета. Слой жидкости увеличивается за счет сгустка и в конце концов от сгустка не остается и следа: все превращается в бурую жидкость, закрытую сверху толстой пленкой плесени.

Нормальная микрофлора молока. Вся микрофлора молока делится на нормальную и аномальную. К нормальной микрофлоре относится такая, которая постоянно присутствует в молоке, это молочнокислые бактерии, микрококки, сарцины, энтерококки, бактерии группы кишечных палочек, маслянокислые бактерии, гнилостные бактерии, плесневые грибы и дрожжи.

Из перечисленных видов особый интерес представляют молочнокислые бактерии. Как показывает их название, основным продуктом их жизнедеятельности является молочная кислота. Молочнокислые бактерии применяются при изготовлении кисломолочных продуктов, в сыроделии, маслоделии. Поэтому мы дадим подробную характеристику молочнокислым бактериям. Все молочнокислые бактерии объединены в семейство:

<i>Lactobacteriaceae</i>	
Род <i>Streptococcus</i>	Род <i>Lactobacterium</i>
<i>Str. lactis</i> <i>Str. cremoris</i> <i>Str. thermophilus</i>	<i>L. acidophilum</i> <i>L. bulgaricum</i> <i>L. casei</i>

Пороки молока микробного происхождения. При длительном хранении молока в нем начинают проявляться признаки порчи, вызванные размножением вышеперечисленной микрофлоры. Характер порчи зависит от температуры хранения и вида преобладающих микроорганизмов.

Аммонификаторы (гнилостная микрофлора) могут размножаться при низкой температуре хранения молока, так

как относятся к психрофильным бактериям. В процессе разложения белков изменяется консистенция молока, появляется горечь.

Маслянокислые бактерии широко распространены в природе. Они обнаруживаются в большом количестве на предметах ухода, в кормах и при несоблюдении санитарных условий попадают в молоко. При пастеризации споры маслянокислых бактерий не погибают, при длительном хранении молока они расщепляют лактозу до масляной кислоты и газа, придающих молоку прогорклый вкус и запах.

Плесневые грибы образуют островки колоний на поверхности свернувшегося молока, придают ему горький вкус и плесневый запах. Наличие плесени свидетельствует о длительном хранении молочного продукта при низкой температуре.

Кишечная палочка, находящаяся в молоке в больших количествах, придает ему стойловый запах, а при благоприятной температуре сбразивает лактозу с образованием кислоты и газа. Молоко, содержащее кишечную палочку, нельзя использовать для приготовления кисломолочных продуктов, сыров, так как вызывает в них пороки.

Возбудители инфекционных болезней, передаваемые через молоко. Возбудители инфекционных болезней попадают в молоко от больных животных, из окружающей среды во время транспортировки или переработки. Микробы, передаваемые через молоко, делятся на две группы. В первую входят возбудители *зооантропонозов* — болезней, общих для животных и человека. Зооантропонозы передаются от одного вида животного к другому и от животного к человеку. К ним относятся: возбудители туберкулеза, бруцеллеза, сибирской язвы, ящура и др. Во вторую группу входят возбудители *антропонозов* — болезней, которые передаются от человека к человеку (дизентерия, дифтерия, брюшной тиф, скарлатина).

При попадании патогенных возбудителей от больных людей и животных в молоко происходит их размножение и накопление в молоке токсинов, что приводит к возникновению пищевых токсикоинфекций при употреблении такого молока.

Дезинфекцию на молочных фермах следует рассматривать как важную меру, дополняющую пастеризацию молока

и направленную на предупреждение зооантропонозов, которые передаются человеку через молоко, включая сальмонеллез. Доильные аппараты, ведра, бидоны и другие емкости следует дезинфицировать; для этого применяют различные химические средства, например кальцинированную соду и гидроксид калия.

Сохранение молока физическими методами. Молоко, поступающее на молочные заводы, характеризуется значительным бактериальным загрязнением (от сотен тысяч до миллионов в 1 мл), особенно в жаркое время года. Бактериальное загрязнение молока может быть значительно снижено, если на всем пути от вымени до потребителя будет соблюдаться санитарно-гигиенический режим и своевременное охлаждение молока. Особенно эффективно действует глубокое охлаждение на ферме непосредственно после дойки, так как этим удлиняется и используется бактерицидная фаза. Хранить молоко следует при температуре не выше $4 \pm 2^\circ\text{C}$.

Высокая температура в отличие от холода вызывает гибель микробов, что повышает стойкость продукта, поэтому обработка молока таким методом получила широкое распространение.

Кипячение молока, хотя и обеспечивает высокий стерилизующий эффект, не может быть рекомендовано для молочной промышленности, так как при этой температуре в значительной степени разрушаются витамины, денатурируются белки, нарушается гомогенность жировой эмульсии, поэтому вместо кипячения применяют пастеризацию молока, после которой сохраняется биологическая ценность продукта. Существует несколько режимов пастеризации молока от здоровых животных:

- 1) длительная — $63\text{--}65^\circ\text{C}$ в течение 30 мин;
- 2) кратковременная — $74\text{--}78^\circ\text{C}$ в течение 15–20 с;
- 3) моментальная — $85\text{--}90^\circ\text{C}$ без выдержки.

При правильно проведенной пастеризации погибает около 99% содержащихся в молоке бактерий, в том числе бесспорные патогенные виды (возбудители туберкулеза, бруцеллеза, сальмонеллеза, гноеродные кокки), кишечная палочка и молочнокислые бактерии.

После пастеризации молоко, сливки необходимо охладить до $+4^{\circ}\text{C}$, чтобы предотвратить прорастание спор и размножение сохранившейся термофильной микрофлоры.

Хранение пастеризованного молока при комнатной температуре дает возможность беспрепятственно размножаться гнилостным бактериям и патогенным, если они там остались, так как бактерицидные свойства в пастеризованном молоке инактивированы. Пастеризованное молоко не скисает, но может подвергнуться гнилостному разложению (пептонизации) и приобрести ядовитые свойства при длительном хранении в холодильнике.

Стерилизация молока предусматривает полное уничтожение вегетативных и споровых форм бактерий, что позволяет хранить такое молоко длительное время.

Ультравысокотемпературная обработка (УВТ) — нагревание молока до 140°C в течение одной секунды происходит в трубчатых аппаратах путем введения химически чистого пара непосредственно в молоко в условиях полностью закрытого автоматизированного процесса. Этим устраняются окислительные процессы, приводящие к разрушению витамина С, удаляются летучие вещества кормового и стойлового происхождения. Такое молоко может храниться длительное время. В результате такой обработки погибают и споры, а все полезные вещества и микроэлементы в молоке сохраняются. При изготовлении такого молока используется только высококачественное сырье, так как молоко 1 и 2-го сорта (по ГОСТ) просто-напросто свернется. Специально для УВТ-молока была изобретена новая, асептическая разновидность картонной упаковки с полиэтиленовым покрытием, такое молоко можно хранить при комнатной температуре.

Консервированием осуществляется уничтожение микробов или создание неблагоприятных условий для активности микробов, вызывающих порчу продуктов.

Для приготовления сгущенного молока в банках его стерилизуют при $115\text{--}118^{\circ}\text{C}$ в течение 15 мин. При такой температуре погибают вегетативные микробы, спорообразующие остаются. Сохранившиеся споры в благоприятных условиях могут прорасти, разлагать продукт с образованием газов,

которые вызывают бомбаж консервных банок. Для проверки качества стерилизации банки выдерживают в течение 10 сут при 37°C. Отсутствие бomaжа указывает на хорошую стерилизацию банок, что позволяет хранить их длительное время.

Для приготовления сгущенного молока с сахаром его подвергают очистке и доводят содержание жира и сухих веществ до уровня, соответствующего требованиям ГОСТ. Затем молоко нагревают до кипения и выдерживают около 20 мин, при этом погибают все микроорганизмы, за исключением устойчивых к высокой температуре. Пастеризованное молоко сгущают до 1/3 первоначального объема, чтобы в нем сохранилось не более 26,5% влаги, и к нему добавляют 43,5% сахара. При таком соотношении воды и сахара создается высокое осмотическое давление — условия, неблагоприятные для развития эшерихий, молочнокислых бактерий, дрожжей и многих плесневых грибов. Но при наличии шоколадно-коричневой плесени и цветных микрококков, обладающих протеолитическими свойствами, происходит порча продукта. Его сохранность в таком случае не превышает 6–12 мес. Соблюдение технологии и санитарных условий в процессе производства позволяет сохранить сгущенное молоко с сахаром в течение двух лет.

Санитарно-микробиологическая характеристика молока. Для того чтобы не допустить распространение инфекционных болезней через молоко, проводится строгий ветеринарный и санитарный надзор за животными и предприятиями молочной промышленности (контроль сырья и процессов производства).

Молоко, поступающее на молочный завод от производителя, в зависимости от санитарно-микробиологических и физико-химических показателей делят на три сорта. Молоко высшего и 1-го сорта должно иметь кислотность 16–18°Т (по Тернеру), микробную обсемененность по редуктазной пробе не ниже 1-го класса и степень чистоты 1-й группы по эталону. Кислотность молока 2-го сорта допускается в пределах 16–20°Т, микробная обсемененность по редуктазной пробе — не ниже 2-го класса и степень чистоты по эталону — не ниже 2-й группы. Молоко с кислотностью менее 16° и более 21°Т

относят к несортному. При этом оценка молока при приемке осуществляется по худшему показателю. Показатели, по которым определяют сорт молока, будут также приведены в виде таблицы в разделе «Лабораторные занятия». В настоящее время к качеству молока применяются следующие требования:

Кислотность	высший и первый второй	16–18°Т 16–20°Т
Бактериальная загрязненность	высший первый второй	до 300 тыс./мл до 300–500 тыс./мл до 500–4000 тыс./мл
Количество соматических клеток	высший первый и второй сорт	не более 500 тыс./мл не более 1000 тыс./мл
Ингибирующие вещества	не допускаются	

Повышенное содержание *соматических клеток* в молоке свидетельствует о наличии *мастита* — острого воспаления вымени. Применение молока с повышенным содержанием в нем соматических клеток на пищевые цели не допускается. Кроме потери технологических свойств такое молоко содержит токсины, выделяемые возбудителями мастита.

Кислотность молока является показателем, косвенно подтверждающим его микробное благополучие. При повышении количества микроорганизмов в молоке растет и его кислотность. Пониженная кислотность свидетельствует о том, что в молоко добавлены химические вещества с целью фальсификации его качества. А это опасно, поскольку все вещества, применяемые для фальсификации, токсичны для человеческого организма.

Пастеризованное молоко, выпускаемое заводами молочной промышленности, по общему количеству микробов и коли-титру делят на две группы: А и Б (табл. 1).

Молоко группы А можно использовать без кипячения, молоко группы Б перед употреблением в пищу необходимо кипятить.

Антибиотики, находящиеся в молоке, подавляют жизнедеятельность молочнокислых бактерий, очень чувствительных к ним, поэтому происходит нарушение технологи-

Таблица 1

Качество молока по общему количеству микробов и коли-титру

Молоко	Общее количество микробов в 1 мл молока, не более	Коли-титр, мл
Группа А Пастеризованное в бутылках и пакетах	50 000	3
Группа Б Пастеризованное во флягах	200 000	0,3

Таблица 2

Сроки использования молока после внутримышечного введения коровам антибиотиков

Антибиотики	Количество, тыс. ед.	Сроки использования после последнего введения (в ч.)
Бензилпенициллин	250	через 6
	500	через 6
	2000	через 12
	10 000	через 12
Бициллин-3	1500	через 30
Экмоновоциллин	4000	через 30
	2000	через 30
Стрептомицин	15 000	через 48

ческого процесса изготовления кисломолочных продуктов. О. А. Симецкий указывает сроки разрушения и выведения антибиотиков из организма после последнего введения с лечебной целью (табл. 2).

Молоко, содержащее ингибиторы: соду, перекись водорода, антибиотики, считается фальсифицированным и приему не подлежит. Для профилактики подобных явлений раз в декаду на молочных заводах и комбинатах проводят анализ на наличие ингибиторов.

Микробиология кисломолочных продуктов. Человеку давно известно, что молоко после получения быстро сквашивается. Он узнал также, что в кислом молоке не так быстро происходит разложение белка и другие нежелательные изменения, поэтому при обработке молока он создавал условия

для его сквашивания, что позволяло сохранять его в течение нескольких дней. Методы обработки молока у разных народов были различны, в связи с чем получаемые продукты также отличались один от другого. Таким образом, возникло большое количество кисломолочных продуктов, известных под различными названиями: у осетин — кефир, у русских — простокваша, у татар — катык, у армян — мацун, у украинцев — ряженка, у народностей, занимающихся коневодством, — кумыс. Все они сквашиваются молочнокислыми бактериями, а в некоторых, кроме того, параллельно идет и спиртовое брожение. С современных позиций остается только удивляться разнообразию технологического процесса, хорошему качеству перечисленных продуктов и мудрости «народных технологов» в те далекие времена.

Интерес к кисломолочным продуктам возник под влиянием идей и трудов И. И. Мечникова (1907). Он обратил внимание на то, что жители стран Балканского полуострова отличаются особым долголетием. Причину этого он связывал с тем, что жители этих стран регулярно употребляют в пищу большое количество кисломолочных продуктов. По мнению И. И. Мечникова, молочнокислые бактерии, содержащиеся в этих продуктах, способны приживаться в кишечнике человека и благотворно влиять на организм. В толстом отделе кишечника обычную микрофлору составляют гнилостные бактерии, выделяющие индол, скатол, которые, всасываясь через стенки кишечника в кровь, постепенно отравляют организм человека. Ученый пришел к выводу, что гнилостный процесс в кишечнике можно ослабить или совсем заглушить, употребляя постоянно кисломолочные продукты. В результате жизнедеятельности молочнокислых бактерий образуется молочная кислота и реакция среды кишечника из щелочной становится кислой. В кислой среде гнилостные бактерии не могут развиваться, поэтому устраняется источник отравления организма. Кроме того, продукты метаболизма молочнокислых бактерий содержат антибиотические вещества (низин), губительные для гнилостных и патогенных микроорганизмов.

Мечниковская теория об удлинении жизни сильно стимулировала общественный интерес к кисломолочным продуктам. Также известно, что кисломолочные продукты в ди-

етическом отношении более ценны, чем молоко, и кроме того обладают лечебными свойствами. Усвояемость кисломолочных продуктов повышается также в результате частичной пептонизации белков, т. е. разложения их на более простые вещества. Так, цельное молоко за час усваивается на 32%, а кисломолочные продукты — на 92%. Учитывая этот факт, в детских молочных кухнях кефир предлагают самым маленьким детям как заменитель материнского молока.

Все кисломолочные продукты делят на две группы: продукты *молочнокислого брожения* — простокваша, ацидофильное молоко, сметана и продукты смешанного молочнокислого и *спиртового брожения* — кефир, кумыс, катык. Продукты первой группы характеризуются плотным сгустком, а второй — более острым вкусом, нежным сгустком, пронизанным пузырьками углекислого газа, исчезающими при встряхивании.

Продукты молочнокислого брожения. *Простокваша* — как показывает само название, «молоко просто сквасилось» в результате жизнедеятельности бактерий, попавших в молоко из соскового канала и молочной посуды, а по сути дела это молоко в *фазе молочнокислых бактерий*. Такую простоквашу готовят в домашних условиях только из сырого молока.

На молочном заводе все поступившее молоко подвергают обязательной пастеризации, при этом основная масса молочнокислых бактерии погибает, а главное, не могут специалисты молочного дела доверить приготовление кисломолочных продуктов «диким» бактериям. Для этой цели бактериологи молочного завода покупают закваски из чистых культур молочнокислых бактерий из производственных лабораторий. На каждую культуру молочнокислых бактерий имеется паспорт, в котором дается полная характеристика микроба: название в латинской транскрипции, морфологические, культуральные, биохимические свойства и предельная кислотообразующая способность в градусах по Тернеру. Молочнокислые закваски выпускают двух видов: лиофильно высушенные и жидкие концентрированные, разлитые во флаконы с этикетками.

Сухой бактериальный концентрат используют для приготовления производственной закваски или непосредственно продукта после его активизации. Для приготовления

производственной закваски 1 порцию (флакон) для активизации вносят в 1 л стерильного молока, а при непосредственном приготовлении продукта вносят в 6–8 л стерильного молока. При этом мезофильные молочнокислые стрептококки выдерживают при 30°C, а термофильные — при 38–40°C в течение 1,5–3 ч для приготовления производственной закваски или 3,5–5 ч для непосредственного приготовления продукта.

При длительном использовании в молочном производстве одной и той же закваски, состоящей из одних и тех же культур, в них могут накопиться бактериофаги. Поэтому закваски различных партий следует менять не реже чем один раз в неделю.

Мечниковская (болгарская) простокваша — в пастеризованное при 85°C и охлажденное до 40°C молоко вносят 5% закваски, состоящей из термофильного молочнокислого стрептококка и болгарской палочки (*Str. thermophilus* и *L. bulgaricum*). Через 4 ч молоко свертывается, кислотность продукта достигает 70°Т. Простокваша имеет плотный сгусток, сметанообразную консистенцию и кислый вкус. Чем выше температура заквашивания, тем больше кислотность продукта, чтобы остановить молочнокислое брожение, его ставят в холодильник при температуре 4–6°C, при такой температуре происходит созревание и появление типичного для этого продукта вкуса и аромата.

Ацидофильная простокваша. Ее готовят так же, как мечниковскую простоквашу, только закваска состоит из чистой культуры ацидофильной палочки (*L. acidophilum*). Ацидофильная палочка в отличие от болгарской хорошо приживается в желудочно-кишечном тракте, т. е. в той среде, которая является естественным местом обитания для нее, поэтому эффективность такого кисломолочного продукта выше, а его лечебное действие более продолжительное. Для улучшения вкуса ацидофильной простоквашы в закваску добавляют *Str. lactis*, который смягчает металлический привкус и снижает кислотность.

Сметана. В 30% -ные пастеризованные при 85°C без выдержки и охлажденные до 22°C сливки вносят 5% закваски, в состав которых входят молочнокислый и сливочный стреп-

тококки и ароматобразующие бактерии (*Str. lactis*, *Str. cremoris*, *Str. diacetylactis*). В первые три часа сливки нужно перемешивать 2–3 раза, а затем оставить в покое до конца сквашивания, определяемого по кислотности. Сквашенные сливки созревают в помещении с температурой 4–6°C, консистенция созревшей сметаны становится густой вследствие набухания белков и агрегирования жировых шариков. Готовая сметана должна иметь кислотность 80–85°Т, ее рекомендуют хранить при 2°C.

Продукты смешанного брожения. С кефиром, широко распространенным напитком, связано много легенд. Еще при жизни А. С. Пушкина было известно, что у карачаевцев есть целебный напиток, название которого происходило от слова «кайф» — наслаждение, но как он готовится, никто не знал. Горцы оберегали секрет приготовления напитка, так как считали, что таинственная сила напитка исчезнет, если о нем узнают «неверные».

Первое научное сообщение о кефире было сделано на заседании кавказского медицинского общества в 1867 г. Было открыто несколько лечебниц, где основным лекарством был кефир.

Кефир — отличительной особенностью этого продукта является использование кефирных грибков, представляющих собой белые белковые гроздевидные образования диаметром от 2 мм до 3 см. При гистологическом исследовании срезов тела грибков обнаруживали тесные переплетения нитей, которые составляли строму грибка, удерживающую остальные группы микроорганизмов: молочнокислые стрептококки, палочки и молочные дрожжи. По С. Королеву, кефирные грибки представляют собой прочное симбиотическое образование, ведущее себя как единый живой организм, который растет, размножается и передает свои свойства следующему поколению. Многокомпонентность микробного симбиоза обуславливает трудности получения стабильного и оптимального состава закваски, что является обязательным для выработки стандартного кефира. Любое отклонение от принятого режима культивирования ведет за собой изменение микробного состава закваски, что свидетельствует об исключительной способности кефирных грибков к саморегулированию

микрофлоры. Регулируя температуру заквашивания, можно изменить течение вызываемых ими процессов. Культивирование грибков при температуре ниже 15°C способствует активизации спиртового брожения; при более высокой температуре интенсивнее развиваются молочнокислые микроорганизмы, что повышает содержание в продукте молочной кислоты.

Кумыс является самым древним напитком в нашей стране. Еще в пятом веке до нашей эры греческий историк Геродот, описывая быт далеких предков-скифов, сообщал, что они умеют делать из молока кобылиц вкусный напиток.

Благодаря своим лечебным свойствам кумыс получил широкую известность. Напитком бодрости, веселья и долголетия называли кумыс в народе. Издавна считалось, что кумыс укрепляет здоровье и особенно полезен для ослабленных людей.

Кобылье молоко резко отличается от коровьего по химическому составу (жира 1,5%, сахара 6,7% и высокое содержание альбумина, который при воздействии слабых кислот не изменяется), и это сказывается на свойствах получаемого продукта. При сквашивании кобыльего молока образуется рыхлый неплотный сгусток с мелкими хлопьями казеина, вот почему сквашенное кобылье молоко остается жидким.

Готовят кумыс из парного непастеризованного кобыльего молока. В качестве закваски раньше использовали кумыс прежней выработки. В настоящее время на молочных заводах для приготовления кумыса применяют чистые культуры *Lactobacterium bulgaricum* и дрожжи рода *Torula*. В парное кобылье молоко вносят 1% закваски, оставляют при 30°C на 6–8 ч, разливают по бутылкам, плотно закупоривают и ставят в холодильник для созревания на 2–3 дня. Различают кумыс слабый, содержащий 1,0% спирта; средний — до 1,75% и крепкий — до 2,5% спирта.

Специалисты много лет разрабатывали способы выработки этого целебного напитка из коровьего молока, который обладал бы сходными питательными и вкусовыми достоинствами. Благодаря жизнедеятельности молочнокислых палочек и дрожжей, кумыс из коровьего молока содержит не только спирт и молочную кислоту, но и витамины группы В.

Бифидобактерин — новый кисломолочный напиток, готовят с использованием *Bifidobacterium bifidum*. Бифидобактерии относятся к нормальной микрофлоре кишечника молодняка, находящегося на молочном вскармливании. Они хорошо приживаются в естественной среде обитания, поэтому их используют в составе микрофлоры пробиотиков, нормализующих микрофлору желудочно-кишечного тракта. Из чистых культур бифидобактерий готовят закваски в сочетании с известными молочнокислыми бактериями, которые используют для приготовления лечебных кисломолочных продуктов, таких как бифидок, бифилюкс, бифидумпростокваша, бифидокефир.

В микробиологических лабораториях при молочном заводе регулярно контролируют качество производственной закваски на активность, продолжительность сквашивания, кислотность и бродительный титр. Под микроскопом просматривают 10 полей зрения на чистоту закваски. Проверяют качество сгустка, вкус и запах, полученного кисломолочного продукта. Наличие бактерий группы кишечной палочки устанавливают путем посева 10 мл закваски в 50 мл среды Кесслера.

Микробиология масла. Сырьем для получения масла являются 25–35% -ные сливки, которые должны быть свежими, без посторонних запахов и привкусов. Сливки подвергают пастеризации, в результате чего разрушаются некоторые ферменты и погибает до 99,9% микроорганизмов. Пастеризация может быть длительная и кратковременная. Кратковременную пастеризацию проводят при непрерывном движении сливок и нагревании их до 85°C.

После пастеризации сливки охлаждают до 4–6°C, чтобы приостановить развитие оставшейся микрофлоры. При такой температуре происходит физическое созревание сливок: уплотнение жира, повышение вязкости. Масло изготавливают сбиванием сливок в маслоизготовителях, при сбивании жировые шарики сбиваются в масляные зерна, которые отделяют от пахты и обрабатывают. Чем сливки жирнее, тем быстрее они сбиваются, оптимальная температура для сбивания 9–16°C.

Различают два типа сливочного масла: сладкосливочное и кислосливочное. В *сладкосливочном масле* содержатся

микробы, которые остаются после пастеризации сливок, а также попадают во время их созревания и сбивания. На количество микробов влияет температура хранения, чем она выше, тем больше микробов. В 1 г сладкосливочного масла допускается до 10 000 бактерий, а коли-титр — 0,1 г. *Кислосливочное масло* готовят внесением в пастеризованные сливки закваски из *Str. lactis*, *Str. cremoris*, *Str. diacetylactis*, поэтому в 1 г такого масла содержатся десятки и сотни миллионов молочнокислых микробов, но показатель коли-титра остается — 0,1 г. Обычно микробов больше при длительном (12–16 ч) сквашивании сливок и меньше при кратковременном (20–30 мин). В сладкосливочном масле нежелательных микробов больше, чем в кислосливочном.

Микробы в масло могут попасть из аппаратуры, чистота которой зависит от качества мойки, дезинфекции и чистоты промывной воды. Вода и ее состав оказывают большое влияние на качество масла. Она может быть причиной многих пороков масла.

Микробиологические процессы при хранении масла и его пороки. Микроорганизмы, попавшие в масло по ходу технологического процесса, могут разлагать белки и жиры. В результате их жизнедеятельности в масле появляются следующие пороки.

Г о р ь к и й в к у с появляется в результате разложения белков масла протеолитическими ферментами бактерий. Такой порок — результат длительного хранения сладкосливочного масла при низкой положительной температуре.

П р о г о р к л ы й в к у с вызывают плесневые грибы, некоторые виды дрожжей, флуоресцирующие, маслянокислые и другие микробы. Они разлагают жиры на глицерин и жирные кислоты, а маслянокислые бациллы к тому же образуют масляную кислоту. Такой порок появляется при нарушении режима пастеризации.

К и с л ы й в к у с появляется в масле при хранении его при температуре выше 10°C, в результате сбраживания лактозы молочнокислыми бактериями.

П л е с н е в е н и е вызывают плесневые грибы *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, являющиеся строгими аэробами. Этот порок появляется при нарушении технологических процес-

сов, наличии пустот в глубине масла, при плохой герметизации упаковочным материалом. Чем плотнее масло и ниже температура хранения, тем меньше условий для развития аэробных микроорганизмов.

Высококачественный продукт можно получить при соблюдении технологии производства масла. Готовое масло хранят при температуре минус 20°C, при которой происходит полная задержка развития микрофлоры.

Микробиология сыроделия. Сыр относится к молочным продуктам и является идеальным белково-жировым концентратом молока. Из 90 различных веществ молока 85% поступают в сыр в тех же пропорциях. Сыр это молочный продукт, получаемый в результате сычужного свертывания молока, обработки сгустка, его созревании с целью получения продукта со специфическим запахом, консистенцией и вкусом.

Не всякое молоко можно использовать в сыроделии — только высокого качества. Например, швейцарский сыр готовят только из молока коров, пасущихся на альпийских лугах (нельзя кормить силосом, корнеплодами). Если молоко медленно свертывается или совсем не свертывается, то его называют сыронепригодным. Причин сыронепригодности молока много, однако этот вопрос еще до конца не изучен.

Микрофлора молока для сыроделия имеет первостепенное значение, так как процесс свертывания молока происходит под влиянием жизнедеятельности микроорганизмов.

Приготовление сыра состоит из следующих этапов:

- подготовка молока;
- получение казеинового сгустка;
- обработка сгустка для удаления влаги;
- формование сыра и прессование;
- посолка сыра;
- созревание сыра.

1. Первый этап начинается с проверки качества молока: не всякое молоко можно использовать в сыроделии — только высокого качества. Для производства сыров используют и сырое, и пастеризованное молоко. При пастеризации погибают микроорганизмы, вызывающие вспучивание сыров, молоко становится стандартным. Однако прогревание молока замедляет процесс свертывания, т. к. при этом происходит

осаждение солей кальция. При использовании пастеризованного молока обязательно вносят чистые культуры молочнокислых бактерий. В состав бактериальных заквасок входят кислотообразователи (*Str. lactis*, *Str. cremoris*), а также микробы, образующие кислоту и ароматические вещества (*Str. diacetilactis*, *Str. paracitrovorum*). Многоштаммовые закваски молочнокислых бактерий лучше приспосабливаются к непостоянным условиям молочной среды. При использовании сырого молока необходимо изменять технологический процесс, учитывая физико-химические свойства каждой партии. Многое зависит от мастерства сыродела. Молоко, применяемое для производства сыра, должно обладать определенной степенью зрелости, кислотностью 21° по Тернеру (т. е. нельзя использовать парное молоко). *Повышение кислотности — главный фактор, ускоряющий и усиливающий стягивание сычужного сгустка и выделение из него сыворотки.* Лучше, если молоко по своему микробиологическому состоянию находится на границе между двумя фазами: смешанной и молочнокислой.

2. Молочный сгусток получают двумя методами:

а) с помощью молочнокислых бактерий при выработке кислomолочных сыров;

б) и с помощью микробов в сочетании с сычужным ферментом, который получают из сычугов 2–3-недельных телят при выработке других сыров.

Сычужный фермент в сочетании с молочнокислыми бактериями обладает наибольшей протеолитической активностью. Сычужный фермент разлагает белки молока до пептонов, ферменты молочнокислых бактерий расщепляют белки молока до аминокислот.

Видимо, в связи с этим усвояемость жиров и белков из сыра достигает 95–97%. Молочный сахар (лактоза) при созревании сыров сбраживается полностью.

В сыроделии применяют главным образом сычужное свертывание молока. Для этого в сырную ванну с подготовленным молоком вносят 0,5% бактериальной закваски и 2,5 г порошка сычужного фермента на 100 л молока, которое должно свернуться при температуре 40°C за 40 мин. От плотности сгустка зависит качество сыра, его выход. Сгусток, полу-

ченный из «зрелого молока», легче отдает сыворотку, чем сгусток из незрелого (парного) молока.

3. В сырной ванне, чтобы облегчить удаление сыворотки, сгусток измельчают специальным ножом в виде «лиры», при этом должны образоваться сырные зерна величиной 2–5 мм. Основная масса микробов (до 75%) остается в сгустке, остальные выходят с сывороткой.

Твердые сыры должны содержать небольшое количество влаги. Это достигается дроблением сгустка и вторым нагреванием, при этом происходит большее обезвоживание зерна и его уплотнение. Второе нагревание, проводимое при 40–55°C, создает оптимальные условия для развития термофильных палочек, а мезофильные бактерии погибают. Зерно опускается на дно ванны, и мастер приступает к следующей операции — формированию сырной головки.

4. После формирования сырной головки в зависимости от сорта его прессуют. Прессование происходит под давлением вышележащих слоев, это необходимо для закрепления формы, плотного соединения зерен в сплошной монолит и для удаления лишней сыворотки. Чем крупнее сыр, тем продолжительнее удерживается в нем повышенная температура. Благоприятная температура в твердых сырах способствует развитию микроорганизмов, в результате чего их количество к концу прессования достигает нескольких млрд в 1 г сырной массы. Мягкие сыры рекомендуется прессовать при 18–20°C.

5. Готовые сырные формы погружают в ванну с концентрированным раствором натрия хлорида (22–24%) при температуре 8–10°C. Из поверхностных слоев сыра извлекаются вещества, находящиеся в растворенном состоянии — молочный сахар, соли молочной кислоты, а внутрь — взамен их — проникает соль, которая замедляет развитие не только вредных, но и полезных молочнокислых бактерий. Продолжительность посолки зависит от сорта сыра и длится от 2 до 10 дней. В результате посолки улучшается консистенция сырной массы, набухает казеин, он становится пластичным, приобретает специфический вкус и аромат.

6. Созревание сыров. Сыры сразу после посолки еще непригодны к употреблению. Созревание и приобретение специфических свойств происходит в специальных подвалах,

где сыры переворачивают, регулируют температуру, влажность, т. е. сыродел должен управлять процессом созревания. Сыры выдерживают от 10 дней (закусочные) до 8–10 мес. (швейцарские, твердые). Вкус и запах сыра обуславливают продукты распада белков, молочного сахара и жира, которые образуются под воздействием ферментов молочнокислых бактерий и сычужного фермента. По мере созревания сыров наступает гибель молочнокислых микробов, вначале стрептококков, а затем и палочек.

По истечении нескольких месяцев в процесс созревания твердых сыров включаются пропионовокислые бактерии, которые сбраживают молочную кислоту до пропионовой и уксусной с выделением диоксида углерода. Газ растворяется в сырной массе и после ее насыщения образует глазки. В эластичной массе сыра глазки имеют правильную форму и придают определенный рисунок различным сортам сыра. При нарушении технологического процесса в сыр попадают БГКП и маслянокислые бактерии, образующие такие газы, которые вызывают появление трещин и рваных глазков. Таким образом, по рисунку на разрезе сыра в какой-то степени можно судить о течении микробиологических процессов.

Пороки сыров микробного происхождения. *Сыр без глазков* (так называемый «слепой» сыр) — этот порок у твердых сыров возникает в результате гибели пропионовокислых бактерий во время нагревания, т. е. при нарушении режима пастеризации.

Сыр с большим количеством глубоких глазков. Способствующим фактором является неправильный тепловой режим при созревании сыра. Большое количество глазков появляется при преждевременном развитии газообразующих бактерий.

Вспучивание в начале созревания сыра могут вызвать БГКП, когда в сырной массе содержится несброженный молочный сахар. Рисунок сыра на разрезе становится неправильным, рваным. Если этот порок наблюдается в конце процесса созревания, когда уменьшается количество молочнокислых микробов и образуемых ими продуктов, происходит повышение рН среды. В таких условиях могут активизироваться маслянокислые бациллы, споры которых могут про-

должительное время сохраняться в сырной массе. Образующийся бактериями водород и другие газы вызывают вспучивание сыра. Для предупреждения этого порока необходимо применять молоко высокого качества и бактериально чистое.

Горький вкус придают продукты жизнедеятельности некоторых молочнокислых стрептококков (маммококков), обладающих протеолитическими ферментами и разлагающих белки до конечных продуктов. Сырная масса приобретает также прогорклый вкус, если проявили активность маслянокислые бактерии, образующие масляную кислоту.

Изъязвление корки вызывает осповидная плесень, которая иногда поражает и подкорковый слой. В образованные пустоты проникают гнилостные микробы, разлагающие сырную массу, которая приобретает мажущуюся консистенцию и гнилостный запах. Если в пустотах развивается зеленая плесень — пенициллиум, сыр приобретает горький вкус, так как ферменты плесени расщепляют жиры до конечных продуктов.

Для предупреждения появления пороков сыра и получения продукта хорошего качества необходимо соблюдать технологический процесс, санитарно-гигиенические условия производства, проводить тщательный контроль качества применяемого сырья.

Контрольные вопросы

1. Назовите источники загрязнения молока на ферме.
2. Какие микроорганизмы относятся к нормальной микрофлоре молока?
3. Какие микроорганизмы вызывают пороки молока и молочных продуктов?
4. Какие микроорганизмы относятся к возбудителям зооантропонозных инфекций ?
5. Суть гомо- и гетероферментативного молочнокислого брожения.
6. В чем отличие продуктов молочнокислого брожения от продуктов комбинированного брожения?
7. По каким показателям определяют качество молочнокислых заквасок?
8. Какими свойствами обладает сычужный фермент?
9. Из каких этапов состоит технологический процесс приготовления сыра?
10. Чем отличается кисломолочное масло от сладкомолочного?

Тема 13

**БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ МЯСА**

Мышцы и внутренние органы живых здоровых животных и птиц не содержат микробы. Об этом свидетельствуют данные специально проведенных исследований здоровых животных, убитых и вскрытых с соблюдением стерильности.

Однако при убое животных в условиях мясокомбината получают мясо и мясопродукты, содержащие различное количество сапрофитных микроорганизмов (кокковые, гнилостные палочки, бактерий группы кишечной палочки, споры плесневых грибов, дрожжи, актиномицеты), а иногда и патогенные бактерии.

Известны два пути обсеменения микроорганизмами органов и тканей животных: эндогенный и экзогенный.

Прижизненное эндогенное микробное обсеменение органов и тканей происходит у животных, больных инфекционными заболеваниями, органы и ткани которых содержат возбудителя болезни (сальмонелла, рожа свиней, лептоспира, листерии).

У здоровых животных эндогенное прижизненное микробное обсеменение органов и тканей происходит при ослаблении естественной резистентности организма под влиянием различных неблагоприятных факторов: утомление при транспортировке, голодание, переохлаждение, травмы. В результате ослабления сопротивляемости создаются благоприятные условия для проникновения микроорганизмов из кишечника через лимфатические и кровеносные сосуды в органы и ткани.

Посмертное эндогенное обсеменение органов и тканей начинается в момент убоя. Кровь, вытекшая из артерий, частично вновь засасывается через вены, при этом в кровяное русло попадают бактерии с шерсти и разносятся по органам и мышцам животного. Обсеменение поверхности мяса происходит при снятии шкуры и разделке туши. После смерти животного стенки кишечника становятся легко проницаемыми для микробов, содержащихся в кишечнике, и они проникают в окружающие ткани. При повреждении кишечника происходит чрезвычайно сильное загрязнение мяса.

Экзогенное загрязнение мяса происходит при разделке туши. Источниками микробного обсеменения могут служить кожный покров животных, воздух, оборудование, инструменты, а также вода, используемая для зачистки туш, и т. д.

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

На поверхности мясных туш в основном встречаются бактерии группы кишечной палочки, стафилококки и стрептококки, различные виды гнилостных аэробных бацилл, анаэробные клостридии, дрожжи, молочнокислые бактерии и плесневые грибы.

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

На поверхности туши находятся различные виды бактерий, которые могут быть представлены мезофилами, термофилами и психрофилами, т. е. микроорганизмами, имеющими неодинаковые температурные пределы роста.

В глубине охлажденного мяса температура должна достигать 0–4°C. В таком мясе в процессе длительного хранения могут развиваться только психрофилы.

Термофилы и большинство мезофильных бактерий, которые не развиваются при низких температурах, полностью приостанавливают свою жизнедеятельность, переходя в анабиоз. Но некоторые патогенные и токсигенные бактерии из группы мезофилов (сальмонеллы, токсигенные стафилококки) длительное время сохраняют жизнеспособность при низких температурах.

Размножение микроорганизмов в мясе при низких температурах проходит ряд фаз (лаг-фазу, или фазу задержки роста, логарифмическую фазу, максимальную стационарную и фазу отмирания). В начальный период хранения охлажденного мяса психрофильные бактерии, находясь в лаг-фазе, некоторое время не размножаются. В этот период

количественный и качественный состав микрофлоры мяса почти не изменяется. Продолжительность фазы задержки роста зависит от скорости охлаждения, температуры и влажности воздуха при хранении мяса, а также от степени обсемененности микробами мясных туш, поступивших на хранение.

По истечении лаг-фазы психрофильные бактерии начинают усиленно размножаться, и их количество возрастает. Психрофильные микроорганизмы, способные активно размножаться, со временем становятся преобладающими в составе продуктов, хранящихся в данных условиях.

На охлажденном мясе в аэробных условиях хранения размножаются неспоровые грамотрицательные бактерии, а также плесневые грибы и дрожжи. Активность развития той или иной группы зависит от температуры и влажности окружающей среды. Так, при неблагоприятных условиях для развития психрофильных аэробных бактерий (пониженная влажность и более низкая температура хранения) наблюдается активный рост плесневых грибов и аэробных дрожжей, которые имеют более низкие температурные пределы роста и менее требовательны к влажности.

При активном размножении микроорганизмов в результате их жизнедеятельности в конце стационарной фазы может наступить порча охлажденного мяса: ослизнение, гниение, кислотное брожение, пигментация, плесневение.

Ослизнение появляется обычно в начальный период хранения на поверхности мясных туш в виде сплошного слизистого налета, состоящего из различных бактерий, дрожжей и других микроорганизмов. При повышении температуры выше 5°C размножаются микрококки, стрептококки, актиномицеты, некоторые гнилостные и другие мезофильные микроорганизмы.

Гниение происходит при хранении мяса с признаками ослизнения. Процесс гниения вызывают различные аэробные и факультативно-анаэробные не образующие спор бактерии (вульгарный протей, флуоресцирующие бактерии), спорообразующие аэробные (сенная палочка, картофельная палочка) и анаэробные клостридии. Гниение мяса может происходить в аэробных и анаэробных условиях. В процессе гниения

под влиянием протеолитических ферментов происходит постепенный распад белков мяса с образованием неорганических конечных продуктов — аммиака, сероводорода, индола, скатола, которые придают мясу неприятный, гнилостный запах.

Кислотное брожение сопровождается появлением неприятного, кислого запаха, зеленовато-серой окраски на разрезе и размягчением мышечной ткани. Этот порок вызывают психрофильные молочнокислые бактерии и дрожжи, в результате жизнедеятельности которых образуются кислоты. Образующиеся продукты брожения задерживают развитие гнилостных микробов, но создают благоприятные условия для плесневых грибов.

Плесневение происходит при низкой температуре и в условиях пониженной влажности, так как плесневые грибы менее требовательны к влажности и имеют более низкие температурные пределы роста, чем аэробные бактерии.

Мороженое мясо. При замораживании мяса происходит гибель значительного количества микроорганизмов. Количество погибших бактерий зависит от скорости и степени понижения температуры. Чем ниже температура (-20°C), тем больше погибает микроорганизмов. При медленном неглубоком замораживании (-10°C) микроорганизмов погибает меньше. Устойчивы к действию низких температур энтерококки и стафилококки, а наиболее устойчивыми оказались плесени и дрожжи. В процессе хранения мороженого мяса отмирание микроорганизмов, выживших при замораживании, замедляется. Скорость отмирания бактерий при хранении мороженого мяса находится в обратной зависимости от температуры: чем ниже температура, тем медленнее происходит отмирание. Но полного отмирания микроорганизмов в мороженом мясе не происходит, даже после длительного хранения замороженного мяса оно не становится стерильным и может содержать много живых сапрофитных микроорганизмов — возбудителей порчи, а иногда и патогенных бактерий.

Микроорганизмы, выжившие в процессе хранения мороженого мяса, при его оттаивании начинают размножаться в благоприятных условиях.

Пищевые токсикоинфекции и токсикозы микробного происхождения. В соответствии с Рекомендованным международным сводом гигиенических правил производства сырого мяса процесс забоя мяса должен отвечать определенным санитарно-гигиеническим требованиям.

Обычно всех животных, предназначенных на убой, необходимо подвергать предубойному осмотру. Больных животных или животных с подозрением на инфекцию следует забивать отдельно, например на специальных или карантинных бойнях либо после убоя партии здоровых животных.

Одной из самых важных мер предосторожности на участке нутровки (потрошения) туш должно быть предотвращение их загрязнения содержимым кишечника.

Отравления, вызываемые мясными продуктами, делят на две группы: на пищевые токсикоинфекции и пищевые токсикозы, а также отравления смешанной этиологии (при сочетании пищевой токсикоинфекции и токсикоза).

К пищевым токсикоинфекциям относятся острые кишечные заболевания, возникающие при употреблении в пищу продуктов, в которых произошло массивное размножение микроба-возбудителя и накопление токсинов. К возбудителям пищевых токсикоинфекций относятся представители: семейства *Enterobacteriaceae* — *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis*, *Citrobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*; семейства *Vibrionaceae* — *V. parahaemolyticus*; семейства *Bacillaceae* — *Bac. cereus*, *Cl. perfringens*; семейства *Streptococcaceae* — *E. faecalis*; семейства *Pseudomonadaceae* — *P. aeruginosa*. По типу пищевых токсикоинфекций нередко протекают заболевания, вызываемые эшерихиями, сальмонеллами, шигеллами, иерсиниями.

К пищевым токсикозам относятся бактериальные токсикозы: ботулизм, стафилококковая пищевая инфекция, вызываемая стафилококками, способными продуцировать энтеротоксин, и микотоксикозы. Пищевые отравления смешанной этиологии обусловлены совместным действием двух возбудителей, например *Bac. cereus* и токсина стафилококка, *Bac. cereus* и эшерихии и т. д.

Токсикоинфекции вызывают бактерии сальмонеллезной группы (*S. dublin*, *S. typhimurium*, *S. choleraesuis*), условно-

патогенная микрофлора (*E. coli*, *Proteus vulgaris*), кокки и другие микроорганизмы. Токсикозы вызываются токсинами без участия микроорганизмов, выделяющих их.

Возникновение пищевых токсикоинфекций обусловливается попаданием возбудителей от больных людей, животных или бактерионосителей в пищевые продукты, в которых происходит их размножение и параллельно идет накопление токсинов. Размножение микроорганизмов становится возможным при нарушении санитарных правил и норм при заготовке пищевых продуктов, а также в процессе приготовления из них готовых изделий или полуфабрикатов, при их неправильной транспортировке, хранении и превышении сроков реализации.

Пищевые токсикоинфекции различной этиологии характеризуются целым рядом общих клинических и эпидемиологических признаков. Заболевание начинается остро после короткого инкубационного периода среди лиц, употреблявших одну и ту же пищу, как правило, приготовленную с нарушением технологии или длительное время хранившуюся перед реализацией. Эпидемиологически заболевание характеризуется взрывным началом, протекает по типу вспышки, прекращается сразу после изъятия продукта, послужившего причиной токсикоинфекции, и не оставляет эпидемического хвоста.

Патогенетические изменения в организме и клиническая картина при пищевых токсикоинфекциях, вызванных различными микроорганизмами, характеризуются похожими свойствами, так как их развитие зависит от действия токсических веществ микробов (эндотоксина), токсинов — продуктов распада белков пищевого продукта, а не от вида возбудителя. Одновременное проникновение массивной дозы бактерий и их разрушение в регионарных лимфатических образованиях кишечника ведут к освобождению значительного количества эндотоксина, который оказывает прежде всего местное влияние на желудочно-кишечный тракт, вызывая воспалительный процесс, нарушение всасывающей способности кишечника, диарею. В первые же часы заболевания наступают и общетоксические явления: повышение температуры тела, головная боль, слабость.

Заболевание начинается с явлений гастроэнтерита: рвоты, жидкого стула (до 10–15 раз в сутки), болей. Продолжительность болезни 1–3 дня в легких случаях, осложнения бывают у детей, людей пожилого возраста.

Диагноз ставится врачом-инфекционистом на основании клинических данных и эпидемиологического анамнеза, роль санитарного врача-микробиолога заключается в установлении вида возбудителя и фактора передачи путем выделения микроорганизма от больных и из пищевого продукта, послужившего причиной пищевого отравления.

Микробиологическая диагностика инфекционных болезней, вызываемых эшерихиями, сальмонеллами, иерсиниями и протекающих с клиническими симптомами пищевых токсикоинфекций, изучается в курсе микробиологии, так как эти болезни являются самостоятельными нозологическими формами.

Ботулизм — тяжелая бактериальная токсикоинфекция, обусловленная действием экзотоксина, который вырабатывается *Cl. botulinum*. Ботулинический токсин обладает наибольшей токсичностью из всех известных экзотоксинов микробов: 0,035 мг сухого порошка его является смертельной дозой для человека. В настоящее время доказано, что не только токсин, но и сам возбудитель может быть причиной отравления (К. И. Матвеев и др.). Споры ботулизма, попавшие в организм, превращаются в вегетативные клетки и продуцируют экзотоксин, приводящий животное к гибели, при этом возбудитель выделяется из всех органов и тканей. В связи с этим мясо от животных, больных ботулизмом, нельзя использовать в пищу.

Возбудитель ботулизма широко распространен в природе (почве, навозе, воде) и часто попадает в мясо из окружающей среды. Возбудитель может находиться в колбасе подозрительной свежести, копченой рыбе, консервах, подвергнутых стерилизации с нарушением режима. Продолжительность инкубационного периода болезни зависит от количества попавшего в организм возбудителя и типа его токсина. Смертность достигает 70–80%. С целью профилактики необходимо соблюдать санитарно-гигиенические правила на предприятиях пищевой промышленности. При малейшем подозрении на

ботулизм продукты следует браковать с последующим их уничтожением.

Токсикозы стафилококкового и стрептококкового происхождения. Стафилококковое пищевое отравление — типичный бактериальный токсикоз, занимающий по распространенности второе место после сальмонеллезной инфекции. Симптомы развития токсикоза обусловлены действием энтеротоксина, выделяемого стафилококками и накапливающегося в продуктах. Внешний вид продуктов, содержащих энтеротоксин, не изменяется. Энтеротоксин термостабилен, выдерживает кипячение до 30 мин и лишь частично разрушается после автоклавирования при 0,5 атм. Токсикозы могут вызывать отдельные штаммы стрептококков. Как и стафилококки, они способны продуцировать энтеротоксины, которые выдерживают нагревание до 100°C. Клиника болезни такая же, как при других пищевых отравлениях.

Мясо как возможный источник инфекции. Мясо больных животных может быть источником возбудителя. Так, мясо сибиреязвенного животного представляет большую опасность в смысле не только заражения, но и распространения возбудителя. При доступе воздуха вегетативные формы возбудителя сибирской язвы превращаются в споровые, которые в мясных продуктах, на предметах разделки и в окружающей среде сохраняются длительное время. Для уничтожения возбудителя проводят тщательную дезинфекцию предметов разделки, оборудования, помещения и другие мероприятия. Тушу больного животного и его шкуру утилизируют или сжигают.

Туляремией человек заболевает при контакте с больными животными или продуктами их переработки. Больные или подозреваемые в заболевании туляремией животные к убою не допускаются, так как через мясо распространяется возбудитель. Такую же опасность для человека представляет мясо животных, больных лептоспирозом, сапом и др. Не менее опасны мясо и пораженные органы животных, больных туберкулезом.

Убой бруцеллезных животных проводят на санитарных бойнях. При несоблюдении правил личной профилактики через мясо могут заражаться рабочие боенских предприятий.

Для человека наиболее опасен бруцеллез овец и коз — *Br. melitensis*.

У больных рожей свиней при наличии дегенеративных изменений в тканях туши уничтожают, а при их отсутствии — подвергают термической обработке.

Мясо животных при таких болезнях, как чума свиней, эмфизематозный карбункул (эмкар) крупного рогатого скота, менее опасно для человека, но так как такое мясо служит источником распространения возбудителя, его уничтожают.

Консервирование мяса. Мясо — скоропортящийся продукт, чтобы его сохранить, применяют разные способы консервирования (физические и химические). К физическим способам относится консервирование мяса низкой или высокой температурой.

Консервирование мяса низкой температурой. Пищевые продукты в замороженном виде могут сохраняться длительное время. В процессе замораживания продукта часть микробов погибает, остальные переходят в анабиотическое состояние. Таким образом, низкая температура не стерилизует продукт, а лишь замедляет развитие в нем микробиологических процессов.

Размораживание (дефростация) мяса. Перед употреблением мясо размораживают при температуре от 1 до 8°C. Дефростированное мясо менее стойко, так как образовавшиеся при замораживании кристаллы льда разрывают мышечную ткань. Чтобы кристаллы меньше травмировали клетки ткани, мясо следует замораживать быстро при температуре минус 20°C. Количество микробов в дефростированном мясе быстро возрастает, поэтому такой продукт надо немедленно реализовать.

Консервирование мяса сушкой. Сушка — один из самых старых способов сохранения мяса. В настоящее время применяют самый совершенный — лиофильный метод (сублимацию), т. е. обезвоживание в вакууме, предварительно замороженных продуктов путем возгонки льда в парообразное состояние, минуя жидкую фазу. Температура сушки должна быть ниже температуры денатурации белков и на выходе из сушилки составлять 55–70°C. Продукты, высушенные таким способом, очень быстро (за 20 мин) восстанавливают свои первоначальные свойства и почти полностью сохраняют биоло-

гическую ценность. Содержание в мясе до 10% влаги препятствует размножению бактерий, а до 7% — создает неблагоприятные условия для развития даже плесневых грибов. Высушенное мясо следует предохранять от попадания микробов, так как с повышением влажности они быстро начинают размножаться и приводят продукт к порче.

Консервирование мяса высокой температурой (баночные консервы). Для консервирования применяют бактериально чистое мясо. Время и температура стерилизации зависят от количества микробов (особенно спорообразующих) в продукте. Наиболее устойчивы к высокой температуре споры *Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus*, *Cl. botulinum*. С увеличением числа спор в одном и том же объеме среды время стерилизации увеличивается.

Споры *Cl. Botulinum* — самые опасные, так как выдерживают 3–6-часовое кипячение, при благоприятных условиях споры превращаются в вегетативные клетки и продуцируют сильнейший токсин. На образование токсина влияют рН среды, количество жира и поваренной соли в среде.

В стерилизованных консервах все-таки остается некоторое количество спор, поэтому необходимо обязательно проводить микробиологический контроль. С этой целью до 10% продукции помещают на 10 дней в термостатную камеру при 37°C. Если в консервах сохранились бациллы, то часть их прорастает и в результате их жизнедеятельности выделяется газ, вызывающий бомбаж (вздутие) банок.

Химические способы консервирования. Посол — один из древнейших и широко распространенных способов сохранения мяса. Он основан на свойстве соли повышать осмотическое давление, создавать плазмолиз и тем самым ингибировать микробиологические процессы. В состав рассола, кроме соли, входят нитраты (селитра), сахар. Все эти вещества во время посола проникают в мышечную ткань и обуславливают сложный физико-химический процесс. Нитраты под действием денитрифицирующих бактерий переходят в нитриты, которые придают обесцвеченному солью мясу нормальный красный цвет, не исчезающий при варке.

В процессе посола из мяса в рассол диффундируют белки, экстрактивные вещества, некоторые из водорастворимых

витаминов. В такой среде начинают развиваться галлофилы — микробы, выдерживающие высокие концентрации поваренной соли. Они часто являются причиной порчи продукта, в рассоле могут находиться до 40 видов различных микроорганизмов: *Proteus*, *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*. Грамположительные бактерии представлены *Bacillus*, реже *Clostridium* и плесневыми грибами.

Копчение мяса проводят также с целью сохранения продукта. Кроме потери воды мясо при копчении подвергается воздействию продуктов сухой перегонки дерева (фенол, крезол, скипидар, древесный спирт, формальдегид, смола, низкомолекулярные кислоты — уксусная, муравьиная, пропионовая и др.), которые действуют бактерицидно.

В процессе копчения мясные продукты приобретают специфический вкус и аромат. Из всех видов самый эффективный — холодный метод копчения при температуре 18–22°C (3–7 суток), консервирующие вещества при этом глубже проникают в мясо и тем самым повышают его стойкость при хранении. Копчению можно подвергать мясо только от здоровых животных, так как возбудители туберкулеза, рожи свиней под действием продуктов сухой перегонки дерева не погибают.

Контрольные вопросы

1. Назовите источники микробного обсеменения мяса.
2. В чем принципиальное отличие эндогенного загрязнения мяса от экзогенного?
3. Какие процессы микробиологического характера происходят при хранении мяса в холодильнике?
4. Что происходит с микрофлорой мяса при замораживании?
5. Назовите виновников возникновения пищевых токсикоинфекций.
6. Назовите виновников возникновения пищевых токсикозов.

Тема 14

МИКРОБИОЛОГИЯ ЯИЦ

Свежеснесенное яйцо от здоровой птицы, как правило, не содержит микроорганизмы. Стерильность яиц сохраняется продолжительное время при хранении, это объясняется наличием естественного иммунитета: скорлупа защищает от проникновения микробов, а содержащийся в яйце лизоцим

обладает способностью растворять многие микроорганизмы, особенно грамположительные. При продолжительном хранении яйцо высыхает, лизоцим постепенно инактивируется. Обсеменение яиц микробами возможно эндогенным и экзогенным путем.

Эндогенное обсеменение происходит в яичнике и яйцеводде несущек, больных туберкулезом, сальмонеллезом (пуллороз) и другими инфекционными болезнями.

Экзогенное обсеменение яиц происходит через поры скорлупы при антисанитарных условиях получения и хранения яиц. На скорость проникновения микробов в яйцо оказывает влияние окружающая среда: температура, влажность, степень свежести яиц и снижение активности лизоцима. При низкой температуре хранения скорость проникновения микроорганизмов замедляется, но психрофильные виды проходят через поры скорлупы и при нулевой температуре.

Гниение яиц — процесс разложения яичного белка протеолитическими ферментами микробов. При развитии в яйце гнилостных микробов вскоре наступает его порча. В некоторых случаях содержимое яйца приобретает серо-зеленую окраску и издает сильный запах сероводорода, при бактериологическом исследовании выделяются *Pseudomonas*, *Serratia*, *Micrococcus* и *Proteus*, разжижающие содержимое яйца и окрашивающие его в темный цвет.

Плесневение яиц. Поверхность скорлупы при хранении в антисанитарных условиях загрязняется различными бактериями, плесневыми грибами, актиномицетами и др. При хранении яиц в условиях повышенной влажности гифы микроскопических грибов проникают внутрь и образуют разветвленный мицелий, который при овоскопии обнаруживается в виде темного пятна. Из плесневых грибов чаще выделяют грибы рода *Penicillium*, *Aspergillus* и *Mucor*.

Инфекции, передаваемые через яйцо, нередко являются общими для человека и птицы. Яйца птицы, особенно водоплавающей, могут являться источником заражения туберкулезом и сальмонеллезом. Из сальмонелл наибольшую опасность для человека представляет *S. typhimurium*, которой бывают заражены не только утиные, но и куриные яйца. В настоящее время установлено, что *S. pullorum-gallinarum*,

считавшиеся ранее безопасными для человека, могут вызывать пищевые отравления.

Заражение птиц сальмонеллами происходит через корм, воду и объекты внешней среды. Болезнь поражает главным образом молодняк, у которого сальмонеллез протекает остро и характеризуется высоким процентом гибели. У взрослых птиц чаще встречается латентная форма, что является особенно опасным, так как инфицированные куры становятся бактерионосителями, от которых и происходит эндогенное заражение яиц и животноводческих помещений. Однако внедрение бактерий в яйцо, снесенное здоровыми животными, может произойти и после кладки, при загрязнении яйца пометом бактерионосителей, т. е. заражение яиц может произойти как эндогенным, так и экзогенным путем.

Хранение яиц. Длительное хранение яиц даже при отсутствии в них микробов приводит к изменению их содержания: изменяется консистенция белка, желток становится подвижным. Наряду с физическими происходят и химические качественные изменения. Замедлить порчу до 6 мес. можно при хранении яиц при 2°C и влажности 85%.

Консервирование яиц. Яйца, предназначенные для длительного хранения, консервируют. Существуют физические и химические способы консервирования яиц. Из физических способов применяют высушивание и замораживание.

Высушивание яичной массы проводят распылением в дисковых сушилках, в результате этого количество влаги снижается до 5–9%, что задерживает развитие оставшейся микрофлоры.

Для замораживания используют только доброкачественные яйца. Белок и желток смешивают, фильтруют, разливают в жестяные банки, запаивают и замораживают. Полуценную замороженную смесь хранят при температуре минус 5–10°C. В меланже могут содержаться *E. coli*, *Proteus* и аэробные бациллы, которые после размораживания быстро размножаются. Размороженный меланж надо использовать в ближайшее время, чтобы микрофлора не успела активизироваться.

Химические способы консервирования яиц предотвращают проникновение микробов через поры скорлупы. Для это-

го их погружают в растворы извести, в парафиновое масло, подогретое до 50°C на короткое время.

Контрольные вопросы

1. Назовите источники микробного обсеменения яиц.
2. Какие процессы микробиологического характера происходят при хранении яиц?
3. Назовите методы консервирования яиц.

Тема 15

МИКРОБИОЛОГИЯ КОРМОВ

Эпифитная микрофлора растений. Прикорневая и корневая система растений обсеменена большим количеством различной микрофлоры. В корневой зоне (ризосфере) имеется большое количество отмирающих корневых остатков, являющихся питательным субстратом для сапрофитной почвенной микрофлоры. Эти бактерии относятся к гнилостным, как и некоторые представители кишечной группы, встречающиеся в корневой зоне растений. Кроме них ризосфера содержит значительное количество гетероферментативных молочнокислых бактерий. Количество спорообразующих бактерий становится значительным лишь после отмирания корневой системы. Из плесневых грибов преобладают *Penicillium*, *Fusarium*.

Некоторые бактерии и микроскопические грибы, обитающие у корня, постепенно переходят на наземную часть растущего растения и расселяются на ней. На поверхности растений способна существовать лишь определенная группа микроорганизмов, получившая название **эпифитной**. На поверхности растений содержатся аммонификаторы, маслянокислые бактерии, молочнокислые бактерии, бактерии группы кишечной палочки (БГКП) и представители других физиологических групп микроорганизмов. В отличие от других микробов эпифиты хорошо переносят действие фитонцидов, солнечных излучений и питаются веществами, выделяемыми растениями. Находясь на поверхности растений, эпифиты не повреждают и не проникают в ткани здорового растения. Большая роль в этом процессе принадлежит естественному иммунитету и бактерицидным веществам, которые

выделяют растения. Все растения выделяют фитонциды, которые влияют на физиологические процессы микробов.

Взаимоотношения между микробами и скошенными растениями. После скашивания растений нарушается проницаемость клеток, разрушаются бактерицидные вещества, которые препятствовали проникновению микробов в их ткани. Активизируются все микроорганизмы, находившиеся на поверхности растений: гнилостные, маслянокислые, молочнокислые бактерии и плесневые грибы и др. Микроорганизмы, и в первую очередь грибы, при интенсивном их развитии снижают качество корма и его питательную ценность. Под действием *Aspergillus*, *Penicillium* изменяются жиры, затем углеводы и белки, в корме накапливаются различные продукты распада, резко изменяющие запах и вкус корма, среди них органические жирные кислоты, аммиак и пептоны. Эти процессы особенно активно протекают при высокой влажности и температуре.

В глубинных слоях корма развиваются анаэробные бактерии, а на поверхности — аэробные бактерии и плесневые грибы. В результате их жизнедеятельности происходит разложение составных частей корма, что приводит к потере питательных веществ и порче корма. Он приобретает гнилостный запах, волокна легко разрываются, их консистенция становится мажущейся. Такой корм плохо поедается животными и может вызвать кормовые отравления.

Сено. Сушка — старый и наиболее распространенный способ консервирования зеленой массы и других кормов (зерно, солома). Суть этого процесса заключается в том, при сушке микробиологические процессы в корме приостанавливаются из-за удаления из него «свободной» воды, которая составляет большую часть имеющейся в корме влаги. Так, если в свежей траве содержится 70–80% влаги, то в сене всего 12–16%. Оставшаяся в корме вода представляет собой «связанную» воду и не может поддержать развитие микроорганизмов. Таким образом, задача сушки — удаление избыточной воды из корма с наименьшей потерей органических веществ. При сушке число жизнедеятельных микроорганизмов, находящихся на поверхности кормов, постепенно уменьшается, но тем не менее в них всегда можно найти большее или

меньшее число эпифитной и сапрофитной микрофлоры, попавшей из воздуха и почвы. Размножение сапрофитной микрофлоры в результате повышения влажности приводит к заметному повышению температуры. Это повышение температуры, связанное с жизнедеятельностью микроорганизмов, получило название **термогенез**.

Приготовление обыкновенного сена. Сено готовят из скошенных трав, которые имеют влажность 70–80% и содержат большое количество свободной воды. Такая вода создает благоприятные условия для размножения эпифитной микрофлоры, вызывающей гниение травы. Высушивание травы до влажности 12–17% приостанавливает микробиологические процессы, что прекращает разрушение высушенных растений.

После высушивания в сене сохраняется большое количество эпифитной микрофлоры, но так как при этом нет условий для их размножения, то они находятся в анабиотическом состоянии. При попадании воды на высушенное сено деятельность микроорганизмов начинает активизироваться, что приводит к повышению температуры до 40–50°C и выше. При самонагревании растительной массы происходит четко выраженная смена микрофлоры. Сначала в греющейся массе размножаются мезофильные бактерии. С повышением температуры на смену им приходят термофилы, способные развиваться при температуре до 75–80°C. Обугливание растительной массы начинается с температуры около 90°C, при такой температуре микроорганизмы прекращают свою деятельность, дальнейшие процессы протекают химическим путем. Образуются горючие газы — метан и водород, которые адсорбируются на пористой поверхности обуглившихся растений, вследствие чего может произойти самовоспламенение. Воспламенение происходит лишь при наличии воздуха в недостаточно уплотненной растительной массе.

Микроорганизмы используют не всю энергию потребленных ими питательных веществ, избыток энергии выделяется в окружающую среду главным образом в виде тепла. Чем выше температура согреваемого корма, тем ниже его качество. Но не всегда явление термогенеза вредно. В северных

районах, где мало тепла и высокая влажность, его используют для приготовления бурого сена.

Приготовление бурого сена. Распространено в тех районах, где по климатическим условиям затруднена сушка сена. Для просушивания корма применяют не солнечную энергию, а тепло, выделяемое в результате жизнедеятельности микроорганизмов, развивающихся в растительной массе. Скошенную и хорошо провяленную траву складывают в небольшие копны, затем в стога и скирды. Так как в растительной массе еще содержится свободная вода, начинают размножаться микроорганизмы, выделяется тепло, которое и досушивает растения. Через месяц при угасании микробиологических процессов происходит охлаждение растительной массы, которая может храниться длительное время. Сено, приготовленное таким образом, теряет естественную окраску, становится бурым, но охотно поедается животными.

Сенаж — это разновидность консервированного корма, получаемого из провяленных трав, главным образом бобовых, убранных в начале бутонизации.

Научные исследования, проведенные в последние годы, показали, что особенно перспективным способом консервирования различных трав, и в первую очередь клевера и люцерны, является приготовление из них так называемого сенажа.

Технология приготовления сенажа включает скашивание, плющение и закладку провяленной травы в хранилище. Получить доброкачественный сенаж и до минимума сократить его потери при хранении можно только при закладке корма в капитальные хранилища — башни и траншеи. Траншеи по сравнению с башнями более просты и удобны в эксплуатации. Для приготовления высококачественного сенажа в хранилища закладывают мелко измельченные растения (размер частиц 2–3 см), что обеспечивает сыпучесть и уплотнение корма, тщательно утрамбовывают массу и, что очень важно, заготовку сенажа надо провести в 2–4 дня, т. е. в сжатые сроки. Недостаточное уплотнение и продолжительные сроки закладки вызывают нежелательное повышение температуры, что ухудшает перевариваемость и потери органического вещества корма. После загрузки хранилища се-

наж укрывают слоем свежескошенной травы, затем полиэтиленовой пленкой и сверху слоем земли и торфа.

От степени герметизации хранилища зависит сохранность и качество сенажа, так как при доступе воздуха начинают размножаться гнилостные и плесневые микроорганизмы, приводящие к порче корма.

В отличие от обычного силоса, сохранность которого обуславливается накоплением органических кислот до рН 4,2–4,4, консервирование сенажа достигается за счет физиологической сухости исходного сырья, сохраняемого в анаэробных условиях. Если влажность консервируемой массы будет в пределах 40–50%, то она хорошо ферментируется и даже при дефиците углеводов дает корм высокого качества. При этом рН корма может быть довольно высоким — около 5,0. Это объясняется тем, что гнилостные бактерии обладают меньшим осмотическим давлением, чем молочнокислые бактерии. При подсушивании корма в нем приостанавливаются гнилостные процессы, но продолжают действовать возбудители молочнокислого брожения. На этом основано приготовление сенажа, когда несколько подсушенную массу закладывают в специальную траншею, как при холодном силосовании.

Сенаж по своим свойствам ближе к зеленой массе, чем обычный силос. Это пресный корм, его кислотность соответствует величине рН 4,8–5,0, в нем почти полностью сохраняется сахар, в то время как у силоса он превращается в органические кислоты.

При указанной влажности растений интенсивно развиваться может лишь плесень. Плесени являются строгими аэробами, поэтому непременным условием приготовления сенажа является надежная изоляция его от воздуха. Оставшийся в консервируемой массе воздух быстро поглощается на дыхание еще живыми клетками растений, и все свободное пространство между частицами измельченного корма заполняется углекислым газом.

Таким образом, для приготовления сенажа необходимо выполнить два условия:

- снизить влажность растений до 45–55%;
- создать строгие анаэробные условия, чтобы предотвратить развитие гнилостных бактерий и плесневых грибов.

Тем не менее технология приготовления сенажа основана не только на физических, но и на микробиологических процессах, которые протекают медленнее, чем в силосе. В силосе максимальное количество микроорганизмов накапливается уже к 7-му дню, а в сенаже их численность достигает максимума только на 15-й день, т. е. молочнокислое брожение в сенаже протекает значительно слабее, чем при силосовании, и зависит от влажности и вида консервируемого сырья. Поэтому показатель рН в сенаже выше, чем в силосе, и колеблется от 4,4 до 5,6. По данным А. А. Зубрилина с соавторами (1967 г.), количество молочнокислых микробов в сенаже в 4–5 раз меньше, чем в силосе. В связи с этим в сенаже, по сравнению с силосом, содержится больше неиспользованного сахара. Так, если в силосе весь сахар превращается в органические кислоты, то в сенаже сохраняется около 80% сахара. В результате создания неблагоприятных условий для развития микрофлоры в консервируемом корме, исключения утечки сока и механических потерь листьев и соцветий при заготовке и хранении сенажа общие потери питательных веществ в сенаже не превышают 13–17%. Таким образом, сенаж совмещает в себе положительные качества сена и силоса.

Отличие от силоса сенаж, имея низкую влажность, не замерзает, что упрощает его выгрузку и скармливание животным. Сенаж можно заготавливать из всех трав, так как в отличие от силоса не имеет значения, сколько в траве содержится легкосбраживаемых углеводов и к какой группе по силосуемости относятся эти растения.

Микробиология силосования кормов. Термин «силос» (silos) очень древнего происхождения, на испанском языке означает «яма» для хранения зерна (в настоящее время, утратившее свое первоначальное значение). Такие зернохранилища были распространены во многих местностях побережья Средиземного моря. Еще за 700 лет до нашей эры землевладельцы Греции, Турции, Северной Африки широко использовали такие ямы для хранения зерна. Со временем этот принцип был использован для хранения и консервирования зеленой массы.

Силосование — сложный микробиологический и биохимический процесс консервирования сочной растительной массы.

Суть силосования заключается в том, что в результате сбраживания растительных углеводов ферментами молочнокислых бактерий в силосуемой массе накапливается молочная кислота, обладающая антимикробными свойствами, в результате чего корм не подвергается гниению и приобретает стойкость при хранении. Для получения силоса хорошего качества и с наименьшими потерями необходимо создать следующие условия.

1. Использовать для силосования корма, содержащие достаточное количество легкосилосующихся *углеводов* (кукуруза, подсолнечник, горох, зеленый овес, луговые злаки), или их добавлять в несилосующиеся растения.

2. Оптимальная *влажность* для силосования 65–75%, при которой происходит интенсивное образование органических кислот. При пониженной влажности силосуемая масса плохо уплотняется, в ней много воздуха и создаются условия для самонагревания, развития плесени и гнилостных бактерий.

3. Оптимальная *температура* для развития молочнокислых бактерий 25–30°C, при этой температуре идет нормальный процесс заквашивания корма с небольшими потерями питательных веществ. Готовый силос получается умеренно кислый, желто-зеленого цвета, с приятным специфическим запахом.

4. Хорошо изолировать силосуемую массу от воздуха для создания *анаэробных условий*, при которых создаются неблагоприятные условия для размножения гнилостных и плесневых микроорганизмов.

Биохимизм микробиологических процессов при силосовании. Бактерии, вырабатывающие молочную кислоту, представляют большую разнообразную группу, в которую входят как кокковидные, так и палочковидные формы.

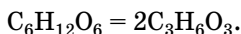
По качеству продуктов брожения молочнокислые бактерии делят на две основные группы:

1. *Гомоферментативные*, образующие из сбраживаемых ими углеводов в основном молочную кислоту и лишь следы различных побочных продуктов. Типичные представители этой группы — молочнокислые стрептококки и молочнокислые палочки. При таком брожении получается продукт с приятным кислым вкусом и запахом.

2. *Гетероферментативные*, образующие кроме молочной кислоты значительное количество побочных продуктов

(этиловый спирт, уксусную кислоту, углекислый газ). Среди них имеются кокковые и палочковидные формы.

Для развития всех молочнокислых бактерий в растительной массе должны быть легкоусвояемые углеводы. Способность вырабатывать молочную кислоту зависит у одного и того же вида микроорганизмов от многих факторов, в том числе и от качества питательного субстрата. Так, при сбраживании гексоз они образуют в качестве главного продукта молочную кислоту, которая получается в результате расщепления одной молекулы сахара на две молекулы молочной кислоты по следующему уравнению:



При сбраживании пентоз в конечных продуктах брожения будет всегда больше уксусной кислоты, чем при сбраживании, например, гексоз глюкозы или фруктозы. А так как пентозаны входят в состав растительной массы, наличие в готовом силосе уксусной кислоты также является результатом жизнедеятельности молочнокислых, а не уксуснокислых бактерий. Поэтому даже в хорошем силосе всегда находится определенное количество уксусной кислоты (Даниленко И. А. с соавт., 1972). И если в составе органических кислот будет не менее 65–70% молочной, а уксусной 30–35%, значит, брожение происходило правильно. Известны два способа силосования: холодный и горячий.

Холодный способ силосования характеризуется тем, что созревание силоса происходит при температуре 25–30°C. При таком силосовании измельченную растительную массу плотно укладывают в траншею, а сверху изолируют от воздуха для создания анаэробных условий, при которых развитие гнилостных бактерий и плесневых грибов подавляется. Непременное условие получения высококачественного корма — быстрая изоляция силосуемой массы от воздуха, поэтому продолжительность заполнения траншеи зеленой массой не должна превышать 3–4 дней. Для предотвращения термогенеза необходимо укладывать измельченную зеленую массу быстро и непрерывно, при постоянном уплотнении.

При горячем способе силосования зеленую массу укладывают рыхло, слоем 1–1,5 м на 1–2 дня, затем укладывают

второй слой такой же толщины, как и первый. При доступе кислорода в растительной массе развиваются энергичные микробиологические процессы, в результате чего температура корма поднимается до 45–50°C. Нижний слой растений, размягченный высокой температурой, спрессовывается под тяжестью нового слоя корма. Это вызывает удаление воздуха из нижнего слоя, поэтому аэробные процессы прекращаются, и температура начинает снижаться. Последний верхний слой утрамбовывают и плотно прикрывают для защиты от воздуха. Перегретый силос имеет коричневый цвет, запах яблок или ржаного хлеба, хорошо поедается животными. Однако кормовая ценность силоса, приготовленного горячим способом, значительно ниже, чем при холодном способе.

Процесс силосования можно условно разделить на три фазы.

Первая фаза силосования называется *фазой смешанной микрофлоры*. В растительной массе начинается бурное развитие эпифитной микрофлоры (гнилостной, молочнокислой, маслянокислой, микроскопических грибов), внесенной с кормом. Продолжительность первой фазы зависит от качества корма, плотности укладки, температуры окружающей среды, но чаще бывает кратковременной.

Во *вторую фазу* — *фазу главного брожения* — основную роль играют молочнокислые бактерии, выделяющие молочную кислоту. При оптимальном содержании сахара в растительной массе интенсивное молочнокислое брожение приводит к образованию значительного количества органических кислот (в основном молочной), которое необходимо для подкисления корма до pH 4,2–4,4 (Макарцев Н. Г., 1999). В начале этой фазы размножаются кокки, затем, по мере нарастания кислотности, им на смену приходят кислотоустойчивые молочнокислые палочки. Молочная кислота обладает антимикробными свойствами, поэтому большинство гнилостных бактерий погибает, но спорообразующие формы в виде спор могут длительное время сохраняться в силосованном корме.

Третья фаза — конечная — связана с *постепенным отмиранием* возбудителей молочнокислого брожения в созревающем силосе. Молочная кислота при накоплении в большой концентрации становится вредной и для молочнокислых палочек, которые наряду с оставшимися кокками начинают отмирать.

Таким образом, количество бактерий в корме уменьшается и процесс силосования подходит к естественному завершению.

В состав эпифитной микрофлоры растительного сырья входят различные микроорганизмы (микроскопические грибы, маслянокислые бактерии, кишечная палочка), которые при нарушении технологического процесса могут активизироваться и вызывать нежелательные процессы.

Плесневые грибы хорошо переносят кислую среду (рН до 1,2) и активно размножаются в силосе при плохой изоляции от воздуха. Для своей жизнедеятельности они используют углеводы, а при их недостатке — молочную и уксусную кислоты. При этом значительно ухудшается качество силоса и отмечается токсическое воздействие заплесневелого корма на организм животного. Надежными мерами для предотвращения развития плесневых грибов в силосе являются хорошая герметизация силосохранилищ и создание благоприятных условий для развития молочнокислого брожения.

Бактерии группы кишечной палочки (БГКП) являются гетероферментативными микроорганизмами, которые кроме сахаролитических выделяют и протеолитические ферменты, расщепляющие растительные белки до аммиака таким образом, снижая ценность силосуемого корма.

Нежелательны для процесса силосования и *маслянокислые бактерии*, являющиеся строгими анаэробами. В процессе жизнедеятельности они используют сахар, молочную кислоту, некоторые аминокислоты. Это сопровождается гнилостным распадом белка, накоплением масляной кислоты и других вредных для организма животных побочных продуктов. Наличие масляной кислоты является индикатором гнилостного разложения белка при слабом нарастании в силосе молочной кислоты. Снижение рН среды до 4,2 предотвращает развитие маслянокислого брожения при силосовании кормов.

Дрожжевание кормов. Это микробиологический метод подготовки кормов к скармливанию. В химическом составе дрожжей содержится 48–52% белков, 13–16% углеводов, 2–3% жиров, 22–40% безазотистых экстрактивных веществ и 6–10% золы. В состав дрожжей входят многие незаменимые аминокислоты: аргинин, гистидин, лизин, лейцин, тирозин, треонин, фенилаланин, метионин, валин, триптофан, кото-

рых мало в кормах растительного происхождения. В дрожжах содержится много витаминов группы В, провитамины витамина D₂, а также витамины Е, С и др. И в отличие от других источников белка они обладают большой скоростью размножения и нетребовательны к качеству источников питательных веществ. Применение дрожжей не случайно, например, 500 кг дрожжей дают за сутки 80 кг белков, а у быка того же веса суточный привес составляет в лучшем случае 500 г белка.

При дрожжевании кормов необходимо создать благоприятные условия для размножения дрожжевых клеток: наличие легкобразимаемых углеводов, содержащих моно- или дисахариды, достаточная аэрация (иначе дрожжи перейдут на анаэробный тип дыхания, конечным продуктом которого является этиловый спирт), благоприятная температура 25–30°C и рН в пределах 3,8–4,2. Для дрожжевания хорошо подходят кормовые смеси, приготовленные из отходов зернового производства, корнеплодов, жома, к которым примешивают грубые корма, т. е. смеси богатые углеводами и бедные протеином (исключить корма животного, происхождения, на которых развиваются гнилостные, маслянокислые и другие нежелательные микроорганизмы).

Для дрожжевания кормов необходимо подобрать сухое и светлое помещение, чтобы предотвратить загрязнение дрожжеванного корма спорами плесневых грибов, среди которых могут быть возбудители микотоксикозов.

Существует три способа дрожжевания кормов: безопарный, опарный и заквасочный.

Безопарный способ характеризуется тем, что 1% разведенных дрожжей вносят сразу во всю массу корма. Смесь перемешивают каждые 30 мин в течение 8–10 часов, затем корм готов к скармливанию.

При *опарном способе* вначале готовят опару: для этого дрожжи (1% от массы корма) разводят и смешивают с одной пятой корма, выдерживают 6 часов при перемешивании. Затем в опару добавляют остальной корм, двойное количество воды, и процесс дрожжевания идет еще 3 ч при постоянном перемешивании для доступа воздуха.

Заквасочный способ применяют при недостаточном количестве дрожжей, поэтому вначале готовят закваску. Для

этого 0,5 кг прессованных дрожжей размножают в небольшом количестве хорошо дрожжающихся углеводистых кормов (отходы зернового производства) при 30–35°C, через 5 ч их можно использовать как закваску. Заготовленную порцию корма осолаживают, обливая их кипятком, — осолаживание происходит в течение 5 ч при температуре не ниже 60°C. К осоложенному корму добавляют такое же количество воды и половину закваски, перемешивают и оставляют на 6 ч в теплом месте, после чего корм готов к скармливанию. Вторую часть оставшейся закваски можно использовать 5–10 раз для дрожжевания новых партий корма, после чего она теряет активность.

Дрожжевание кормов улучшает качество корма и обогащает корм витаминами, а присутствие молочной кислоты увеличивает у животных аппетит.

Контрольные вопросы

1. Назовите представителей эпифитной микрофлоры растений и их роль в процессе хранения.
2. На знании каких физиологических процессов основано приготовление и хранение сена?
3. На чем основана возможность длительного хранения сенажа?
4. Какими свойствами обладает молочная кислота, образующаяся в процессе силосования?
5. Чем обогащается корм в процессе дрожжевания?

Тема 16

МИКРОФЛОРА КОЖЕВЕННО-МЕХОВОГО СЫРЬЯ

Шкура состоит из трех слоев: эпидермиса, дермы и подкожной клетчатки. Внутренний слой шкуры после съемки с животного называется мездриной стороной (мездрой). Парная, только что снятая с животного, шкура содержит до 70% воды, белковые вещества, жиры и минеральные вещества. Таким образом, в состав парной шкуры входят все вещества, необходимые для питания микроорганизмов.

Микрофлора парной шкуры. На шерстном покрове шкуры всегда множество различных микроорганизмов. Свежая мездра бывает стерильной, на ее поверхность микробы попадают во время съемки и обработки шкуры. Источником микрофлоры парной шкуры являются навоз, почва, вода, воздух, она загрязняется с инструментов и рук, с поверхности

применяемого оборудования. На парной шкуре сразу после убоя обнаруживаются кишечная палочка, стафилококки, гнилостные бактерии, протей и дрожжи и т. д.

Состав микроорганизмов, находящихся на шкуре, очень разнообразен: обнаруживаются кишечная палочка, стафилококки, гнилостные бактерии, протей, плесневые грибы, дрожжи и актиномицеты, обладающие широким набором ферментативных свойств. Начало разложения тканей можно заметить по изменению цвета, консистенции и гнилостному запаху.

Гнилостное разложение протекает в три стадии. Первая стадия характеризуется быстрым размножением бактерий в подкожной клетчатке с последующим проникновением их в слой эпидермиса и волосяные сумки. В этой стадии видимых изменений нет. Во второй стадии микробы проникают в глубь кожи. При этом мездра ослизняется и темнеет, волос легко выпадает. В третьей стадии ткань дермы разлагается, становится ослизлой и дряблой, эпидермис легко отслаивается. Шкура теряет прочность, легко разрывается и издает сильный гнилостный запах (сероводорода, аммиака).

В начале гнилостного процесса на поверхности кожи преобладают аэробные аммонификаторы (*Proteus vulgaris*, *E. coli*, *Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus*, *Bac. megaterium* и др.), а по мере продвижения в толщу кожи можно обнаружить анаэробы *Cl. putrificum*, *Cl. sporogenum*.

Плесневение шкур происходит при хранении их в сырых прохладных помещениях. На поверхности влажной мездры появляются пигментированные колонии плесневых грибов, быстро заражающие все сырье. Протеолитические ферменты психрофильных бактерий и плесневых грибов разрушают мездру, в результате чего снижается товарная ценность сырья.

Консервирование кожевенного сырья. Шкуры, поступающие на промышленную переработку, должны сохранять первоначальную структуру. Такими они остаются только в том случае, если сразу после охлаждения, не позднее чем через 3–4 ч после съема, их консервируют. Существует много способов консервирования и все они направлены на то, чтобы предотвратить развитие микробов.

Соление — самый распространенный способ консервирования кожевенного сырья. Хлорид натрия повышает осмо-

тическое давление и создает неблагоприятные условия для развития микробов. Соление может быть мокрым и соленым.

Мокросоленое консервирование проводят путем засолки шкур в расстил или комбинированно — с предварительным тузлукованием. При солении врасстил на стеллаже с приподнятым центром шкуру расстилают мездрой вверх. После этого ее обильно посыпают солью и натирают, на первую шкуру расстилают вторую, которую натирают солью, и т. д. до образования штабеля высотой 1–1,5 м. Шкуры в таком штабеле выдерживают 5–7 дней.

Т у з л у к о в а н и е характеризуется тем, что вначале шкуры пропитывают крепким раствором поваренной соли, а затем подсаливают и выдерживают в штабелях. Тузлукуют хорошо промытые парные или размороженные шкуры, которые загружают в чан с 25,6% раствором хлорида натрия мездрой вверх. Шкуры выдерживают в чане от 10 до 20 ч в зависимости от их размеров, после этого их извлекают, оставляют на 2 ч и солят врасстил. Тузлучный раствор используют не более 5 раз, для увеличения антимикробных свойств в раствор добавляют кремнистофтористый натрий из расчета 0,75 г на 1 л.

Сухосоленое консервирование чаще применяется в южных регионах и на отгонных пастбищах. Свежие шкуры солят, складывают в штабеля и выдерживают трое суток, затем сушат мездрой вверх.

Пресно-сухое консервирование применяют для обработки мелких шкур. Сушку проводят обязательно под навесом или в специальных сушилках. Сушка на солнце вызывает их ороговение. В процессе сушки происходит обезвоживание шкуры, влажность снижается до 15%, что приостанавливает жизнедеятельность микробов.

Замораживание. Низкая температура подавляет жизнедеятельность микробов, ферментативные процессы и тем самым сохраняет парную шкуру. Резкое колебание температуры, повторное замораживание и оттаивание приводят к быстрой порче сырья. В результате появляются пороки, снижающие товарную ценность шкур.

Микрофлора шерсти. На поверхности шерсти имеется большое количество бактерий, попавших из почвы, навоза.

Наиболее активными разрушителями шерсти являются *Bac. mesentericus*, *Bac. cereus*, *Bac. subtilis*, из микроскопических грибов — аспергиллы и пенициллы, которые вызывают процесс аммонификации кератина, что приводит к разрушению волокна. Степень изменения шерсти зависит не только от вида микробов, но и от других факторов, таких как температура и влажность окружающей среды. Сырая шерсть под действием термофильных бактерий теряет блеск, цвет, эластичность, а при активной аэрации нагревается и даже воспламеняется. В прелой шерсти уменьшается прочность волокон, а под действием *Pseudomonas* происходит изменение цвета шерсти. Для предотвращения развития микробиологических процессов и порчи шерсти ее надо хранить в тюках, на деревянных брусках, в сухих и хорошо проветриваемых помещениях.

Кожевенно-меховое сырье как возможный источник инфекции. Кожевенно-меховое сырье, полученное от больных животных, может служить источником возбудителей инфекционных болезней. При контакте человека с таким сырьем происходит его заражение. Особенно опасно сырье, обсемененное возбудителями, образующими споры, которые длительное время сохраняются во внешней среде. Шкуры от вынужденно забитых животных должны быть проверены на сибирскую язву при помощи реакции преципитации (Асколи). Сырье от больных животных тщательно дезинфицируют или уничтожают, если есть подозрение на наличие возбудителя сибирской язвы, эмфизематозного карбункула или других особо опасных возбудителей. Для предотвращения распространения возбудителей через кожевенно-меховое сырье необходимо соблюдать ветеринарно-санитарные правила на складах и предприятиях по его обработке.

Контрольные вопросы

1. Перечислите виды микроорганизмов, принимающих участие в микробном разложении кожевенного сырья.
2. Назовите, на чем основаны методы консервирования кожевенного сырья.
3. Назовите источники микробного загрязнения кожевенно-мехового сырья.

Тема 17

МИКРОБИОЛОГИЯ НАВОЗА

Навоз — экскременты животных, перемешанные с соломой, торфом и опилками. Состав и удобрительные свойства навоза зависят от вида животных, корма, подстилки, системы уборки и хранения.

В навозе содержится много органических соединений, поэтому он является благоприятной средой для развития различных микроорганизмов. Содержание бактерий в навозе может достигать до огромных величин, особенно при благоприятных условиях (аэрация, температура). В навозе всегда находятся микроорганизмы, принимающие участие в почвообразовательных процессах, такие как аммонифицирующие, нитрифицирующие, денитрифицирующие, клетчаткоразлагающие или целлюлозоразлагающие, азотфиксирующие, актиномицеты, плесневые грибы. Кроме перечисленных микроорганизмов в навозе всегда есть представители нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта животных, такие как кишечная палочка, энтерококки, большая группа молочнокислых бактерии, клостридий. Следовательно, с навозом в почву попадает огромное количество полезных микроорганизмов, что значительно усиливает микробиологические процессы в почве. Навоз приобретает свойства органического удобрения благодаря жизнедеятельности микробов. Состав навоза непостоянен, он зависит от соотношения в нем твердых и жидких выделений, количества и качества корма, вида животных и других факторов. Так, конский и овечий навоз по сравнению с навозом КРС и свиней бывает богаче азотом, фосфором и калием. При скармливании животным концентрированных кормов получается навоз более высокого (как удобрение) качества.

Различают навоз: жидкий, полужидкий и твердый — чаще с подстилочным материалом. *Жидкий* навоз получается при гидравлическом методе уборки помещения (влажность до 93%). *Полужидкий* (пастообразный) с влажностью до 85% получается при содержании крупного рогатого скота и свиней без подстилки. Для получения *твердого* навоза живот-

ных содержат на подстилке из соломы или сфагнового торфа — влажность такого навоза 70–80%.

Предупредить потери ценных веществ в навозе и частично обезвредить его можно путем правильного хранения. Существует несколько способов хранения навоза: под скотом, плотный (анаэробный), рыхло-плотный (аэробно-анаэробный) и рыхлый (аэробный).

Хранение навоза под скотом. При таком методе хранения навоза он уплотняется, создаются анаэробные условия, вследствие чего исключаются бурные процессы жизнедеятельности бактерий — виновников потерь азота, благодаря чему в навозе сохраняется большое количество ценных веществ. Но при таком методе хранения навоза в воздухе помещений накапливаются аммиак и другие газы, которые раздражают слизистые оболочки животных. Неубранный навоз может быть источником бактериальных и вирусных возбудителей, т. е. создает антисанитарные условия в помещениях, поэтому их лучше очищать от навоза.

Плотное (анаэробное) хранение навоза. Навоз укладывают в специально отведенном месте — навозохранилищах. Навоз укладывают плотно в штабеля шириной 3–4 м, высотой до 2 м, произвольной длины. Сверху навоз герметизируют слоем торфа или земли толщиной 10–15 см. При этом создаются анаэробные условия, в которых медленно развиваются микробиологические процессы (см. табл. 3) и происходит незначительное повышение температуры (до 25–35°C). При такой укладке навоз перепревает только через 7–8 мес.

При *рыхло-плотном (аэробно-анаэробное) хранении* навоз в штабеле вначале укладывают рыхлым слоем, чтобы создать аэробные условия, при которых идут энергичные микробиологические процессы, температура повышается до 50–60°C и разогретый навоз уплотняется. Через несколько дней следующий слой навоза снова укладывается рыхло и так до образования штабеля высотой 2 м. При этом азота теряется больше, чем при холодном способе.

При *рыхлом (аэробном) хранении* навоза создаются аэробные условия, что способствует бурному развитию микробиологических процессов. Аммонификаторы разлагают

Таблица 3

**Содержание микроорганизмов
при созревании плотного навоза, в млн в 1 г массы
(по данным В. Н. Былинкиной)**

Группа бактерий	Срок, прошедший с момента закладки навоза				
	Исходный материал	15 дней	1 мес.	2 мес.	4 мес.
Бактерии	940	2600	1800	140	130
Бациллы	6	15	20	7	6
Актиномицеты	1	1,6	1,8	0,9	1,5

Таблица 4

**Потери сухого вещества навоза при разных условиях хранения
(по данным М. Степановой)**

Способы хранения	Количество микробов, в млрд/1 г	Потери сухого вещества, в %
Хранение в навозохранилище (с разогревом)	17,5	17,9
Хранение на открытом месте	34,2	25,5
Холодное (плотное) хранение	32,6	16,0
Хранение в неуплотненной куче	90,6	33,0

белковые вещества до аммиака, используемого аэробными нитрифицирующими бактериями, которые окисляют его до нитритов и нитратов, т. е. создают пищу для денитрификаторов. При создании анаэробных условий в глубоких слоях навоза денитрификаторы восстанавливают соли азотистой и азотной кислот до молекулярного азота, который улетучивается. Благодаря деятельности последних, за 3–4 мес. хранения в таком навозе сохраняется 30–40% органических веществ.

Микробиологические процессы интенсивно протекают на поверхности при достаточной аэрации. В глубоких слоях перепревание навоза идет медленно. В разогретой массе температура достигает 70–80°C, что приводит к гибели сапрофитных и патогенных форм бактерий. При интенсивно протекающих микробиологических процессах происходят потери ценных веществ и среди них важных для растений — азота и фосфора. Взаимосвязь между способами хранения, количеством микробов и потерями сухого вещества навоза видна из данных, приведенных в таблице 4. Таким образом, в зависи-

мости от эпизоотической обстановки в хозяйстве можно направленно вести микробиологические процессы в навозе и тем самым улучшать эпизоотическую обстановку.

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

При заболеваниях, вызванных бактериями, не образующими споры, вирусами, а также при инвазионных болезнях навоз подвергают биотермическому обеззараживанию в навозохранилищах. Для обеззараживания навоза отводят и подготавливают специальный участок: глубиной 25 см, шириной до 2,5 м и произвольной длины. Перед укладкой навоза в штабель на дно расстилают слой соломы или торфа толщиной 30–40 см, а затем на него укладывают навоз высотой до 2 м от больных животных без подстилочного материала или твердую фракцию разжиженного навоза. Уложенный в штабель навоз обкладывают со всех сторон незараженным навозом, торфом или соломой слоем 10 см, а сверху наносят такой же слой земли. В зависимости от устойчивости возбудителя обезвреживание навоза биотермическим способом проводят в течение 2–6 мес. При температуре, создаваемой микробами (70–80°C), погибают возбудители сальмонеллеза, колибактериоза, рожи свиней, бруцеллеза, ящура и другие возбудители. Навоз, полученный от животных, больных и подозреваемых по заболеванию сибирской язвой, эмкармом, бешенством, паратуберкулезным энтеритом и чумой крупного рогатого скота сжигают.

Контрольные вопросы

1. Перечислите методы хранения навоза.
2. На чем основано биотермическое обезвреживание навоза?
3. При каких инфекционных болезнях с/х животных навоз подлежит сжиганию?

РАЗДЕЛ ПЯТЫЙ

ЛАБОРАТОРНЫЕ ЗАНЯТИЯ

Тема 1

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ
И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ. СВЕТОВОЙ МИКРОСКОП,
ЕГО УСТРОЙСТВО И ПРАВИЛА РАБОТЫ.
БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЕ КРАСКИ.
ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРЕПАРАТА ДЛЯ МИКРОСКОПИИ.
ПРОСТОЙ МЕТОД ОКРАШИВАНИЯ.
ОСНОВНЫЕ ФОРМЫ БАКТЕРИЙ**

Цель занятия. Ознакомить студентов с бактериологической лабораторией и правилами техники безопасности. Изучить устройство светового микроскопа, ознакомиться с бактериологическими красками. Овладеть методикой приготовления мазка-препарата и окрашивания его простым методом. Освоить технику микроскопии окрашенных препаратов с применением иммерсионной системы. Ознакомиться с основными формами бактерий.

Материалы и оборудование. Комплект микроскопов. Набор сухих бактериологических красок. Набор красок для простого метода окрашивания — метиленовая синь, разведенный фуксин. Спиртовки, предметные стекла, бактериологические петли, сенная палочка в сенном настое или кишечная палочка в МПБ, банки с дезраствором, иммерсионное масло.

Таблицы: Ход лучей в сухой и иммерсионной системе, Основные формы бактерий, Микрофлора зубного налета.

Техника безопасности в бактериологической лаборатории:

1. Заходить и работать в лаборатории можно только в спецодежде.
2. В лабораторию нельзя вносить посторонние вещи, продукты питания.
3. За каждым студентом закрепляется рабочее место и микроскоп.
4. Без разрешения преподавателя нельзя включать электроприборы.

5. Студент должен поставить в известность преподавателя при загрязнении предметов окружающей среды инфицированным материалом для немедленной дезинфекции.

6. После окончания работы весь исследуемый материал, использованные бактериальные культуры, инструменты поместить в биксы для стерилизации и отдать преподавателю.

7. При уходе из лаборатории необходимо снять спецодежду, тщательно вымыть руки, при необходимости руки обработать дезраствором.

8. Каждому студенту расписаться о знании правил техники безопасности в специальном журнале.

Световой микроскоп, его устройство и правила работы. Оптические микроскопы позволяют исследовать микроорганизмы в проходящем свете. Такие микроскопы состоят из механической и оптической частей (см. рис. 5).

Механическая часть включает штатив с предметным столиком 2 и тубус 3. Предметный столик с помощью винтов может перемещаться в горизонтальной плоскости. Он имеет две клеммы, прижимающие предметное стекло к столику. Тубусодержатель 5 может перемещаться с помощью макровинта 6 и микровинта 7, предназначенных соответственно для грубой и точной фокусировки изучаемого объекта. Микровинт относится к наиболее уязвимым деталям микроскопа, поэтому с ним нужно обращаться особенно осторожно. Полный оборот его поднимает или опускает тубус на 0,1 мм.

В верхней части тубусодержателя находится револьверное устройство 8, вращающееся вокруг своей оси, в отверстия которого ввинчены объективы 9. В верхний конец тубуса вставляется окуляр 10.

Оптическая часть состоит из объективов, окуляров и осветительного аппарата.

Окуляр вставляется в верхний конец тубуса. Он состоит из двух линз в оправе, между которыми помещена диафрагма. На окуляре имеются цифровые обозначения ($\times 7$, $\times 10$, $\times 15$), показывающие степень увеличения изображения.

Объективы представляют собой системы оптических линз. На объективах имеются обозначения, показывающие увеличение, даваемое объективом ($\times 8$, $\times 40$ и $\times 90$).

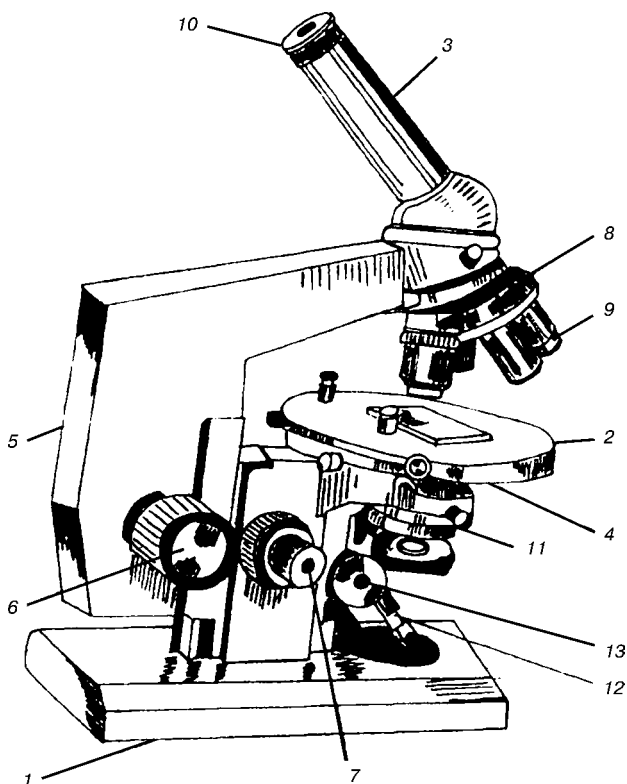


Рис. 5
Микроскоп МБР-1:

1 — основание микроскопа, 2 — предметный столик, 3 — тубус, 4 — винты для перемещения предметного столика, 5 — тубусодержатель, 6 — макрометрический винт, 7 — микрометрический винт, 8 — револьверное устройство, 9 — объективы, 10 — окуляр, 11 — конденсор, 12 — зеркало, 13 — винт конденсора.

- ×8-объектив применяют для наведения света и поиска объекта.
- ×40-объектив применяют для изучения микроскопических грибов.
- ×90-объектив применяют для изучения бактерий под иммерсией.

Объективы, дающие увеличение в 8 и 40 раз, называются сухими, так как при работе между объективом и препара-

том находится слой воздуха. В сухой системе между предметным стеклом и объективом находится воздух, коэффициент преломления которого равен 1,0, а коэффициент преломления стекла равен 1,52. Из-за этой разницы часть боковых лучей преломляется и отклоняется, не попадая в объектив, но освещение при этом не ухудшается, так как диаметр линз $\times 8$ и $\times 40$ объективов достаточно велик.

Иммерсионным называется объектив при работе, с которым между препаратом и объективом помещают каплю иммерсионного (кедрового) масла (рис. 6). Иммерсионное масло имеет оптический коэффициент преломления (1,51), близкий к коэффициенту преломления стекла, благодаря этому световые лучи, проходя через однородную среду, не отклоняются от своего первоначального направления, попадают на линзу объектива. В рассматриваемом микроскопе объектив с увеличением в 90 раз является иммерсионным.

Общее увеличение, которое дает микроскоп, равняется произведению степени увеличения объектива ($\times 90$) на степень увеличения окуляра ($\times 10$), т. е. $90 \times 10 = 900$ раз. Четкость получаемого изображения зависит от *разрешающей способности* микроскопа — способности разделять две близко расположенные точки, которая равна половине длины

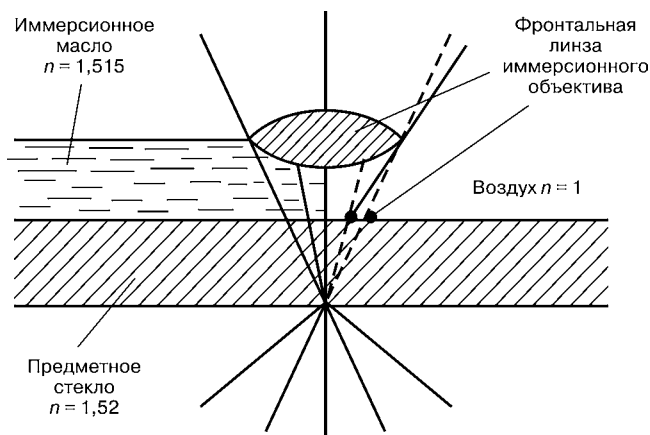


Рис. 6
Ход лучей в сухой и иммерсионной системах

световой волны. Рассматриваемый нами микроскоп имеет разрешающую способность около 0,2 мкм. (Следовательно, объекты величиной менее 0,2 мкм в данный микроскоп не видны.)

Осветительный аппарат состоит из конденсора, зеркала, ирисовой диафрагмы. Он предназначен для наилучшего освещения препарата. С помощью зеркала лучи света, исходящие от источника света, направляются в конденсор, концентрирующий свет в своем фокусе. Поверхность зеркала с одной стороны плоская, с другой — вогнутая. При естественном источнике света применяют вогнутое зеркало, а при искусственном (осветитель, электролампа) — плоское.

Конденсор с ирисовой диафрагмой представляет собой систему оптических линз, которая собирает лучи света и направляет их в объектив. При опускании конденсора при помощи винта поле зрения несколько затемняется, при поднятии — освещается. Ирисовая диафрагма помещается под конденсором, служит для регулирования потока света, которое осуществляется с помощью рычажка — расширением или сужением диаметра отверстия, пропускающего свет к конденсору.

Выпускаются также дополнительные приспособления, которые позволяют максимально использовать все возможности микроскопа и значительно расширяют диапазон применения: фазово-контрастные приспособления, осветители, окуляр-микрометр и объектив-микрометр, для измерения размеров микроорганизмов.

Правила работы со световым микроскопом:

1) установить наилучшее освещение поля зрения микроскопа, для этого:

а) поставить объектив $\times 8$ на 1 см от уровня предметного столика микроскопа,

б) поднять конденсор до уровня предметного столика,

в) направить плоское зеркало в сторону осветителя;

2) установить препарат, закрепив клеммами;

3) нанести каплю иммерсионного масла в центр препарата;

4) заменить объектив $\times 8$ на $\times 90$;

5) под контролем глаза опустить объектив $\times 90$ в масло;

6) наблюдая в окуляр, найти какое-либо изображение;

7) установить четкое изображение с помощью микровинта, вращая его на пол-оборота в ту или иную сторону.

После окончания работы привести микроскоп в порядок:

- 1) поднять макровинтом тубус микроскопа;
- 2) убрать препарат;
- 3) снять салфеткой масло с $\times 90$ объектива и установить $\times 8$ объектив;
- 4) опустить конденсор;
- 5) положить салфетку под объектив и опустить тубус микроскопа.

Основные формы бактерий. По форме клеток бактерии подразделяются на шаровидные (кокки), палочковидные и извитые.

Кокки — имеют форму правильного шара, эллипса, боба и ланцета. В зависимости от взаимного расположения клеток после деления различают:

Микророкки — делятся в разных плоскостях и располагаются одиночно, парами или беспорядочно. Относятся к сапрофитам, обитают в почве, воде и воздухе.

Стафилококки — делятся в трех взаимно перпендикулярных плоскостях, располагаются гроздьями, беспорядочно. Среди них встречаются патогенные и условно-патогенные, такие как *Staphylococcus aureus*.

Диплококки — образуют попарно соединенные кокки.

Стрептококки — кокки, расположенные в виде цепочки. Среди патогенных встречаются возбудители мыта лошадей, скарлатины. В молочной промышленности имеют значение молочнокислые стрептококки, применяющиеся для приготовления кисломолочных продуктов.

Тетракокки — кокки, располагающиеся по четыре.

Сарцины — кокки, образующие правильные пакеты по 8–16 клеток.

Палочковидные бактерии. Это самая большая группа прокариот, которая делится на две группы: палочки, не образующие споры — истинные бактерии и образующие споры — бациллы. Палочки, у которых диаметр споры превышает ширину вегетативной клетки, называют клостридиями.

Извитые бактерии. Вибрионы — тело, которых представляет неполный завиток в виде запятой (холерный вибрион).

Спириллы — микроорганизмы, тело которых состоит из нескольких крупных завитков. Спирохеты — тело которых состоит из множества плотно уложенных завитков вокруг осевой нити, невидимых в световой микроскоп (возбудители лептоспироза, сифилиса).

Исследуемый материал в бактериологии. Исследуемым материалом в бактериологии являются: мясо, молоко и молочные продукты, масло, яйца; кожевенно-меховое сырье, комбикорма, силос, сенаж, сено, которые поступают в микробиологическую лабораторию для анализа.

Все работы ведутся в условиях бокса над пламенем спиртовки, чтобы исключить загрязнение присланного материала и окружающей среды. Исследуемый материал берут в объеме бактериологической петли и наносят на предметное стекло, которое должно быть чистым и обезжиренным. Капля воды, нанесенная на хорошо обезжиренное стекло, растекается равномерно (на плохо обезжиренном — собирается в капельки).

Бактериологические краски. Оптическая плотность неокрашенных бактерий незначительно отличается от оптической плотности стекла, поэтому при изучении морфологии бактерий под микроскопом для повышения контрастности их окрашивают анилиновыми красками.

Анилиновые краски плохо растворяются в воде, поэтому вначале готовят насыщенные спиртовые растворы красок (1:10), из которых затем готовят рабочие водные растворы. В бактериологической практике чаще применяют следующие краски:

1. *Щелочная метиленовая синь* — применяют для простого метода окрашивания, она всегда находится на столе у бактериолога.

2. *Карболовый основной фуксин Циля* — концентрированная краска, применяется при окрашивании трудно окрашивающихся бактерий, таких как возбудитель туберкулеза, споры бактерий.

3. *Разведенный фуксин* — это фуксин Циля, разведенный 1:10, применяют для простого метода окрашивания и по Граму. Краску готовят перед применением, используют в течение одного рабочего дня.

4. *Карболовый генцианвиолет* — применяют как основной краситель при окраске по Граму.

Методика приготовления препарата для микроскопии состоит из нескольких этапов:

1. *Приготовление мазка* — для этого на предметном стекле с обратной стороны карандашом по стеклу обводят круг диаметром 2–3 см. Жидкий материал берут петлей и распределяют на предметном стекле в области круга, а бактериальную культуру с поверхности плотной питательной среды снимают бактериальной петлей и растирают на предметном стекле в капле заранее нанесенной воды. Из кусочков паренхиматозных органов делают мазки-отпечатки (местом свежего среза прикасаются к предметному стеклу, делая несколько отпечатков).

2. *Высушивание мазка* — на воздухе при комнатной температуре.

3. *Фиксация мазка* — проводится с целью прикрепить бактерии к стеклу и убить их, так как убитые микробы лучше окрашиваются (среди них могут быть и очень опасные). Фиксацию мазков проводят одним из двух способов: физическим или химическим. **Физический метод** заключается в трехкратном проведении обратной стороной мазка через пламя спиртовки, с задержкой в пламени в общей сложности на 2–3 с (при прикосновении к руке должен ощущаться легкий ожог). **Химическом методе** — препарат-отпечаток погружают в смесь равных объемов спирта и эфира на 10–15 мин. Этот метод фиксации, мягкий и щадящий, рекомендуют применять для препаратов, приготовленных из крови или паренхиматозных органов.

4. *Окраска мазка* — простым или сложным методом.

Простой метод окрашивания. При простом методе окрашивания применяется одна краска. Этот метод позволяет *установить наличие или отсутствие бактерий* в исследуемом материале, а также *изучить их морфологию* (форму, взаиморасположение).

В качестве исследуемого материала на лабораторном занятии можно использовать взвесь чистой культуры кишечной палочки, стафилококка или свой зубной налет, взятый спичкой и распределенный на предметном стекле. Приготовление препарата из зубного налета очень интересно и познавательно. Студенты, впервые знакомясь с нормальной микрофлорой тела, испытывают легкий шок и желание уничтожить

все микробы. По мере изучения микробиологии они поймут, что нормальная микрофлора имеет защитное значение, если ее уничтожить, поселятся микроорганизмы, не свойственные для этой полости (например, дрожжи, вызывающие кандидоз — молочницу).

В микрофлоре зубного налета здорового человека должны быть представлены все морфологические группы бактерий, т. е. микрофлора зубного налета должна быть обязательно *полиморфной*.

Приготовление препарата из зубного налета это еще и память об Антони ван Левенгуке, который первым заглянул в этот невидимый мир и описал его.

Методика простого окрашивания:

1. На фиксированный мазок наносят несколько капель краски (чаще 3–5 капель): щелочную метиленовую синь на 5 мин или разведенный фуксин на 3 мин.
2. Препарат промывают водой.
3. Высушивают фильтровальной бумагой.
4. Наносят каплю иммерсионного масла.
5. Изучают под микроскопом.

Микрокартину зарисовать, обратить внимание на разные формы бактерий и обозначить их.

Морфология бактерий — первый признак, по которому определяют вид микроорганизмов.

Задания для самостоятельной работы

1. Ознакомиться с лабораторией кафедры микробиологии и техникой безопасности (расписаться в журнале).
2. Изучить устройство микроскопа и освоить правила работы.
3. Приготовить мазок из зубного налета или бактериальной культуры, окрасить простым методом.
4. Провести микроскопию препаратов с применением иммерсионной системы. Обратит внимание на различные формы бактерий, микрокартину зарисовать.
5. В ходе работы уяснить значение конденсора, диафрагмы и других частей осветительного аппарата. С этой целью провести микроскопию:
 - а) с опущенным конденсором, с поднятым конденсором, с прикрытой диафрагмой;
 - б) применить $\times 90$ объектив с иммерсионным маслом и без масла.

Тема 2

**СЛОЖНЫЕ МЕТОДЫ ОКРАШИВАНИЯ.
ОКРАСКА ПО ГРАМУ, ОКРАСКА СПОР И КАПСУЛ.
ИССЛЕДОВАНИЕ БАКТЕРИЙ НА ПОДВИЖНОСТЬ**

Цель занятия. Овладеть методикой окрашивания препаратов сложными методами. Освоить методы исследования бактерий на подвижность.

Материалы и оборудование. Пробирки со смесью взвеси кишечной палочки и стафилококка в физрастворе для окраски по Граму, пробирки со взвесью вакцинного штамма сибирской язвы для окраски спор, бактериологические петли. Набор красок для окраски: по Граму, окраски спор по Златогорову. Спиртовки, предметные стекла и стекла с луночкой для изучения подвижности сенной палочки из сеного настоя или кишечной палочки из МПБ, баночка с вазелином и спичкой. Банки с дезраствором. Микроскопы, иммерсионное масло. Готовый препарат на предметном стекле для демонстрации капсул.

Таблицы: Окраска по Граму, Окраска спор по Златогорову, Окраска капсул по Ольту, Органы движения бактерий.

Сложные методы окрашивания. Сложные методы окрашивания позволяют установить наличие спор, капсул и внутриклеточных включений. Различные виды бактерий имеют разный химический состав и отличаются по строению клеточной стенки, поэтому неодинаково воспринимают окрашивание анилиновыми красками. Отношение микроорганизмов к различным красителям называют *тинкториальными свойствами*. По отношению к различным красителям все бактерии разделены на две группы: грамположительные и грамотрицательные.

Методика окрашивания по Граму состоит в следующем.

1. На фиксированный мазок накладывают сухой кусочек фильтровальной бумаги (1×1 см), заранее пропитанный раствором генцианвиолета (модификация А. В. Синева) и наносят 2–3 капли воды — на 2 мин. Все бактерии окрасились в фиолетовый цвет. Затем фильтровальную бумагу с генцианвиолетом удаляют.

2. Наносят несколько капель раствора Люголя (в этом растворе имеют значение ионы йода) — на 2 мин, затем раствор

стряхиывают. С ионами иода только Gr^+ бактерии вступают в прочную связь.

3. Наносят строго в центр мазка 96% -ный этиловый спирт. Этот этап очень важный, предметное стекло лучше держать в руках, а не на мостике, чтобы спирт не стекал в уголок стекла. Грамотрицательные бактерии обесцвечиваются. Через 40–50 с смыть водой.

4. Обесцвеченные бактерии дополнительно окрашивают разведенным фуксином — 3 мин, промывают водой. Высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют под иммерсионным объективом.

Микрокартина: грамположительные бактерии окрашиваются в фиолетовый цвет, грамотрицательные — в розовый цвет.

Суть окрашивания по Граму заключается в том, что грамположительные бактерии с генцианвиолетом в присутствии ионов йода образуют прочный комплекс, который при действии спиртом не вымывается через узкие поры в толстом слое пептидогликана, поэтому бактерии остаются фиолетовыми. Грамотрицательные бактерии имеют другой химический состав и строение клеточной стенки, поэтому при действии спирта, генцианвиолет вымывается через широкие поры в клеточной стенке, бактерии обесцвечиваются, принимают цвет дополнительного красителя и становятся красными.

Отношение бактерий к окраске по Граму является вторым признаком для определения вида бактерий.

Биологическое значение образования спор. Некоторые виды палочковидных бактерий в неблагоприятных условиях образуют споры:

- при недостатке влаги,
- при недостатке питательных веществ,
- при избытке продуктов метаболизма,
- при старении культуры.

Одна бактерия образует одну спору, т. е. это *не размножение, а сохранение вида* в неблагоприятных условиях. Все бактерии, образующие споры, называются *бациллы*. Палочки, у которых диаметр спор превышает ширину вегетативной клетки, принято называть клостридиями. Бациллы бесконечно долго сохраняются в почве (возбудитель сибирской язвы), устойчивы при обработке кислотами и щелочами, выдерживают ки-

пачение (возбудители столбняка, ботулизма), имеют плотную оболочку и простым методом не прокрашиваются. Поэтому для окраски спор применяют сложные методы окрашивания, основанные на применении горячих концентрированных красок, при этом споры и вегетативные клетки вначале окрашиваются в один цвет, но при последующей обработке кислотой споры, являясь кислотоустойчивыми, сохраняют цвет первой краски, а вегетативные клетки обесцвечиваются. Обесцвеченные вегетативные клетки дополнительно окрашивают.

Методика окрашивания спор по Златогорову.

1. На фиксированный мазок наносят карболовый фуксин и красят 7–10 мин при подогревании над пламенем спиртовки до появления пара.

2. Препарат обесцвечивают 2% -ным раствором серной кислоты 1–3 с (за это время должны обесцветиться только вегетативные клетки).

3. Препарат промывают водой, чтобы прекратить действие кислоты.

4. Обесцвеченные вегетативные клетки окрашивают метиленовой синью — 5 мин.

Микрокартина: споры — красные, вегетативные клетки — синие.

Наличие или отсутствие споры является третьим признаком для определения вида.

Биологическое значение образования капсул. Некоторые болезнетворные бактерии, находясь в организме больного, вокруг клеточной стенки образуют слизистый слой, называемый капсулой. Наличие капсулы отмечают у возбудителей сибирской язвы, диплококковой септицемии. На рисунке 7 в препарате видны палочки сибирской язвы и диплококки, окруженные капсулой. У вирулентных бактерий капсула является фактором агрессии, защищает от фагоцитоза и специфических антител. У почвенных бактерий капсула защищает от высыхания и

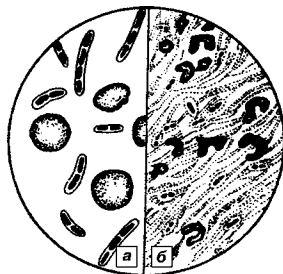


Рис. 7

Капсулы у бактерий:

а — с капсулой, б — в споровой форме.

бактериофага. У различных бактерий химический состав капсул различен, что позволяет дифференцировать их друг от друга при идентификации. Так, капсульное вещество сибиреязвенной палочки содержит полипептид D-глутаминовой кислоты, а диплококковой септицемии — полисахарид. Для выявления капсул применяют *метод окраски по Ольту*: на фиксированный препарат-отпечаток, приготовленный из пат-материала, наносят 2% -ный водный раствор сафранина и красят 5 мин при подогревании в пламени спиртовки, не допуская кипения красителя. Микрокартина: капсула — желтая, тело бактерии — красное.

Наличие или отсутствие капсулы является четвертым признаком при определении вида.

Исследование бактерий на подвижность. Некоторые бактерии имеют органы движения — жгутики, тончайшие нити диаметром 0,02–0,05 мкм, длиной до 10 мкм. Под световым микроскопом жгутики не видны, так как их размеры лежат за пределами разрешающей способности микроскопа, их наличие можно определить косвенным путем — бактерии изучают в живом состоянии: если они передвигаются, значит, у них есть органы движения. По расположению жгутиков на теле микробной клетки их можно разделить на 4 группы:

- 1) монотрихи — бактерии с одним жгутиком на конце;
- 2) лофотрихи — бактерии с пучком жгутиков на одном конце;
- 3) амфотрихи — бактерии с пучком жгутиков на обоих концах;
- 4) перитрихи — бактерии со жгутиками по всей поверхности тел.

Извитые формы (спириллы и спирохеты) передвигаются за счет изменения конфигурации тела.

Методика определения подвижности бактерий в препаратах «висячая капля» и «раздавленная капля». Для приготовления препарата «висячая капля» используют молодую 16–18-часовую бульонную культуру изучаемых бактерий (сенная палочка, кишечная палочка), смазывают вазелином края лунки на специальном предметном стекле с луночкой в центре, наносят каплю взвеси в центр покровного стекла. Предметное стекло с лункой переворачивают и накладыва-

ют на покровное стекло так, чтобы оно прилипло, а капля оказалась в центре лунки. Затем его осторожно еще раз переворачивают покровным стеклом вверх, чтобы капля висела в центре герметично закрытой лунки. При микроскопии под $\times 8$ объективом находят край капли, фиксируют предметное стекло клеммами и переводят под объектив $\times 40$ (можно и иммерсионный). Для более контрастного изображения надо затемнить поле зрения, слегка прикрыв диафрагму и опустив конденсор. Подвижность хорошо видна уже под объективом $\times 40$, при активном движении с помощью жгутиков бактерии пересекают все поле зрения.

Для приготовления препарата «раздавленная капля» в центр предметного стекла наносят каплю исследуемой культуры и накрывают покровным стеклом.

Наличие жгутиков является пятым признаком для определения вида.

Задания для самостоятельной работы

1. Приготовить препарат из смеси стафилококков и кишечной палочки, окрасить по Граму.
2. Изучить под микроскопом готовые препараты, окрашенные по Граму, на споры по Златогорову, на капсулы по Ольту.
3. Приготовить препарат «висячая капля» из сенного настоя, изучить подвижность сенной палочки под $\times 40$ объективом.

Тема 3

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ИХ ВЫРАЩИВАНИЯ. МЕТОДЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Цель занятия. Иметь представление о назначении питательных сред. Ознакомиться с методами приготовления питательных сред. Ознакомиться с методами стерилизации, применяемыми в микробиологической практике.

Материалы и оборудование. Компоненты для приготовления питательных сред — сухой агар-агар, пептон, поваренная соль, желатин. Набор готовых питательных сред в пробирках. Образцы сухих питательных сред фабричного

производства. Автоклав, электрический сушильный шкаф, текучепаровой аппарат Коха, стерилизатор с набором инструментов, твердые фильтры из белой глины, фильтры из нитроцеллюлозы, фильтр Зейтца.

Таблицы: Классификация питательных сред, Методы стерилизации.

Характеристика и классификация питательных сред. В микробиологических лабораториях готовят питательные среды для выращивания микроорганизмов с учетом их физиологических потребностей. Ко всем питательным средам предъявляются общие требования:

1. Питательные среды должны содержать все питательные вещества, источники углерода и азота, обеспечивающие оптимальный рост.

2. Питательные среды должны быть влажные, так как микроорганизмы питаются поверхностью тела путем осмоса и диффузии, продукты метаболизма выделяются только в растворенном виде.

3. Оптимальная рН в пределах 7,2–7,4 для большинства бактерий.

4. Питательные среды должны быть стерильными.

В настоящее время во многих микробиологических лабораториях применяют сухие питательные среды фабричного приготовления, из которых по инструкции готовят среды для выделения возбудителя из исследуемого материала, для изучения культуральных и биохимических свойств микроорганизмов, для выращивания и сохранения музейных штаммов микроорганизмов. В таблице 5 представлена классификация питательных сред.

Таблица 5

Классификация питательных сред

По составу	По физическим свойствам	По назначению
<p><i>Естественные:</i> в состав входят компоненты растительного и животного происхождения</p> <p><i>Синтетические:</i> в их состав включают химически чистые компоненты, содержащиеся в строго определенных количествах</p>	<p>Жидкие</p> <p>Полужидкие</p> <p>Плотные</p> <p>Сухие</p>	<p>Простые</p> <p>Специальные</p> <p>Дифференциально-диагностические</p> <p>Элективные</p>

В состав естественных сред входят компоненты растительного и животного происхождения: овощные, фруктовые соки, молоко, кровь, экстракты из мяса и т. д. Из этой группы сред широко применяются МПБ (мясо-пептонный бульон), МПА (мясо-пептонный агар).

Синтетическими называют среды, в состав которых вводят физиологически обоснованные определенные количества известных химически чистых соединений, углеводов, аминокислот, витамины, различные соли. При изучении метаболических потребностей микроорганизмов в питательные среды вводят радиоактивно меченые углерод, фосфор.

По назначению питательные среды разделяются на обычные, специальные, дифференциально-диагностические, элективные (избирательные).

К *обычным* средам относятся МПБ и МПА, на них растут многие виды микроорганизмов.

При отсутствии роста микробов на простых средах применяются *специальные* среды, в состав которых добавляют углеводы, сыворотку крови.

Дифференциально-диагностические. В их состав добавляю углеводы и индикаторы, изменение цвета которых позволяет отличить одни виды бактерий от других (например, агар Эндо).

В *элективные* среды добавляют ингибиторы и антибиотики, которые подавляют рост сопутствующей микрофлоры и обеспечивают преимущественные условия для размножения выделяемого возбудителя.

Приготовление питательных сред. *Обычные питательные среды.* К ним относятся мясо-пептонный бульон (МПБ) и мясо-пептонный агар (МПА). Основой для приготовления этих сред служит мясной экстракт, приготовленный по следующей методике: 1 кг говяжьего фарша заливают 2 л водопроводной воды, экстрагируют сутки в холодильнике. Фильтруют и отжимают через марлю, кипятят 60 мин для свертывания белков, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, доливают до первоначального объема, разливают по флаконам и стерилизуют в автоклаве. В нем содержится большое количество аминокислот, углеводов, факторов роста, минеральных солей и экстрактивных веществ.

МПБ — интенсивно-желтая, прозрачная, жидкая питательная среда. К 1 л мясного экстракта добавляют 10 г пептона (1%) и 5 г поваренной соли (0,5%), устанавливают рН среды 7,6. Разливают по пробиркам, флаконам и автоклавировуют.

МПА — для его приготовления к 1 л МПБ добавляют 2–3% агар-агара, расплавляют в водяной бане, разливают по пробиркам или флаконам, стерилизуют в автоклаве. (Агар-агар — это полисахарид, получаемый из морских водорослей. Придает питательной среде плотную консистенцию, которая сохраняется и в условиях термостата.)

МПЖ — к МПБ добавляют 10–15% желатина, после набухания его нагревают до полного расплавления, при охлаждении придает питательной среде плотную консистенцию, но только при комнатной температуре, так как в термостате расплавляется. Применяют для изучения протеолитических свойств микроорганизмов, при наличии которых МПЖ разжижается.

Специальные среды. Сахарный МПБ и МПА. К обычным средам добавляют 1–2% глюкозы, разливают по пробиркам и стерилизуют текучим паром дробно.

Сывороточный МПБ и МПА. К МПБ добавляют 5–10% стерильной сыворотки крови и разливают по пробиркам. МПА расплавляют, охлаждают до 45–50°C и добавляют 5–10% сыворотки крови. Полученную среду разливают в чашки Петри или пробирки.

Кровяной МПА. К расплавленному и охлажденному до 45°C МПА, разлитому в чашки Петри, стерильно прибавляют 5–10% дефибринированной крови (кролика, барана). На этой среде изучают способность бактерий лизировать эритроциты крови.

Дифференциально-диагностические среды. Среда Эндо выпускается в сухом виде, фабричного изготовления. В ее состав входит МПА, 1% лактозы и обесцвеченный фуксин. Эта среда применяется для дифференциации бактерий группы кишечной палочки (БГКП) от сальмонелл. Только кишечная палочка расщепляет лактозу, входящую в состав агара Эндо, до молочной кислоты, изменяющей рН среды. В кислой среде фуксин восстанавливает цвет и окрашивает коло-

нии кишечной палочки в красный цвет с металлическим оттенком, а сальмонеллы, не расщепляющие лактозу, образуют неокрашенные колонии, что позволяет их дифференцировать друг от друга.

Элективные среды. В элективные среды (среды накопления) добавляют ингибиторы (желчь, анилиновые краски, 10% поваренной соли, антибиотики), подавляющие рост сопутствующей микрофлоры. Элективные среды обеспечивают преимущественные условия для размножения, выделяемого возбудителя.

В состав сред Петраньяни, Гельберга, предназначенных для выделения возбудителя туберкулеза, входит малахитовая зелень, подавляющая рост и размножение сопутствующей микрофлоры.

В состав среды Кауфмана, предназначенной для выделения возбудителя сальмонеллеза, входит бычья желчь, подавляющая рост кишечной палочки.

В состав солевого агара добавляют 7–10% поваренной соли, что позволяет выделить чистую культуру стафилококка из загрязненного материала (молоко, гной).

Методы стерилизации питательных сред и посуды. *Стерилизацией* называют полное уничтожение всех видов и форм микроорганизмов (вегетативных и споровых) в стерилизуемых объектах.

Главными требованиями ко всем методам стерилизации являются их надежность и сохранение первоначальных свойств стерилизуемых объектов. В связи с большим разнообразием стерилизуемых объектов разработаны различные методы стерилизации.

Различают физические, химические и механические методы стерилизации. К физическим методам стерилизации относят действие высокой температуры, ультрафиолетовых лучей (УФ), ионизирующей радиации, ультразвука. Химические методы применяют для обработки вакцин, сывороток и других объектов, консервируемых различными антисептиками. Механический метод рекомендуют применять для фильтрации жидкостей, которые нельзя нагревать. Для этого применяют специальные бактериальные фильтры, в порах которого остаются бактерии, но вирусы проходят.

Физические методы стерилизации. Термическая обработка.

1. Стерилизацию в пламени (в условиях лаборатории чаще в пламени спиртовки), или фламбирование, применяют только для обработки мелких инструментов, таких как бактериологические петли, пинцеты, скальпели, ножницы, пастеровские пипетки.

2. Стерилизацию сухим жаром проводят в электрических сушильных шкафах при 165°C в течение 2 ч. Этим методом стерилизуют лабораторную стеклянную посуду, предварительно завернутую в бумагу.

3. Кипячение в специальных стерилизаторах в течение 30 мин применяют для обработки хирургических инструментов, но некоторые споры выдерживают такой режим обработки.

4. Стерилизация паром. Различают следующие методы.

Паром под давлением — проводится в автоклаве, который представляет собой двустенный металлический котел с герметично привинчивающейся крышкой. Давление внутри автоклава показывает манометр. На шкале манометра обозначается только избыточное давление, нормальное давление соответствует показанию «0». Работа с автоклавом требует строгого выполнения правил и техники безопасности, предусмотренных специальной инструкцией:

- через воронку налить дистиллированную воду до метки и закрыть кран;
- загрузить стерилизационную камеру, герметично закрыть;
- включить нагревательную систему при открытых паровыпускающих кранах. Кран закрывают, когда появится непрерывная струя пара, свидетельствующая о том, что весь воздух из камеры вытеснен;
- во время работы автоклава наблюдают за показателями двух манометров: один из них показывает давление в рабочей камере, другой автоматически поддерживает заданный режим работы. При давлении в 0,5 атм температура в автоклаве равна 110–112°C, 1,0 атм — 120–121°C, 1,5 атм — 124–126°C, 2,0 атм — 132–134°C;

- электронагревательные приборы выключают после окончания стерилизации.

Автоклав открывают только после того, как давление упадет до нуля.

На бактерии губительно действуют высокая температура и давление, таким образом, автоклавирование является самым надежным методом стерилизации. Эффективность стерилизации можно проверить, помещая в автоклав материал, заведомо зараженный спорообразующими бактериями.

В автоклаве стерилизуют питательные среды, физраствор, посуду, отработанные бактериальные культуры, вату, бинты.

Дробная стерилизация текучим паром проводится в аппарате Коха или чаще в автоклаве с открытым паровыводящим краном. Этот метод рекомендуют применять для сред (с углеводами, желатиной), которые изменяют свои свойства при температуре выше 100°C. Режим работы: три дня подряд по 40 мин с момента закипания. Суть сводится к тому, что при первом прогревании погибают вегетативные клетки, а споры остаются и при комнатной температуре в течение суток прорастают. Повторное прогревание снова обезвреживает вегетативные клетки. Третье прогревание убивает все остальные бактерии, появившиеся из спор.

5. П а с т е р и з а ц и я (частичная стерилизация) — прогревание при температуре ниже 100°C. Например, молоко пастеризуют при 74–76° в течение 20 с. Цель пастеризации — уничтожение патогенных бактерий (возбудителей туберкулеза, бруцеллеза), а также гнилостных, молочнокислых бактерий. После пастеризации молоко сразу охлаждают до 4°C, чтобы предотвратить размножение оставшейся термофильной и споровой микрофлоры. Пастеризовать рекомендуют соки, пиво, вино, которые нельзя прогревать при более высокой температуре, так как снижается биологическая ценность продукта.

Облучение электромагнитными волнами.

1. Ультрафиолетовые лучи (длиной 250–270 нм), подавляющие репликацию ДНК, широко применяются для санации воздуха в животноводческих помещениях, в цехах молзаводов, в микробиологических боксах для создания

асептических условий. Для дезинфекции воздуха применяют лампы низкого давления типа БУВ-15, БУВ-60.

2. Ионизирующая радиация (холодная стерилизация) поражает генетический аппарат микробной клетки. Гамма- и рентгеновское облучение применяют для уничтожения микробов на пластмассовых изделиях одноразового применения, перевязочных материалах, биопрепаратах (при этом не снижается их качество).

3. Действие ультразвука заключается в дезинтеграции цитоплазматических структур микроорганизмов. Применяют для стерилизации пищевых продуктов (молока, воды).

Химические методы. Химические вещества могут тормозить или полностью подавлять рост микроорганизмов, поэтому их можно применять с целью профилактики микробного загрязнения питательных сред, вакцин, диагностических и лечебных сывороток.

Вакцины и лечебные сыворотки консервируют карболовой кислотой (0,5%), формалином (0,5%), мертиолятом (1:5000).

Диагностические агглютинирующие сыворотки консервируют хлороформом (который при применении улетучивается), борной кислотой, глицерином.

Для дезинфекции в лабораторной практике применяют 3–5%-ные растворы карболовой кислоты, 3%-ные растворы хлорамина, 70°-ный этиловый спирт.

Механические методы. Эти методы основаны на фильтрации жидкостей через специальные бактериальные фильтры, которые задерживают видимые под микроскопом микроорганизмы. Через них свободно проходят вирусы и микоплазмы, поэтому данные методы следует признать как «частичную» стерилизацию.

Механические методы стерилизации рекомендуется применять для биологических жидкостей, которые нельзя обрабатывать другими методами, например, сыворотку крови, растворы витаминов.

Бактериальные фильтры изготавливаются из различных материалов. Они имеют различную форму и разный диаметр пор, указанный в прилагаемой инструкции.

В микробиологической практике широко используются фильтры-свечи, изготовленные из каолина с примесью квар-

цевого песка («свечи» Шамберлана), из инфузорной земли («свечи» Беркефельда) с различным диаметром пор, в которых фильтрация происходит только под давлением.

Особенно широкое применение нашли так называемые мембранные фильтры-диски различного диаметра, толщиной 0,1 мм, изготовленные из асбеста, коллодия, целлюлозы (они рассчитаны на одноразовое применение). Фильтры монтируют в прибор Зейтца, который состоит из приемного стакана-воронки и колбы Бунзена. Перед работой собранный прибор заворачивают в бумагу и стерилизуют автоклавированием. Жидкость, подлежащую стерилизации, наливают в воронку прибора, внутри колбы создают вакуум и жидкость проходит через фильтры, освобождаясь от бактерий.

Задания для самостоятельной работы

1. Познакомиться с компонентами для приготовления питательных сред: агар-агар, пептон, поваренная соль химически чистая.
2. Познакомиться с готовыми питательными средами МПА, МПБ, МПЖ, разлитыми в чашки Петри, в пробирки — столбиком, косым агаром.
3. Познакомиться с набором сухих питательных сред в банках в фабричной упаковке.
4. Ознакомиться с автоклавом, электрическим сушильным шкафом, аппаратом Коха, стерилизаторами, аппаратом Зейтца, твердыми и мягкими фильтрами из нитроцеллюлозы.

Тема 4

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ БАКТЕРИЙ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ. ПОСЕВЫ И ПЕРЕСЕВЫ БАКТЕРИЙ. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ. КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ И ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ

Цель занятия. Овладеть техникой посева бактерий на питательные среды, ознакомиться с методами их культивирования, освоить методы выделения чистой культуры. Ознакомиться с культуральными и ферментативными свойствами бактерий на питательных средах.

Материальное оснащение. Пробирки со смывом золотистого стафилококка и кишечной палочки, чашки Петри

с МПА, агаром Эндо. Набор готовых посевов на МПА и МПБ с различными культуральными признаками, агар Эндо с посевом кишечной палочки и сальмонеллы. Набор посевов для демонстрации протеолитических свойств бактерий — выделение сероводорода, индола, аммиака. Бактериологические петли, спиртовки. Набор красок для окраски по Граму, предметные стекла, иммерсионное масло, микроскопы.

Таблицы: Культуральные свойства бактерий, Ферментативные свойства бактерий (короткий пестрый ряд).

Техника посевов бактерий на питательные среды. Все микробиологические исследования проводят в специальных помещениях — боксах. Посевы и пересевы проводят над пламенем спиртовки, инструментами для посева служат бактериологические петли, иглы и пастеровские пипетки.

При посеве бактерий на питательные среды или пересеве из одной пробирки в другую применяют следующую методику. Пробирку с чистой культурой и пробирку со скошенным МПА берут в левую руку так, чтобы пробирка с чистой культурой была первой по отношению к работающему. В правой руке находятся бактериологическая петля и две пробки от открытых пробирок, зажатые мизинцем и безымянным пальцем. Обжигают края открытых пробирок и вводят прокаленную петлю в пробирку с культурой. Петлю охлаждают о внутреннюю стенку пробирки или прикасаются к участку незасеянного агара и, если он не плавится, захватывают петлей часть бактериальной культуры. Быстро и осторожно вносят петлю с культурой в пробирку со стерильной средой, опускают до дна косяка и зигзагообразным движением петли распределяют материал по скошенной поверхности агара. После посева петлю извлекают, обжигают края пробирок и закрывают пробирки обожженными пробками, затем прокаливают петлю.

Для посева в жидкие питательные среды применяют методику, описанную выше, только петлю с исследуемым материалом вносят в МПБ.

Посев на плотные среды в чашках Петри проводят также бактериологической петлей или стеклянным шпателем. Для этого крышку чашки Петри чуть приподнимают левой рукой, вводят под крышку бактериологическую петлю с посевным материалом и распределяют по поверхности среды штрихом.

Методы культивирования бактерий. Для выращивания микроорганизмов в лабораторных условиях применяют термостат, в котором круглосуточно автоматически поддерживается постоянная температура.

Термостат представляет собой двустенный шкаф с сетчатыми полками внутри и открывающейся дверью, сделанными из теплоизолирующих материалов. Между двумя стенками находится дистиллированная вода или воздух, если термостат суховоздушный. Источником нагревания в термостате являются электронагревательные элементы, которые прогревают воду или воздух. Температура автоматически поддерживается на заданном уровне, чаще в пределах 37°C, так как эта температура является оптимальной для большинства сапрофитных и патогенных микроорганизмов. В термостат помещают штативы с пробирками, колбы и чашки Петри с посевами изучаемых микроорганизмов.

Для успешного культивирования бактерий необходимо применять свежие питательные среды. Особенно это касается плотных питательных сред, которые разливают в чашки Петри или скашивают в пробирках в день посева, чтобы были видны капельки свежего конденсата. При выращивании аэробов и факультативных анаэробов аэрация происходит в естественных условиях без применения каких-либо дополнительных приспособлений.

Сроки культивирования большинства патогенных, условно патогенных микроорганизмов составляют 18–24 ч, но есть культуры, растущие медленно, — до 4–6 недель.

Для полного понимания темы необходимо знать специальные термины, применяемые в микробиологии.

Посев — внесение исследуемого материала в питательные среды. *Цель посева* — выделение и накопление возбудителя для дальнейшего изучения. *Пересев* — перенос выросшей бактериальной культуры в новую питательную среду. *Бактериальной культурой* называют микроорганизмы, выросшие на искусственных питательных средах. Различают *чистую бактериальную культуру*, в которой все бактерии относятся к одному виду, и *загрязненную*, если в ней присутствуют неизвестные бактерии. *Любое бактериологическое исследование начинают с выделения чистой культуры, так*

как только в чистой культуре можно определить вид возбудителя.

При посеве необходимо соблюдать следующие правила: работа должна проводиться в боксе, над пламенем спиртовки, петлей нельзя прикасаться к посторонним предметам, пробки на стол не класть. Начинающим бактериологам нужно приобрести навыки работы в боксе, делать посевы над пламенем, имитируя посевы с пустыми пробирками и чашками.

Методы выделения чистых культур бактерий. Морфологические, культуральные и ферментативные особенности микроорганизмов, необходимые для определения вида микроорганизма, изучают, применяя только чистые культуры бактерий.

Обычно исследуемый материал, содержащий возбудителя инфекционной болезни, возбудителей пищевых токсикоинфекций, загрязнен сопутствующей микрофлорой — выделить чистую культуру из исследуемого материала является основной задачей при проведении бактериологического исследования.

Механический метод, или метод Дригальского, основан на механическом разъединении бактерий друг от друга. Для этого каплю исследуемого материала (молоко, кровь, мясо) наносят на поверхность плотной среды в чашке Петри и распределяют по поверхности так, чтобы механически разъединить бактерии, каждая из которых должна образовать изолированную колонию. Известно, что одна бактерия образует одну колонию, следовательно, в этой колонии все бактерии будут принадлежать к одному виду. После посева чашку маркируют, ставят в термостат при 37°C на 24 ч, посеянные бактерии размножаются и образуют видимую колонию. Колонии изучают с помощью лупы, нужную колонию обводят восковым карандашом со стороны дна чашки, готовят из нее мазок и окрашивают по Граму. При микроскопии изучают морфологические особенности (форма, наличие споры и капсулы) и отношение бактерий к окраске по Граму. Из этой колонии делают пересев на МПА и МПБ в пробирках. Убедившись в том, что выделенная бактериальная культура чистая, приступают к изучению ее культуральных, ферментативных

свойств и подвижности, а также определяют ее чувствительность к антибиотикам.

Биологические методы выделения чистых культур основаны на учете биологических особенностей бактерий, таких как устойчивость к высокой температуре и кислоте, подвижность, а также их патогенность.

1. Для выделения чистой культуры с п о р о о б р а з у ю щ и х микроорганизмов исследуемый материал прогревают 10 мин при 80°C в расчете на то, что менее стойкие вегетативные формы погибнут при этой температуре, а споры останутся жизнеспособными. Из прогретого материала делают посев в питательные среды, на которых вырастают изолированные колонии спорообразующих микроорганизмов. Из этих колоний делают пересев и получают чистую культуру нужного возбудителя.

2. Для выделения чистой культуры к и с л о т о у с т о й ч и в ы х возбудителей туберкулеза патологический материал обрабатывают 10%-ным раствором серной кислоты в течение 10–15 мин. Благодаря действию кислоты, погибает сопутствующая микрофлора, а возбудитель туберкулеза остается жизнеспособным. После нейтрализации раствора кислоты проводят посев на специальные питательные среды, на которых растут возбудители туберкулеза.

3. Для выделения чистой культуры п а т о г е н н ы х микроорганизмов, находящихся в загрязненном исследуемом материале, проводят заражение восприимчивых лабораторных животных (кролики, морские свинки, белые мыши). Организм животного здесь играет роль биологического фильтра. После заражения и гибели животных трупы вскрывают и из всех внутренних органов делают посевы на питательные среды, на которых появляются изолированные колонии возбудителя.

4. Выделение подвижных микроорганизмов (метод Щукевича).

Исследуемый материал, из которого предполагается выделение подвижных бактерий, вносят бактериологической петлей только в конденсат скошенного МПА, ставят в термостат при 37°C на 24 ч. Если в исследуемом материале были подвижные бактерии из рода *Протеус*, они дают ползучий

рост вверх по МПА, из этих колоний делают посев на питательные среды и получают чистую культуру. Наличие палочки протeya на поверхности мяса свидетельствует о антисанитарных условиях хранения продуктов.

Культуральные свойства бактерий. Культуральные свойства — характер роста бактерий на плотных и жидких питательных средах изучают для определения вида микроорганизмов.

Культуральные свойства бактерий на МПА. Бактерии на МПА образуют колонии, которые изучают при помощи лупы в проходящем свете и учитывают следующие признаки:

- величину колоний (мелкие — 1 мм и крупные — 5 мм в диаметре);
- форма колоний (круглая, правильной S-формы, неправильная R-формы);
- край колоний (гладкий или изрезанный);
- степень прозрачности (прозрачные, плотные);
- наличие пигмента (белые, желтые, красные, прозрачные);
- консистенция (слизистая, сухая);
- поверхность (плоская, выпуклая, морщинистая).

Культуральные свойства бактерий в МПБ. Стерильный МПБ прозрачный, а после посева и размножения микроорганизмов бульон изменяется и появляются следующие признаки:

- помутнение (обильное, умеренное или в виде нежной опалесценции);
- поверхностный рост в виде пристеночного кольца или пленки;
- осадок на дне пробирки (слизистый, крошковидный);
- пигмент (сине-зеленый, желтый, красный).

Культуральные свойства — это шестой признак при определении вида бактерий.

Ферментативные (биохимические) свойства бактерий. Ферментативные свойства это способность бактерий при помощи ферментов расщеплять сложные органические соединения, изучают для определения вида микроорганизмов.

Сахаролитические свойства бактерий изучают на питательных средах, в состав которых входят различные углеводы и индикаторы.

Для изучения сахаролитических свойств применяют жидкие (среды Гисса) и плотные (среды Эндо, Левина, Плоскирева) питательные среды. Бактерии, имеющие определенные ферменты, расщепляют углеводы, высшие спирты до альдегидов, кислот и газообразных продуктов.

В жидких питательных средах образование кислоты устаниавливают по изменению цвета индикатора, а появление газа — по пузырькам газа в пробирках-поплавках.

При отсутствии ферментации цвет среды не меняется. Поскольку бактерии ферментируют не все, а только некоторые углеводы, входящие в состав сред Гисса, наблюдается довольно пестрая картина. Поэтому набор сред с углеводами и цветным индикатором был назван «пестрым рядом».

На плотных дифференциально-диагностических средах, в состав которых входят углеводы и индикатор, вырастают колонии, имеющие различную окраску. Например, кишечная палочка, ферментирующая лактозу, на агаре Эндо образует красные колонии, а сальмонеллы, не имеющие фермента лактазы, образуют бесцветные колонии.

Протеолитические свойства бактерий изучают на средах, в состав которых входят белки.

М о л о к о — под действием протеолитических ферментов молоко свертывается, а потом в результате пептонизации, т. е. глубокого расщепления белков сгусток растворяется.

М П Ж — плотность этой среды сохраняется только при комнатной температуре. Посев изучаемых бактерий делают уколом в глубину столбика. Посевы выдерживают при комнатной температуре 5–7 дней, при этом изучают не только разжижение среды, но и его особенности. Под действием протеолитических ферментов разжижение может происходить на поверхности в виде воронки, если это аэробные бактерии, и в глубине — если это анаэробные.

При глубоком расщеплении белка до конечных продуктов выделяются индол, аммиак, сероводород. Для выявления этих газов над засеянной средой между стенкой пробирки и пробкой фиксируют индикаторную бумагу, посевы выдерживают в термостате в течение 1–3 суток.

- для обнаружения индола индикаторную полоску, пропитанную насыщенным раствором щавелевой кислоты, фиксируют над посевом. При выделении индола на 2–3-й день после посева нижняя часть полоски бумаги приобретает розовый цвет в результате соединения индола со щавелевой кислотой;
- для обнаружения аммиака над посевом фиксируют розовую лакмусовую полоску индикаторной бумаги, которая синееет;
- для обнаружения сероводорода над посевом фиксируют полоску бумаги, пропитанную уксуснокислым свинцом. При взаимодействии сероводорода и уксуснокислого свинца бумага чернеет за счет образования сернистого свинца.

Ферментативные свойства это седьмой признак при определении вида бактерий.

Задания для самостоятельной работы

1. Сделать посев из смеси культур кишечной палочки и стафилококка на поверхность МПА методом Дригальского для выделения чистой культуры.
2. Освоить методы изучения культуральных свойств бактерий на МПА и МПБ.
3. Освоить методы изучения ферментативных (биохимических) свойств кишечной палочки и сальмонелл на демонстрационных посевах на среды Гисса (короткий пестрый ряд) и на агар Эндо.

Тема 5

САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДУХА И ПОЧВЫ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИ-ТИТРА И КОЛИ-ИНДЕКСА ВОДЫ

Цель занятия. Овладеть различными методами исследования микрофлоры воздуха, почвы и воды. Определить источники загрязнения.

Материальное оснащение. Для исследования *воздуха*: чашки Петри с МПА, аппарат Кротова.

Для исследования *почвы*: образцы почвы в пакетиках по 1 г, стерильный физраствор в пробирках по 9 мл, стерильные пипетки на 1 мл, расплавленный МПА в пробирках, чашки Петри.

Для исследования *воды*: пробы водопроводной и речной воды, чашки Петри, расплавленный МПА в пробирках, стерильные пипетки на 1 мл, стерильный физраствор по 9 мл. Для демонстрации: прибор Зейтца с колбой Бунзена, водоструйный вакуумный насос, мембранные фильтры № 3, среда Эндо в чашках, глюкозо-пептонные среды (ГПС) с индикатором и поплавками, разлитые в пробирки и колбы. Колбы и пробирки с ГПС с посевами воды для демонстрации метода бродильных проб с положительными результатами.

Таблицы: Схема определения коли-титра воды.

Санитарно-бактериологическое исследование воздуха.

С санитарно-бактериологической точки зрения воздух представляет собой среду, в которой микроорганизмы не способны размножаться. В воздухе нет питательных веществ и влаги, солнечные лучи оказывают бактерицидное действие. Тем не менее в воздухе постоянно имеются пигментообразующие кокки, споры бактерий, плесеней и актиномицетов.

Болезнетворные микробы попадают в воздух из почвы и с выделениями больных людей и животных. Воздух животноводческих помещений загрязняется во времяфыркания, чихания и кашля животных, во время раздачи сухих кормов и уборки.

Выживаемость патогенных микроорганизмов, находящихся во взвешенном состоянии, зависит от биологических свойств возбудителя, а также от температуры и влажности воздуха. Например, возбудители туберкулеза, сибирской язвы, хорошо переносящие высыхание, длительное время сохраняются в окружающей среде.

Микробиологическое исследование воздуха проводят для определения количества МАФAnM в 1 м³ и наличия санитарно-показательных микроорганизмов. Количество МАФAnM в воздухе определяют посевом на МПА в чашках; наличие санитарно-показательных микробов определяют посевом на кровяной агар, желточно-солевой или кровяно-солевой агар. Для определения наличия спор плесеней и дрожжей делают посев на сусло-агар или среды Сабуро.

Существует много методов бактериологического исследования воздуха. Самыми доступными и чаще применяемыми являются методы Коха и Кротова.

Седиментационный метод Коха. Суть метода заключается в осаждении микробных частиц и капель аэрозоля на поверхность плотной питательной среды под действием силы тяжести. Методика: чашки Петри оставляют открытыми на 5–15 мин на ферме, в классе, в цехах молочного завода и т. д. Чашки закрывают и помещают в термостат при 37°C, если это МПА или кровяной агар, культивируют в течение 48 часов; если это среда Сабуро — культивируют при 22–25°C в течение 4 суток. Затем проводят подсчет количества выросших колоний во всей чашке.

После подсчета количества выросших колоний в чашке Петри определяют количество бактерий в 1 м³ воздуха по формуле Омелянского, согласно которой на поверхность питательной средой площадью 100 см² в течение 5 мин оседает столько микробных клеток, сколько их содержится в 10 л воздуха:

$$x = \frac{a \cdot 100 \cdot 1000 \cdot 5}{b \cdot 10 \cdot T},$$

где x — количество микробов в 1 м³ (1000 л) воздуха; a — количество выросших колоний в чашках; b — фактическая площадь чашки (80 см²); 5 — время экспозиции по правилу Омелянского; T — время, в течение которого чашка была открыта; 10 — 10 л воздуха по правилу Омелянского; 1000 — 1 м³ воздуха; 100 — 100 см² питательной среды по Омелянскому.

Аспирационный метод Кротова. Этот метод является более точным, так как прибор снабжен микроманометром, показывающим количество литров (объем) посеянного воздуха. *Аппарат Кротова* — это цилиндрический прибор, внутри которого имеется электромотор с центробежным вентилятором. При вращении вентилятора из исследуемого помещения воздух засасывается через узкую клиновидную щель в крышке прибора. Под крышкой прибора находится вращающаяся платформа с чашкой Петри, струя воздуха ударяется о поверхность питательной среды, микроорганизмы из воздуха оседают. Чашки с посевами помещают в термостат на 24–48 ч при 37°C. Подсчет колоний производят так же, как и при седиментационном методе. В дальнейшем число микробов в 1 м³ воздуха определяют по формуле:

$$x = \frac{a \cdot 1000}{b},$$

где x — число микробов в 1 м^3 воздуха; a — число выросших колоний; 1000 л — 1 м^3 воздуха; b — количество посеянного воздуха.

Санитарно-бактериологическое исследование почвы.

Почва является естественной средой обитания многих видов микроорганизмов. В ней имеются все условия для благоприятного их развития: достаточное количество влаги, органических и минеральных веществ. Почвенные микроорганизмы участвуют в минерализации органических отходов, самоочищении почвы, в круговороте веществ в природе.

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

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

- аммонификаторы (гнилостные);
- нитрифицирующие бактерии;
- азотфиксирующие;
- бактерии, расщепляющие клетчатку;
- бактерии, участвующие в круговороте серы, железа, фосфора.

В почве могут быть и патогенные бактерии, продолжительность их выживания зависит от вида и условий внешней среды.

Особое место занимают возбудители почвенных инфекций (сибирской язвы, эмфизематозного карбункула, столбняка, ботулизма), которые образуют споры и сохраняются в почве годами.

Краткий санитарно-бактериологический анализ почвы включает определение двух показателей:

- общего микробного числа — количество МАФАНМ в 1 г;
- коли-титра почвы;
- в отдельных случаях в почве определяют наличие возбудителей сибирской язвы, столбняка, ботулизма (при строительстве новых животноводческих помещений).

Отбор проб почвы. На обследуемой территории до 1000 м³ выделяют два участка по 25 м² каждый: один участок выбирают вблизи, другой — вдали от источника загрязнения. С каждого участка отбирают среднюю пробу, составленную из 5 образцов, взятых по диагонали. Образцы берут на глубине до 20 см, при исследовании почвы скотомогильников — ниже глубины захоронения не менее чем на 25 см. Пробы отбирают стерильной железной лопатой или специальным буром в стерильные широкогорлые банки, которые закрывают ватными пробками. К банке приклеивают этикетку с датой и номером образца.

Определение общего микробного числа — количества МАФАНМ в 1 г почвы. Масса каждого образца должна быть 200–300 г, а смешанного — не менее 1 кг. Отобранные пробы почвы направляют в лабораторию и исследуют сразу же или не позднее чем через 12–18 ч при хранении в холодильнике.

Методика. В колбу наливают 270 мл стерильной водопроводной воды и вносят 30 г исследуемой почвы. Колбу с содержимым встряхивают в течение 10 мин. Из полученного разведения почвы $1:10^{-1}$ готовят десятикратные разведения: для чистых почв от $1:10^{-2}$ до $1:10^{-4}$, для загрязненных — до $1:10^{-6}$ и больше.

В классе удобнее делать разведения в пробирках, для этого первое разведение готовят внесением 1 г исследуемой почвы в пробирку с 9 мл стерильной воды, из первого разведения $1:10$ переносят 1 мл во вторую с 9 мл воды, получая разведение $1:100$, и т. д. до 10^6 .

Из двух последних разведений почвы (10^{-5} и 10^{-6}) берут по 1 мл и переносят в стерильные чашки Петри (не менее двух чашек на каждое разведение), которые заливают 10 мл расплавленного и охлажденного до 50°C МПА и тщательно пе-

ремешивают (метод горячее заливки). Посевы культивируют в термостате 24–48 ч при 30°C.

Учет результатов проводят путем подсчета выросших колоний и определения среднеарифметического числа. Полученное число колоний умножают на степень разведения исследуемой почвы и получают число бактерий в 1 г почвы.

Определение коли-титра почвы методом бродильных проб с использованием среды Кесслера. Исследования проводят в три этапа. На первом этапе готовят разведения: для чистых почв от $1:10^{-1}$ до $1:10^{-3}$; для загрязненных — от $1:10^{-3}$ до $1:10^{-6}$. После тщательного перемешивания 1 мл полученной суспензии из различных разведений переносят в пробирки со средой Кесслера с поплавками. Посевы культивируют при 43°C в течение 48 ч.

На втором этапе исследования просматривают посевы на среде Кесслера. Из пробирок с наличием газа делают высев на среду Эндо. Посевы культивируют при 37°C в течение 24 ч.

На третьем этапе исследуют колонии, выросшие на среде Эндо. Для этого отмечают и отбирают колонии, типичные для бактерий БГКП, готовят из них мазки, красят по Граму, микроскопируют. При обнаружении в мазках коротких граммотрицательных палочек проводят высев из этих колоний на среду Кесслера для подтверждения газообразования в чистой культуре. В таблице 6 приведены санитарно-микробиологические показатели почвы.

Санитарно-бактериологическое исследование воды. Вода является естественной средой обитания многих микроорганизмов. Особую опасность для здоровья человека и животных представляют патогенные бактерии, которые могут быть в воде.

Таблица 6

Санитарно-бактериологические показатели почвы

Оценка почвы	Общее количество бактерий в 1 г	Коли-титр почвы
Относительно чистая	Менее 10 тыс.	Выше 1,0
Умеренно загрязненная	Сотни тысяч	1,0–0,01
Сильно загрязненная	Миллионы	0,01–0,001

Источниками загрязнения воды патогенными микроорганизмами являются выделения больных животных и людей, трупы животных, сточные воды, особенно предприятий, перерабатывающих животное сырье, и др. Длительность выживания патогенных микробов в воде зависит от их вида, условий окружающей среды и может составлять от нескольких часов до нескольких лет. Так, возбудитель сибирской язвы может сохраняться в воде до 3 лет, возбудитель туберкулеза — до 1 года, а бруцеллы — до 100 дней. Имеется группа болезней, для которых характерен водный путь распространения (паратифы, лептоспирозы).

Таким образом, вода может стать источником распространения инфекционных болезней и возникновения эпизоотий. Для санитарно-бактериологической оценки воды проводят следующие исследования:

- 1) определение общего микробного числа или МАФАНМ в 1 мл;
- 2) определение коли-титра (КТ) и коли-индекса (КИ);
- 3) обнаружение в воде патогенных микроорганизмов.

Для санитарно-бактериологических исследований пробы воды забирают в объеме не менее 0,5 л. Из открытых водоемов пробу воды отбирают батометром. *Батометр* — стерильная емкость с пробкой, в металлическом каркасе и со свинцовым грузилом. На нужной глубине пробку открывают, подтягивая ее за веревочку. Воду из рек, озер отбирают с глубины 10–15 см от поверхности, а при небольшой глубине — на расстоянии 10–15 см от дна.

Для отбора проб водопроводной воды из крана набирают 500 мл в стерильные колбы с ватной пробкой с соблюдением правил асептики. Кран предварительно стерилизуют обжиганием горящим спиртовым тампоном, затем в течение 10 мин спускают воду. Пробы воды исследуют тотчас или не позднее 2 ч с момента взятия. Если это невозможно, то хранят не более 6 ч при 1–5°C в холодильнике.

Определение количества МАФАНМ (мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов) в водопроводной воде. 1 мл водопроводной воды вносят в чашку Петри с соблюдением правил асептики, заливают расплавленным и охлажденным до 50°C МПА (методом горячей за-

ливки). Посевы инкубируют 24 ч в термостате при 30°C. После указанного срока приступают к подсчету количества колоний, выросших как на поверхности, так и в глубине агара. Учитывают только те разведения, при посеве которых на чашках вырастает от 30 до 300 колоний. При посеве воды без разведений количество бактерий в 1 мл воды будет равно количеству выросших колоний.

При определении количества МАФАНМ в воде открытых водоемов исследуемую воду предварительно разводят стерильной водой в зависимости от предполагаемого загрязнения от $1:10^{-1}$ до $1:10^{-4}$, из последних разведений вносят по 1 мл в стерильные чашки и заливают расплавленным и охлажденным до 50°C МПА. После инкубирования при 30°C в термостате в течение 24 ч, подсчитывают количество колоний, умножают на степень разведения воды и определяют количество бактерий в 1 мл воды открытых водоемов.

Определение коли-титра (КТ) и коли-индекса (КИ) воды. К о л и - т и т р о м называют наименьший объем воды, в котором обнаружена одна кишечная палочка.

К о л и - и н д е к с показывает число кишечных палочек в 1000 мл воды.

Кишечная палочка является постоянным обитателем кишечника человека и животных, следовательно, ее присутствие в питьевой воде является индикатором фекального загрязнения. Чем выше концентрация бактерий группы кишечной палочки, тем вероятнее присутствие таких бактерий, как сальмонеллы, возбудители дизентерии и холеры. Показатели КТ и КИ указывают на санитарное состояние воды, ее пригодность в качестве питьевой.

При исследовании чистой воды удобнее пользоваться *методом мембранных фильтров*, при исследовании воды, содержащей механические частицы, затрудняющие процесс фильтрации, лучше пользоваться *бродильным методом*.

Коли-титр и коли-индекс определяют двумя методами:

- 1) методом бродильных проб;
- 2) методом мембранных фильтров.

Метод бродильных проб. Суть этого метода заключается в посеве определенных объемов исследуемой воды в среды накопления с индикатором и поплавками, инкубации ее при

37°C с последующим пересевом из забродивших пробирок на среду Эндо, дифференциацией выросших колоний и вычисления коли-титра воды по нормативами.

Этот метод основан на ферментативной способности бактерий группы кишечной палочки (БГКП) расщеплять при помощи ферментов лактозу или глюкозу до кислоты и газа. Исследуемая вода засеивается в различных объемах в глюкозопептонную среду (ГПС) с индикатором и поплавками, при наличии кишечной палочки появляется помутнение, меняется цвет индикатора и появляются пузырьки газа в поплавках.

Методика. *Первый день.* Засеивают водопроводную воду в объеме 333 мл (три объема по 100 мл, три — по 10 мл и три объема по 1 мл). При этом вода в объемах по 100 и 10 мл засеивается в колбы и пробирки с 10 и 1 мл концентрированной ГПС, а посев воды в объеме 1 мл — в пробирки с 10 мл среды с нормальной концентрации. Посевы инкубируют в термостате 24 ч при 37°C.

Второй день. Учет результатов посева разных объемов воды:

- отсутствие помутнения, образования кислоты и газа в колбах и пробирках после посева воды свидетельствуют о отсутствии кишечной палочки в исследуемом объеме воды;
- наличие кишечной палочки вызывает помутнение питательной среды, изменение цвета индикатора (красный цвет переходит в желтый) и появление пузырька газа в поплавках. Из подозрительных флаконов и пробирок проводят пересев штрихом на агар Эндо в чашках Петри таким методом, чтобы появились изолированные колонии. Посевы инкубируют 24 ч при 37°C.

Третий день. Учет результатов посева на агар Эндо:

- при отсутствии роста на агаре Эндо или при наличии колоний, не характерных для БГКП, дается отрицательный ответ;
- из колоний, характерных для бактерий БГКП (красных с металлическим оттенком), готовят мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют. Изучают культуру по оксидазному тесту. Для этого на фильтровальную бумагу, пропитанную раствором нафтола-диэтил-*n*-фенилендиами-

на, наносят штрихом 2–3 колонии, снятые с агара Эндо. Для кишечной палочки характерно: наличие грамтрицательных палочек в мазке и отсутствие изменений в окраске фильтровальной бумаги на оксидазный тест, т. е. кишечная палочка относится к оксидазоотрицательным бактериям. Наличие в мазках грамтрицательных бактерий с отрицательной реакцией на оксидазный тест позволяет дать положительный ответ на наличие БГКП в исследуемом объеме воды. Полученные результаты сравнивают с нормативами на питьевую воду.

При положительном результате на оксидазный тест бумага, пропитанная индикатором, приобретает ярко-синюю окраску (в течение минуты), положительную реакцию дают БГКП, которые не учитываются.

Для установления свежего фекального загрязнения воды посеvy культивируют при 43°C для дифференциации кишечной палочки хладнокровных, не растущих при такой высокой температуре.

Метод мембранных фильтров. Суть этого метода заключается в концентрировании бактерий из определенного объема на мембранных фильтрах с выращиванием их на поверхности агара Эндо и последующим учетом количества БГКП в 1 л воды.

Первый день. Готовят прибор Зейтца — протирают спиртовым тампоном, обжигают в пламени спиртовки металлические детали (рис. 8).

Готовят мембранные фильтры № 3 из нитроцеллюлозы, с диаметром пор 0,7 мкм, которые задерживают на своей поверхности БГКП. Фильтры кипятят 10–15 мин в дистиллированной воде, затем с соблюдением правил асептики фильтр матовой поверхностью вверх кладут на сетку фильтрационного прибора Зейтца. В воронку прибора наливают исследуемую воду, а в при-



Рис. 8
Фильтр Зейтца
с приемной колбой

емной колбе Бунзена создают вакуум при помощи водоструйного насоса. Исследуемая вода фильтруется через мембранный фильтр, бактерии, находившиеся в ней, остаются на поверхности. После окончания фильтрации воды мембранный фильтр матовой стороной вверх переносят на поверхность агара Эндо в чашках Петри (на одной чашке можно разложить четыре фильтра). Чашки ставят в термостат при 37°C на сутки. Через поры мембранного фильтра происходит диффузия питательных компонентов среды Эндо, вследствие этого оставшиеся БГКП размножаются и за сутки на поверхности фильтра образуют типичные колонии — красные с металлическим оттенком.

Водопроводная вода засеивается (исследуется) в объеме 333 мл, которые последовательно пропускают через четыре фильтра по 200, 100, 30 и 3 мл воды.

Второй день. Учитывают наличие или отсутствие колоний на поверхности фильтров, находящихся на агаре Эндо в чашках Петри:

- отсутствие колоний на поверхности фильтра или наличие колоний, не характерных для БГКП, позволяет дать отрицательный ответ на присутствие кишечной палочки в исследуемом объеме воды;
- при наличии на фильтре колоний, характерных для БГКП, красных с металлическим блеском, исследование продолжают. Для этого готовят препараты из подозрительных колоний, окрашивают по Граму, микроскопируют. При обнаружении грамтрицательных палочек ставят оксидазную пробу — кишечная палочка относится к оксидазоотрицательным. При отрицательном результате оксидазного теста бумага на месте нанесения бактериальной культуры цвет не изменяет, следует учесть, что кишечная палочка относится к оксидазоотрицательным бактериям.

Результат выражают в виде коли-индекса, определяемого суммированием числа колоний кишечных палочек, выросших на поверхности всех мембранных фильтров из всех проб воды, и пересчета этого количества на 1000 мл воды. Зная показатель коли-титра, можно определить коли-индекс: для перевода коли-титра в коли-индекс 1000 делят на пока-

затель коли-титра, а для перевода коли-индекса в коли-титр 1000 делят на число, выражающее коли-индекс.

Например, при исследовании пробы воды профильтровано 3 объема по 100 мл. На первом фильтре выросло 3, на втором фильтре выросло всего 2 колонии, на третьем — 10 колоний, т. е. в общей сложности на трех фильтрах выросло 15 колоний.

Коли-титр этой воды будет равен $300 \text{ мл} : 15 = 20 \text{ мл}$, т. е. 20 мл это наименьший объем воды, в котором находится одна кишечная палочка.

Теперь, зная коли-титр, мы определяем коли-индекс по формуле:

$$\text{Коли-индекс этой воды} = \frac{1000}{\text{коли-титр}} = \frac{1000}{20} = 50.$$

$$\text{Коли-титр этой воды} = \frac{1000}{\text{коли-индекс}} = \frac{1000}{50} = 20.$$

Таким образом, коли-индекс исследуемой воды равен 50, т. е. в 1000 мл воды находится 50 кишечных палочек.

Требования к санитарно-микробиологическому состоянию воды представлены в таблице 7.

Из таблицы видно, что для питьевой воды установлены следующие бактериологические нормативы:

- количество МАФАНМ в 1 мл — не более 100;
- коли-титр — не менее 333;
- коли-индекс не должен превышать 3 кишечных палочек в 1000 мл.

Таблица 7

Микробиологические нормативы санитарного состояния воды

Объект контроля	Количество МАФАНМ, КОЕ, не более	Коли-титр, не менее	Коли-индекс, не более	Периодичность контроля
Вода водопроводная	100 в 1 мл	333	3	1 раз в месяц
Вода открытых водоемов	1000 в мл	111	9	—

Вода открытых водоемов считается доброкачественной, если количество МАФАНМ — не более 1000, коли-титр — не менее 111, коли-индекс — не более 9.

Наличие в воде патогенных бактерий устанавливают путем посева на дифференциально-диагностические и элективные питательные среды с последующей их идентификацией методами, принятыми в микробиологии.

Задания для самостоятельной работы

1. Провести посев воздуха класса методом Коха и методом Кротова в чашки Петри с МПА.
2. Провести отбор водопроводной воды и сделать посев в чашки Петри водопроводной и речной воды для определения количества МАФАНМ в 1 мл.
3. Провести демонстрацию посева водопроводной воды в ГПС для определения коли-титра методом бродильных проб и коли-индекса методом мембранных фильтров.
4. Провести посев 1 г почвы для определения МАФАНМ в 1 г.

Тема 6

СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Цель занятия. Ознакомить студентов с сущностью серологических реакций и методами постановки, а также с их практическим применением при постановке диагноза.

Материальное оснащение. Уленгуттовские пробирки в штативах, пастеровские пипетки или градуированные пипетки на 1 мл с узким капилляром. Компоненты: преципитирующая сибиреязвенная сыворотка (флакон биофабричного изготовления с этикеткой), антиген № 1 (сибиреязвенный антиген биофабричного приготовления), антиген № 2 (экстракт из кожевенного сырья — отрицательный).

Компоненты для постановки РА: единый бруцеллезный антиген для РА и РСК — флакон с этикеткой, содержащий 10 млрд взвесь бруцелл в 1 мл, биофабричного изготовления; положительна бруцеллезная сыворотка, нормальная сыворотка. Для демонстрации штатив с готовой пробирочной реакцией агглютинацией — положительной и отрицательной.

Для постановки РА на предметном стекле: суточная культура сальмонелл на МПА, поливалентная сальмонеллезная агглютинирующая сыворотка, бактериологическая петля, предметные стекла, глазные пипетки, спиртовка.

Свое название серологические реакции получили от *лат. serum*, что означает сыворотка крови, являющаяся обязательным компонентом всех серологических реакций. Во всех серологических реакциях происходит физико-химическое взаимодействие между специфическим антигеном и антителом. При этом один из них неизвестный (так как получен из исследуемого материала), а другой известный (так как биофабричного изготовления, с этикеткой, называется диагностикум), при помощи которого определяют природу неизвестного компонента. Специфическая реакция между антигеном и антителами происходит в электролитической среде, как в организме животного (*in vivo*). Роль электролита в условиях пробирки (*in vitro*) выполняет 0,85% -ный раствор поваренной соли (физиологический раствор).

Антигены — высокомолекулярные генетически чужеродные вещества, которые при введении в организм вызывают иммунный ответ в виде образования антител (иммуноглобулинов *Ig*), появление сенсibilизированных лимфоцитов.

К антигенам, имеющим значение в ветеринарии, относятся живые или убитые микроорганизмы, продукты их жизнедеятельности — токсины, ферменты, продукты метаболизма.

Антитела — специфические белки (иммуноглобулины), образующиеся в организме клетками иммунной системы под воздействием антигена и обладающие свойством специфически с ним связываться (вызывая осаждение, склеивание, лизис).

Серологические реакции используются:

- 1) для выявления в сыворотке крови больного животного антител к тому или иному антигену-микроорганизму;
- 2) для определения вида микроорганизма по известному антителу.

В зависимости от характера антигена и условий взаимодействия с ним антител различают следующие реакции: реакция преципитации (РП), реакция агглютинации (РА),

реакция связывания комплемента (РСК), реакция нейтрализации и др.

Реакция преципитации. Суть реакции состоит в осаждении (преципитации) антигена, находящегося в высокодисперсном состоянии, под воздействием специфических антител. В результате положительной реакции антиген переходит в грубодисперсное состояние и образуется видимый невооруженным глазом комплекс «антиген + антитело» в виде серо-белого кольца, который называется *преципитат*. Антиген в данной реакции называется *преципитиногеном*. Антитела в данной реакции называются *преципитинами*.

В ветеринарной практике реакция преципитации применяется для исследования кожевенного и мехового сырья, мяса, загнившего патологического материала на сибирскую язву.

Реакция преципитации применяется также в судебной медицине и ветеринарии для определения видовой принадлежности крови и в ветеринарно-санитарной практике — для выявления фальсификации мясных, рыбных продуктов и др. При помощи этой реакции можно определить, из какого мяса (свиного, говяжьего и др.) приготовлен тот или иной продукт.

Этот метод был разработан Асколи (1910) в основном для исследования кожевенного сырья на сибирскую язву. Для ее проведения необходимы следующие **компоненты**.

1. Экстракт из исследуемого сырья. Измельчают 1 г кожи, заливают 10 мл карболизованного физиологического раствора и экстрагируют 16–20 ч в условиях холодильника. Затем полученные пробы фильтруют через асбестовую вату, так как экстракт должен быть прозрачным. В экстракте, полученном из кожсырья больных животных, содержится сибиреязвенный антиген в высокодисперсном состоянии.

2. Сибиреязвенная преципитирующая сыворотка во флаконе с фабричной этикеткой. Эту сыворотку получают на биокомбинате путем гипериммунизации лошадей-продуцентов, которым многократно (10–13 раз) вводят возбудитель сибирской язвы (антиген) с интервалом в 3–7 дней в возрастающих дозах от 5 до 70 мл. Через 9–10 дней после последнего введения антигена у лошадей берут кровь в количестве 5–6 л и из нее получают преципитирующую сыворотку, которая содержит специфические антитела против сибирской язвы.

Специфическую сыворотку консервируют 0,5% -ным раствором фенола и отстаивают в течение 2 мес., фильтруют через бактериальные фильтры и разливают в стерильные 50 мл флаконы с этикеткой.

3. 0,85% -ный раствор поваренной соли (физраствор).

4. Для контроля — специфический сибирезвенный антиген, прозрачный экстракт из возбудителя сибирской язвы (биофабричный).

5. Нормальная сыворотка, полученная от здоровых животных, фабричного изготовления.

Методика постановки РП методом наслаивания. В специальные уленгутовские пробирки по стенке наливают 0,2–0,3 мл преципитирующей сыворотки, так, чтобы осталась мокрая дорожка, затем осторожно по этой дорожке наслаивают маленькими капельками в таком же объеме исследуемый экстракт-антиген. При правильном наслаивании должна получиться тонкая и четкая граница между двумя компонентами.

При учете реакции штатив с пробирками держат на уровне глаз и просматривают на черном фоне в проходящем свете. В положительном случае антиген под действие специфических антител преципитирует (осаждается), изменяя физико-химическое состояние, переходя из невидимого высокодисперсного состояния в грубодисперсное. Положительная РП характеризуется появлением не позднее чем через 10–15 мин на границе двух компонентов тонкого серо-белого кольца — преципитата, представляющего собой комплекс «антиген + антитело» и хорошо видимого на черном фоне в проходящем свете.

РП сопровождается проведением контролей:

1. Преципитирующая сыворотка + физиологический раствор (реакция отрицательная).

2. Нормальная сыворотка + экстракт из исследуемой кожи (эталон отрицательной реакции)

3. Преципитирующая сыворотка + специфический антиген (эталон положительной реакции)

Реакция агглютинации. *Агглютинацией* называется склеивание микробных клеток под воздействием антител, находящихся в иммунной сыворотке.

Антиген, вступающий в РА, носит название *агглютиноген*, антитела — *агглютинины*, а комплекс «антиген + антитело», выпадающий на дно в виде зонтика, — *агглютинат*.

Реакция агглютинации в ветеринарной практике применяется для диагностики бруцеллеза, листериоза, сальмонеллеза, колибактериоза и др.

Реакция агглютинации используется в двух целях:

- для обнаружения специфических антител в исследуемой сыворотке при помощи известного антигена (диагностикума);
- для определения вида возбудителя, выделенного из патологического материала, с помощью известных сывороток (диагностикумов), содержащих специфические антитела.

Реакция агглютинации протекает в две фазы. Первая фаза — специфическая, когда происходит образование комплекса «антиген + антитело». Вторая фаза — неспецифическая, когда меняется физико-химическое состояние реакционной жидкости, образуются видимые хлопья агглютината.

Агглютинация происходит при температуре 37°C в растворе электролитов (в физиологическом растворе) при рН 7,2–7,4.

Различают следующие виды агглютинации:

1. О-агглютинацию, соматическую, когда происходит склеивание и оседание неподвижных, не имеющих жгутики микробов. О-агглютинация протекает медленно, в течение 18–24 ч и дает плотный агглютинат, который при встряхивании разбивается на мелкие зерна.

2. Н-агглютинация, жгутиковая, когда происходит склеивание и оседание подвижных, имеющих жгутики бактерий. Н-агглютинация происходит быстрее, уже через 2–4 ч, и образует рыхлый агглютинат, легко разбивающийся на крупные хлопья.

Существует много вариантов постановки реакции агглютинации. Наиболее распространенными методами являются: развернутая РА, которая ставится в пробирках с различными разведениями сыворотки в объеме 1 мл; на предметных стеклах (капельная, пластинчатая, кольцевая проба с молоком, Роз-бенгаловая проба и др.).

Компоненты для постановки классической (пробирочной) РА с целью диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота:

1. У всех животных один раз в год берут кровь из яремной вены в сухие пробирки с номером животного, ставят в теплое место на 30 мин для свертывания крови и отделения сыворотки. Все пробы крови с сопроводительными документами отправляют в районную лабораторию. В этой сыворотке определяют наличие специфических бруцеллезных антигенов. Это неизвестный компонент реакции.

2. Бруцеллезный антиген представляет собой взвесь 10 млрд убитых бруцелл в физрастворе. На этикетке указано наименование препарата и биофабрика, выпустившая его.

3. 0,85% -ный раствор поваренной соли, рН 7,2–7,4 (физраствор).

4. Положительная бруцеллезная сыворотка биофабричного изготовления, в ампуле с этикеткой (для постановки контроля).

5. Нормальная сыворотка биофабричного изготовления, в ампуле с этикеткой (для постановки контроля).

Методика постановки РА пробирочным методом в объеме 1 мл для диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота.

1. В первый ряд штатива ставят 5 пробирок. Количество рядов пробирок зависит от количества проб сывороток, поступивших для исследования.

2. Готовят *основное разведение* каждой исследуемой сыворотки в первой пробирке каждого ряда. Для этого в первую пробирку вносят 2,4 мл физраствора и 0,1 мл исследуемой сыворотки — получается разведение 1:25.

3. Готовят последовательные (рабочие) разведения каждой сыворотки: в третью, четвертую и пятую пробирки всех рядов вносят по 1,0 мл физраствора. Затем из первой пробирки мерной пипеткой переносят во вторую и третью пробирки по 1,0 мл основного разведения сыворотки. В третьей пробирке внесенная сыворотка смешивается с находящимся в ней физраствором (получается разведение 1:100). Из третьей пробирки 1,0 мл сыворотки переносят в четвертую, смешивают (разведение становится 1:200) и 1,0 мл переносят в пятую пробирку (разведение 1:400). Из пятой пробирки 1 мл удаляют, чтобы реакция шла в объеме 1 мл.

4. Во все пробирки добавляют по 2 капли бруцеллезного антигена, осторожно встряхивают штатив и ставят на 10 ч в термостат, а затем оставляют при комнатной температуре.

5. Учет реакции проводят через сутки с момента постановки.

При постановке РА одновременно с исследуемыми сыворотками ставят контроли:

- с нормальной (отрицательной) сывороткой в тех же разведениях, что и с исследуемой;
- с положительной сывороткой в разведениях до предельного титра;
- с физиологическим раствором и антигеном, для контроля качества антигена и физиологического раствора, для исключения спонтанной агглютинации.

Результаты реакции оценивают в «плюсах» по степени просветления реакционной жидкости и выраженности осадка в виде «зонтика».

++++ — полное просветление жидкости, на дне пробирки агглютинат в виде раскрытого перевернутого «зонтика», при легком встряхивании осадок разбивается на мелкие зерна или хлопья, в зависимости от Н- или О-агглютинации;

+++ — неполное просветление жидкости, «зонтик» хорошо выражен, при встряхивании мелкие зерна или хлопья (75% -ная агглютинация);

++ — незначительное просветление жидкости, «зонтик» умеренно выражен, при встряхивании мелкие зерна (50% -ная агглютинация);

+ — едва заметное просветление жидкости, зонтик слабо выражен, при встряхивании осадка появляется небольшое количество зерен (25% -ная агглютинация);

(—) — на дне пробирки «точка» или «пуговка» из осевших микробов, которые при легком встряхивании образуют равномерную муть.

За титр антител (*диагностический титр*) принимают последнее разведение сыворотки, в котором произошла агглютинация, с оценкой не менее чем на два плюса (++) .

В данном случае, при диагностике бруцеллеза крупного рогатого скота, с оценкой не менее чем на два плюса (++) в разведении 1:100 и выше.

Реакцию считают сомнительной при наличии агглютинации только в разведении 1:50 с сывороткой крупного рогатого скота с оценкой не менее чем на два плюса (++).

Капельный метод РА на предметном стекле в основном применяют для идентификации культур бактерий, а также для установления и принадлежности к определенным серогруппам.

Компоненты: чистая культура неизвестного вида на скошенном агаре, выделенная из исследуемого материала, диагностикум — флакон со специфической сывороткой биофабричного изготовления с этикеткой.

Методика: на предметное стекло наносят каплю специфической агглютинирующей сыворотки и каплю физиологического раствора (контроль). В каждую каплю вносят бактериологическую петлю с исследуемой бактериальной культурой, тщательно растирают и осторожно подогревают над пламенем спиртовки до 37°C. Если сыворотка и бактериальная культура друг другу специфичны, то через 2–3 мин происходит агглютинация бактериальных клеток, появляются видимые комочки, состоящие из склеенных бактерий. Капля с физиологическим раствором остается равномерно мутной.

Реакция связывания комплемента (РСК). РСК относится к серологическим реакциям, но в отличие от РП, где в результате положительной реакции образуется видимое серобелое кольцо, и в отличие от РА, где в результате положительной реакции образуется видимый осадок-зонтик в результате положительной РСК образуется комплекс «антиген + антитело», невидимый невооруженным глазом. Но главным отличием этой реакции является то, что образование комплекса и *лизис* клеток в этом комплексе происходит только в присутствии комплемента.

РСК — двухсистемная реакция. В первой системе, называемой *бактериолитической*, происходит образование комплекса «антиген + антитело», на котором связывается комплемент. Образовавшийся комплекс «антиген + антитело + комплемент» остается невидимым для глаз, т. е. невозможно определить были ли в исследуемой сыворотке антитела, а в исследуемом материале — бактерии. Для выявления этого вводится гемолитическая система, играющая роль индикаторной

системы. Суть ее состоит в том, что в этой системе образование комплекса «гемолизин + эритроцит» и лизис эритроцитов произойдет только в том случае, если на этом комплексе свяжется комплемент, оставшийся свободным в первой системе, отклонившийся во вторую систему и вызвавший лизис эритроцитов. Произшедший лизис эритроцитов свидетельствует о том, что комплемент остался свободным в первой системе — значит, в исследуемом материале не было антигенов (или антигена).

Сущность РСК заключается в том, что при взаимодействии антитела со специфическим антигеном происходит образование комплекса «антиген + антитело», на котором происходит связывание комплемента.

Задания для самостоятельной работы

1. Познакомиться с компонентами РП.
2. Поставить РП с положительно и отрицательно реагирующим кожевенным сырьем методом «наслаивания».
3. Провести постановку и учет результатов реакции кольцепреципитации методом «наслаивания».
4. Провести учет результатов демонстрационной реакции агглютинации с целью диагностики бруцеллеза, поставленной классическим (пробирочным) методом, с сывороткой крови крупного рогатого скота.
5. Поставить РА на предметном стекле для идентификации сальмонеллезной культуры при помощи поливалентной агглютинирующей сальмонеллезной сыворотки.

Тема 7

ВОЗБУДИТЕЛИ КОЛИБАКТЕРИОЗА, САЛЬМОНЕЛЛЕЗА, ТУБЕРКУЛЕЗА И СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

Цель занятия. Изучить биологические свойства возбудителя колибактериоза, сальмонеллеза, туберкулеза, бруцеллеза и сибирской язвы и методы бактериологической диагностики инфекционных болезней.

Материальное оснащение. Пробирки с посевами вакцинных штаммов возбудителей колибактериоза, сальмонеллеза, туберкулеза, бруцеллеза и сибирской язвы. Демонстрационные препараты-мазки на предметных стеклах: возбу-

тели колибактериоза, сальмонеллеза, сибирской язвы, окрашенные по Граму; возбудитель туберкулеза — по Цилю — Нильсену; возбудитель бруцеллеза — по Козловскому. Микроскопы, иммерсионное масло.

Возбудитель колибактериоза (эшерихиоза). *Колибактериоз* — остропротекающая инфекционная болезнь молодняка сельскохозяйственных животных. Возбудители болезни — патогенные серологические варианты *E. coli*. Болезнь протекает в септической, энтеротоксемической и энтеритной формах.

Морфология. Это мелкие полиморфные палочки с закругленными концами, длиной 1–3 мкм. Располагаются одиночно, по Граму красятся отрицательно, спор не образуют, подвижные. Некоторые образуют капсулу.

Культуральные свойства. Хорошо растет на обычных питательных средах. На МПА — образуют круглые серо-белые колонии. На МПБ — интенсивное помутнение и осадок на дне пробирки. На среде Эндо образуют красные колонии с металлическим блеском.

Биохимические свойства — возбудитель колибактериоза обладает высокой ферментативной активностью, расщепляет ряд углеводов до кислоты и газа (дифференциальным является расщепление лактозы), образует индол, не образует сероводород, МПЖ не разжижает.

Лабораторная диагностика. Для бактериологического исследования в лабораторию направляют труп целиком или паренхиматозные органы, головной мозг, отрезок тонкого отдела кишечника.

Схема бактериологической диагностики:

1. Из исследуемого материала готовят мазки, окрашивают по Граму.

2. Делают посев на МПБ, МПБ в пробирках и в чашки Петри с агаром Эндо. Выделяют чистую культуру возбудителя *E. coli* и определяют чувствительность к различным антибиотикам

3. Заражают белых мышей, культуру считают патогенной в случае гибели одной или более мышей.

Иммунитет и средства специфической профилактики. В неблагополучных по колибактериозу хозяйствах с целью

создания колострального (молозивного) иммунитета вакцинируют стельных коров за 1–1,5 мес. до отела.

Для телят используют колипротектант ВИЭВ (взвесь убитой нагреванием культуры кишечной палочки и консервированной формалином). Вводят перорально в дозе 15 мл за 30 мин до выпойки молозива и затем по 10 мл 5 раз с молозивом в течение 2 дней.

Для лечения колибактериоза применяют поливалентную иммунную сыворотку согласно наставлению и антибиотики с учетом чувствительности к ним эшерихий.

С целью профилактики применяют бактериофаг паратифа и кишечной палочки с питьем согласно наставлению.

Возбудитель сальмонеллеза. *Сальмонеллезы* — группа инфекционных болезней преимущественно молодняка сельскохозяйственных и промысловых животных, характеризующихся при остром течении лихорадкой и профузным поносом, при хроническом — воспалением легких. У взрослых животных болезнь может протекать бессимптомно (сальмонеллоносительство), а у беременных самок возможны аборт. У человека могут возникнуть пищевые токсикоинфекции при употреблении продуктов, содержащих токсины сальмонелл.

Морфология. Сальмонеллы — мелкие палочки с закругленными концами от 2 до 4 мкм длины, в мазках располагаются одиночно, подвижны (за исключением *S. pullorum-gallinarum*), спор и капсул не образуют, по Граму красятся отрицательно.

Культуральные свойства. Сальмонеллы — факультативные анаэробы и аэробы, оптимальная температура культивирования 37°C. Хорошо растут на обычных питательных средах. На МПА образуют круглые, с ровными краями, серо-белые колонии. На МПБ — интенсивное помутнение, на дне серо-белый осадок, на поверхности пристеночное кольцо. На агаре Эндо — неокрашенные колонии, на среде Плоскирева — бесцветные колонии.

Биохимические свойства у сальмонелл различных сероваров сильно варьируются. Сальмонеллы в отличие от кишечной палочки не ферментируют лактозу, на чем и основана их дифференциация на агаре Эндо, Плоскирева, на средах Гисса; не образуют индола, образуют сероводород.

Лабораторная диагностика. Для лабораторной диагностики в лабораторию направляют свежий труп целиком, от крупных животных — кусочки паренхиматозных органов, печень с желчным пузырем, лимфатические узлы, трубчатую кость, а в случае аборта — абортированный плод.

Схема бактериологической диагностики.

1. Из исследуемого материала готовят мазки, окрашивают по Граму.

2. Делают посев на МПА и МПБ в пробирках, на агар Эндо, агар Плоскирева в чашках Петри. Выделяют чистую культуру, определяют чувствительность к различным антибиотикам.

3. Заражают белых мышей для определения вирулентности.

Иммунитет и средства специфической профилактики.

В неблагополучных по сальмонеллезу хозяйствах стельных коров вакцинируют концентрированной формолвакциной двукратно с 8-дневным интервалом за 30–45 дней до отела, для создания колострального иммунитета, когда новорожденные с молозивом будут получать специфические антитела.

С профилактической целью против паратифа свиней применяют сухую живую вакцину из штамма ТС-177. Прививают всех клинически здоровых поросят с 2-недельного возраста.

Для специфической терапии применяют поливалентную антитоксическую сыворотку против паратифа и колибактериоза, а также коли-паратифозный бактериофаг.

Возбудитель туберкулеза. *Туберкулез* — инфекционная, хронически протекающая болезнь человека, животных, в том числе птиц, особенно кур. Для туберкулеза характерно образование в пораженных органах бугорков (туберкул) с творожистым перерождением.

Возбудителем является микроорганизм рода *Mycobacterium*, включающий в себя много видов, как патогенных, так и непатогенных. К возбудителям, имеющим значение в инфекционной патологии, относят возбудителя туберкулеза человека (*Myc. tuberculosis*), крупного рогатого скота (*Myc. bovis*), птиц (*Myc. avium*).

Морфология. Микобактерии туберкулеза — кислото-, спирто- и щелочеустойчивые микроорганизмы, грамположительные, спор и капсул не образуют, неподвижные. Под

микроскопом имеют вид стройных и слегка изогнутых палочек, длиной от 1,5 до 5,0 мкм.

Микобактерии характеризуются высоким содержанием липидов, миколовой кислоты, поэтому с трудом воспринимают анилиновые красители. Окрашивание их достигается при применении концентрированного основного фуксина (фуксина Циля) при подогревании. На этом основан метод окраски микобактерий по Цилю — Нильсену, когда возбудитель туберкулеза окрашивается в красный цвет (не обесцвечивается кислотой), остальные — в синий.

Культуральные свойства. Микобактерии туберкулеза — строгие аэробы, для них характерен медленный обмен веществ, что приводит к замедленному росту на питательных средах (от 7 до 30 дней). Оптимальной является температура 37–38°C для человеческого, 38–39°C для бычьего и 39–41°C для птичьего вида. Для первичного выделения культур применяют плотные яичные среды (Петраньяни, Гельберга), на которых они образуют бородавчатые, шершавые колонии R-формы, иногда S-формы в зависимости от вида. На поверхности жидких питательных сред чаще образуют сплошную морщинистую пленку, толщина которой также зависит от вида возбудителя.

Биохимические свойства возбудителя туберкулеза не очень выражены, обычно их изучают для идентификации и дифференциации от кислотоустойчивых сапрофитов.

Лабораторная диагностика. Для прижизненной диагностики в лабораторию посылают бронхиальную слизь, молоко, для посмертной диагностики — пораженные органы. Патологический материал можно консервировать в 30% -ном водном растворе глицерина или посылать в замороженном состоянии.

Схема бактериологической диагностики.

1. Из исследуемого материала готовят мазки и окрашивают по Цилю — Нильсену, при экспресс-диагностике применяют люминесцентную микроскопию.

2. Делают посев исследуемого материала. Для освобождения от посторонней, сопутствующей микрофлоры измельченный исследуемый материал, содержащий кислотоустойчивые микобактерии (молоко, слизь, пораженные органы), растирают в ступке с 6% -ным раствором серной кислоты в

соотношении 1:4. Затем фильтруют, центрифугируют, осадок отмывают от кислоты и нейтрализуют 15% -ным раствором двууглекислой соды, вносят в элективные питательные среды, содержащие малахитовую зелень, для получения чистой культуры.

3. Заражение лабораторных животных проводят для дифференциации отдельных видов микобактерий. Этот метод основан на разной чувствительности морских свинок и кроликов к различным видам микобактерий. Так, *M. bovis* патогенен для морских свинок и кроликов, *M. Tuberculosis* — патогенен лишь для морских свинок, *M. Avium* — патогенен для кроликов и птиц.

Аллергический метод диагностики. Используют для массовой диагностики туберкулеза с помощью аллергена-туберкулина, который внутривожно вводят крупному рогатому скоту в область средней трети шеи. У здоровых животных на месте введения не будет никакой реакции. У больных происходит утолщение кожной складки на 3 мм и более.

Иммунитет и средства специфической профилактики. Иммунитет при туберкулезе нестерильный, он длится до тех пор, пока в организме находятся живые микобактерии туберкулеза.

Живую вакцину БЦЖ против туберкулеза предложили в 1924 г. французские ученые Кальметт и Герен, которые много лет выращивали туберкулезные бактерии на питательной среде с бычьей желчью и 5% глицерина.

Для профилактики туберкулеза в неблагополучных хозяйствах применяют живую вакцину БЦЖ.

Возбудитель бруцеллеза. *Бруцеллез* — хроническая инфекционная болезнь животных и человека, относится к зооантропонозным болезням, т. е. человек заражается от больных животных или при применении продуктов животного происхождения, полученных от больных животных. У животных бруцеллез проявляется абортными, задержанием последа, рецидивирующей лихорадкой. В инфекционной патологии сельскохозяйственных животных имеют значение возбудитель бруцеллеза крупного рогатого скота (*Brucella abortus*), возбудитель бруцеллеза овец и коз (*B. melitensis*), возбудитель бруцеллеза свиней (*B. suis*).

Морфология. Бруцеллы — мелкие неподвижные бактерии, в препаратах располагаются одиночно, спор и капсул не образуют, грамотрицательные.

Культуральные свойства. Для выращивания бруцелл применяют специальные среды: печеночно-глюкозно-глицериновый бульон и агар (ПГТБ и ПГГА) с добавлением 1% глюкозы и 2–3% глицерина. По типу дыхания бруцеллы являются микроаэрофилами, поэтому при первичном выделении из патматериала требуется повышенное содержание углекислого газа, их выращивают в атмосфере 10–15% CO₂, растут медленно, от 15 до 30 дней.

Типичные штаммы бруцелл на поверхности агара образуют мелкие прозрачные колонии с гладкими краями, в бульоне — равномерное помутнение и пристеночное кольцо, на дне осадок.

Биохимические свойства бруцелл выражены слабо. Для дифференциации бруцелл друг от друга изучают способность выделять сероводород, потребность в повышенном количестве CO₂, способность расти в присутствии некоторых ингибиторов.

Лабораторная диагностика. Для прижизненной диагностики в лабораторию посылают абортированный плод с оболочками, содержимое абсцессов, молоко; для посмертной — лимфоузлы, кусочки паренхиматозных органов. На серологическое исследование направляют сыворотку крови и молоко.

Схема бактериологической диагностики.

1. Из исследуемого материала готовят мазки, окрашивают по Граму, по Козловскому. Окраска по Козловскому приобретает особое значение, если исследуемый материал загрязнен сопутствующей микрофлорой. Этот метод основан на том, что бруцеллы окрашиваются в цвет первой краски (сафранин) и остаются розовыми, так как за короткий срок окрашивания малахитовой зеленью запаздывают воспринять цвет второй краски. Все посторонние бактерии окрашиваются в зеленый цвет.

2. Делают посев исследуемого материала на ПГТБ, ПГГА с 1% глюкозы и 2–3% глицерина. Для первичного выделения *B. abortus* из исследуемого материала его выращивают в атмосфере, содержащей 10–15% CO₂. Для подавления роста

посторонней микрофлоры в питательные среды добавляют ингибиторы (анилиновые краски 1:200 000). Для окончательной идентификации бруцелл ставят РА с бруцеллезными моноспецифическими сыворотками.

3. Исследуемым материалом заражают морских свинок, если в исследуемом материале были бруцеллы, у морских свинок выявляют антитела в сыворотке крови, после этого их умерщвляют и выделяют чистую культуру из паренхиматозных органов.

Для *аллергической диагностики бруцеллеза* у овец, коз, свиней применяют бруцеллин ВИЭВ. У животных, больных бруцеллезом, на месте введения бруцеллина развивается воспалительная реакция.

Иммунитет и средства специфической профилактики. При бруцеллезе иммунитет формируется медленно и напряженность его относительная. При бруцеллезе иммунитет инфекционный, или нестерильный, который постепенно переходит в постинфекционный и сопровождается освобождением организма от возбудителя, в результате чего может наступить самовыздоровление.

Для специфической профилактики бруцеллеза применяются живые вакцины из штамма № 82 и № 19 против бруцеллеза крупного рогатого скота и живая вакцина из штамма Рев-1 против бруцеллеза мелкого рогатого скота.

Возбудитель сибирской язвы. *Сибирская язва* — острая инфекционная болезнь, к ней восприимчивы животные многих видов. Инфекционный процесс протекает преимущественно с явлениями септицемии или с образованием различной величины карбункулов.

Морфология. Возбудитель бруцеллеза — грамположительная, крупная 6–10 мкм палочка, неподвижная, образующая капсулу и спору. В окрашенных препаратах из крови больных или погибших от сибирской язвы животных бактерии располагаются в виде коротких цепочек, окруженных капсулой.

В препаратах, приготовленных из агаровой бактериальной культуры, бактерии располагаются в виде длинных цепочек, в старой культуре в центре палочки появляются споры бациллярного типа, расположенные в центре палочки.

Культуральные свойства. Микроб хорошо растет на МПА, МПБ, МПЖ, является аэробом, оптимальная температура 37°C. На МПА образует крупные серо-белые шероховатые колонии (R-формы). На МПБ — бульон остается прозрачный, на дне хлопьевидный осадок. По мере старения бактериальной культуры, по мере накопления продуктов метаболизма возбудитель переходит в состояние споры.

Биохимические свойства. Возбудитель расщепляет ряд углеводов только до кислоты, разжижает МПЖ. Не вызывает гемолиз на кровяном агаре, что является дифференцирующим признаком от сапрофитов.

Лабораторная диагностика. При подозрении на сибирскую язву категорически запрещается вскрывать трупы павших животных. Для лабораторного исследования на сибирскую язву чаще направляют ухо павшего животного с соблюдением всех правил асептики.

Схема бактериологической диагностики.

1. Из капли крови из уха готовят мазки, окрашивают по Ольту, Михину. Наличие коротких цепочек, окруженных капсулой, является важным диагностическим признаком.

2. Для выделения чистой культуры исследуемый материал вносят в МПБ, МПА и сутки выдерживают в термостате при 37°C. Культуры просматривают, определяют типичность, готовят препараты и микроскопируют. В препаратах должны быть крупные палочки, расположенные в виде длинных цепочек, грамположительные.

3. Белых мышей, морских свинок подкожно заражают суспензией из патматериала или чистой культуры. Павших животных вскрывают, делают мазки и посеvy для выделения чистой культуры. Определяют вид выделенной культуры, дифференцируют от сапрофитов.

Иммунитет и средства специфической профилактики. В результате естественного заражения и переболевания сибирской язвой у животных возникает длительный иммунитет.

С 1942 г. применяется живая бескапсульная вакцина СТИ, которая применялась для вакцинации животных против сибирской язвы. В настоящее время предложена новая вакцина против сибирской язвы из штамма № 55, создающая иммунитет длительностью до года.

Для лечения и пассивной профилактики применяют гипериммунную противосибиреязвенную сыворотку и гамма-глобулин. Пассивный иммунитет наступает через несколько часов и сохраняется до 14 дней.

Задания для самостоятельной работы

1. Изучить культуральные свойства возбудителей колибактериоза, сальмонеллеза, туберкулеза, бруцеллеза и сибирской язвы на питательных средах.
2. Изучить под микроскопом морфологические и тинкториальные свойства возбудителей колибактериоза, сальмонеллеза, туберкулеза, бруцеллеза и сибирской язвы.

Тема 8

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛОКА. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО МИКРОБНОГО ЧИСЛА. РЕДУКТАЗНАЯ ПРОБА. КОЛИ-ТИТР МОЛОКА. ИЗУЧЕНИЕ МИКРОФЛОРЫ КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Цель занятия. Ознакомиться с санитарно-бактериологическим исследованием молока: определением ОМЧ и показателей сорта молока. Ознакомиться с микрофлорой молочнокислых продуктов.

Материальное оснащение. Для определения общего микробного числа в 1 мл: пробы сырого и пастеризованного молока, пробирки со стерильным физраствором по 9 мл для метода серийных разведений, стерильные чашки Петри, стерильные пипетки по 1,2 мл, пробирки с МПА столбиком. Для изучения механической загрязненности молока — специальные фильтры для молока.

Для постановки редуктазной пробы: метиленовая синь в рабочем разведении в пробирках с пипетками, исследуемое молоко по 20 мл, редуктазник.

Для обнаружения ингибирующих веществ (антибиотиков) в молоке: исследуемое молоко, рабочий раствор резазурина в пробирках с пипетками, культура термофильного молочнокислого стрептококка в пробирках с пипетками, редуктазник.

Для изучения микрофлоры кисломолочных продуктов: катык, кефир, кумыс, ацидофилин, сметана. Спиртовки,

метиленовая синь для простого метода окрашивания, микроскопы, иммерсионное масло, бактериологические петли.

Бактериологическое исследование молока. Сорт молока зависит от количества микроорганизмов (МАФАНМ) в 1 мл. По Санитарным правилам и нормам (СанПин) 2.3.2.1078-01 г установлены следующие нормативы для сырого молока:

1) молоко сырое, высший сорт — не более 300 000 бактерий в 1 мл;

2) молоко сырое, первый сорт — не более 500 000 бактерий в 1 мл;

3) молоко сырое, второй сорт — не более 4 000 000 в 1 мл.

Количество бактерий в 1 мл сырого молока определяют по следующей методике: 1 мл сырого молока вносят в пробирку с 9 мл стерильной воды — получается первое разведение $1:10$ (10^{-1}), из которого 1 мл переносят во вторую пробирку с 9 мл стерильной воды — получается разведение $1:100$ (10^{-2}) и так далее до разведения $1:10^6$, т. е. до миллиона. Из двух последних разведений (10^{-5} и 10^{-6}) по 1 мл вносят в две чашки Петри (в двух повторах), каждую заливают 15 мл расплавленного и охлажденного до 45°C МПА, перемешивают путем легкого вращательного покачивания и после застывания агара их помещают в термостат при температуре 37°C на 24–48 ч. После этого подсчитывают количество выросших колоний в каждой чашке, определяют среднеарифметическое число (по двум повторам). Число колоний, выросших в каждой чашке, пересчитывают на 1 мл молока с учетом степени разведения и определяют количество бактерий в 1 мл исследуемого молока, то есть *сорт молока бактериологическим методом можно определить лишь через сутки после приема молока на молочном заводе. Но никакое производство не может себе этого позволить. Поэтому на производстве сорт молока определяют быстро, косвенным путем.* Для этого при приеме молока учитывают комплекс признаков: кислотность молока в $^{\circ}\text{T}$, редуцтазную пробу, степень чистоты по эталону и количество соматических клеток (табл. 8).

На все показатели, по которым производится контроль качества принимаемого молока, следует обращать самое серьезное внимание, так как оценка молока при сдаче осуществляется по худшему из них. Так, если по редуцтазной про-

Таблица 8

Показатели сорта молока

Показатели	Норма для сорта			
	высший	первый	второй	несортовой
Кислотность молока в °Т	16–18	16–18	16–20	Не более 21
Степень чистоты по эталону	1	1	2	3
Бактериальная обсемененность по редуцтазной пробе	1	1	2	3
Соматических клеток	До 500 тыс.	Свыше 500 тыс.	До 1 млн	—
Температура молока	Должна быть ниже 10°С			

бе молоко относится к первому классу, по степени чистоты — к первой группе, а кислотность повышена, например, до 20°Т, то молоко будет отнесено ко второму сорту.

Кислотность молока служит одним из основных показателей санитарного качества молока, по которому при приеме осуществляется сортировка молока. Кислотность молока прямо связана с бактериальной обсемененностью. Свежее молоко имеет нейтральную реакцию и почти не содержит в своем составе молочной кислоты.

Кислотность молока обозначают в условных градусах Тернера (°Т). Под условными градусами понимают количество миллилитров 0,1 М раствора натрия (калия) едкого, необходимых для нейтрализации 100 мл молока, разбавленного вдвое дистиллированной водой при индикаторе фенолфталеине.

Показатель титруемой кислотности позволяет установить повышение кислотности в результате размножения молочнокислых бактерий, сбразивающих лактозу до молочной кислоты. Чем *дольше хранится молоко в неохлажденном состоянии, при температуре выше +10°С, тем больше в нем накапливается молочной кислоты, тем выше его кислотность.* Нормальная кислотность свежего молока колеблется от 16 до 18°Т. При кислотности выше 21°Т начинается первая степень порчи молока — *прокисание*. Такое молоко не

выдерживает тепловой обработки и не может быть сырьем для выработки стандартных молочных продуктов.

Определение степени чистоты. Показателем санитарных условий получения молока является степень чистоты молока, которая характеризуется наличием посторонних механических примесей.

Методика: через специальный плотный фильтр пропускают 250 мл молока и сравнивают полученный осадок на фильтре с эталоном. Молоко по степени загрязненности делят на следующие группы:

- 1 — на фильтре нет частиц механической примеси;
- 2 — на фильтре отдельные частицы механической примеси;
- 3 — на фильтре заметный осадок (волоски, частицы сена, песка).

Проба на редуктазу. Проба на редуктазу является косвенным методом определения общей микробной обсемененности молока, основанным на изменении биохимических показателей.

Преимущество этого метода — простота и быстрота проведения анализа по сравнению с бактериологическим исследованием.

Суть этого метода заключается в том, что микроорганизмы, попавшие в молоко, в процессе жизнедеятельности выделяют в окружающую среду наряду с другими окислительно-восстановительными ферментами анаэробные дегидразы, которые по старой классификации называются редуктазами. Существует зависимость между общим количеством бактерий в молоке и содержанием в нем редуктазы, что позволяет использовать редуктазную пробу как косвенный показатель бактериальной обсемененности сырого молока. *Фермент редуктаза обладает способностью восстанавливать метиленовую синь, которая при этом обесцвечивается.* Следовательно, чем больше редуктазы, тем больше бактерий в исследуемом молоке.

Методика: в пробирки наливают 20 мл исследуемого молока и 1 мл рабочего раствора метиленовой сини, закрывают резиновой пробкой, смешивают путем трехкратного переворачивания пробирки (молоко при этом окрашивается

Таблица 9

Классификация молока по редуктазе

Клас-сы	Оценка качества молока	Продолжитель-ность обесцвечи-вания	Кол-во бактерий в 1 мл молока
1-й	Хорошее	свыше 5 ч 30 мин	менее 500 тыс.
2-й	Удовлетворитель-ное	свыше 2 ч до 5 ч 30 мин	от 500 тыс. до 4 млн
3-й	Плохое	свыше 20 мин до 2 ч	от 4 до 20 млн
4-й	Очень плохое	20 мин и менее	20 млн и выше

в синий цвет). Пробирки помещают в водяную баню при 38–40°C.

Наблюдение за изменением окраски ведут через 20 мин, через 2, через 5 ч 30 мин после начала анализа. В чистом свежем молоке фермента редуктазы содержится очень мало, поэтому оно обесцвечивается долго.

В зависимости от времени обесцвечивания метиленовой сини молоко относится к одному из четырех классов в соответствии с таблицей 9.

Определение ингибирующих веществ в молоке. Молочные предприятия не принимают молоко с консервирующими веществами, содержащими антибиотики и другие ингибирующие вещества. Эти вещества задерживают или подавляют (ингибируют) развитие молочнокислых микроорганизмов, применяемых для выработки кисломолочных продуктов.

Для определения в молоке формалина, перекиси водорода, антибиотиков предложена резазуриновая проба. Сущность метода заключается в том, что микроорганизмы *Str. thermophilus*, чувствительные к ингибирующим веществам, размножаясь, выделяют вещества, восстанавливающие резазурин.

Методика обнаружения антибиотика в молоке. К 10 мл молока добавляют 1 мл рабочего раствора резазурина и 3–4 капли термофильного стрептококка (*Str. thermophilus*), чувствительного к антибиотикам. Содержимое пробирок перемешивают, молоко окрашивается в фиолетовый цвет. Пробирки ставят в редуктазник (водяную баню) при 40°C и через 45 мин учитывают изменение цвета молока.

Заключение о качестве молока делают по следующим изменениям.

1. Синие-стальной или фиолетовый цвет исследуемого молока в пробирке указывает на наличие антибиотиков (ингибирующих веществ) в молоке. Наблюдается ингибирование размножения молочнокислого стрептококка, поэтому молочная кислота не выделяется и цвет индикатора не изменяется.

2. Белый или розовый цвет молока указывает на то, что в молоке нет антибиотиков, так как молочнокислый стрептококк беспрепятственно размножается, образует молочную кислоту, которая обесцвечивает резазурин.

Определение эффективности пастеризации. В торговую сеть молоко поступает в пастеризованном виде. Цель пастеризации — уничтожить гнилостные и молочнокислые бактерии, чтобы продлить срок хранения молока. Режимы пастеризации, принятые в молочной промышленности, обеспечивают полное уничтожение возбудителей туберкулеза, бруцеллеза, условно патогенных микроорганизмов и кишечной палочки. На производстве применяется несколько режимов пастеризации молока:

- 1) кратковременная — 74–76°C в течение 15–20 с;
- 2) моментальная — 85–90°C без выдержки.

После пастеризации всю партию молоко необходимо охладить до +4°C, что препятствует прорастанию спор и развитию оставшейся термофильной микрофлоры.

Микробиологический контроль эффективности пастеризации молока проводят в соответствии с действующей инструкцией, при этом определяют:

- 1) количество микробов в 1 мл (МАФАНМ) молока;
- 2) коли-титр и бродильный титр.

Для определения эффективности пастеризации проводят два анализа: посев сырого молока и посев молока из этой партии после пастеризации. Схема этого исследования представлена на рисунке 9.

Количество МАФАНМ определяют в 1 мл исследуемого сырого молока и в 1 мл молока после пастеризации, результаты сравнивают и определяют эффективность пастеризации при данном режиме. Эффективность пастеризации считает-

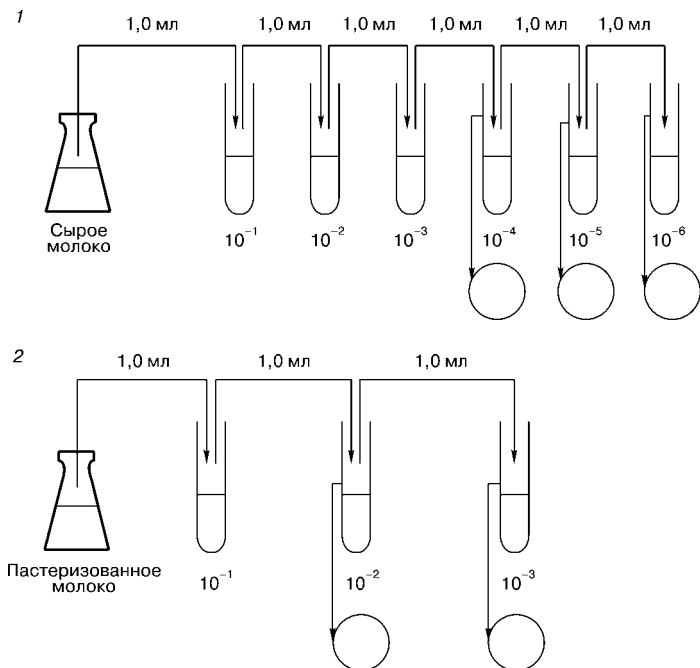


Рис. 9

Схема приготовления разведений и посевов:

1 — сырого, 2 — пастеризованного молока.

ся достигнутой, если объем остаточной микрофлоры не превышает 0,01% от первоначальной.

Вначале готовят шесть пробирок с 9 мл стерильной воды, в первую вносят 1 мл исследуемого сырого молока, получившееся разведение 10^{-1} тщательно перемешивают стерильной пипеткой и переносят 1 мл во вторую пробирку с 9 мл воды, получается разведение молока 10^{-2} , и так далее готовят ряд последовательных разведений до 10^{-6} . Из двух последних разведений — 10^{-5} и 10^{-6} — вносят по 1 мл в чашки Петри (в двух повторях) и заливают 12 мл расплавленного и охлажденного до 50°C мясо-пептонного агара, содержимое чашек перемешивают путем легкого вращательного покачивания и после застывания среды чашки помещают в термостат вверх дном при 30°C на 48 ч.

По такой же методике проводят бактериологический посев пастеризованного молока, только разведения доводят до 10^{-1} , 10^{-2} и 10^{-3} . Из двух последних разведений делают посев по 1 мл в чашки Петри в двух повторах, заливают расплавленным агаром, термостатируют 48 ч при 30°C.

После этого подсчитывают количество выросших колоний в каждой чашке, определяют среднеарифметический показатель из двух повторов. Для подсчета берут только те чашки, количество колоний в которых не менее 30 и не более 300.

Общее количество МАФАНМ в 1 мл молока определяют умножением количества выросших колоний после посева на степень разведения. Для определения эффективности пастеризации сравнивают результаты анализа сырого молока с результатами пастеризованного молока, определяют объем остаточной микрофлоры, который не должен превышать 0,01% от первоначальной.

В соответствии с действующим стандартом пастеризованное молоко должно отвечать требованиям СанПиН 2.3.2.1078-01 (Санитарные правила и нормы). Нормативы представлены в таблице 10.

Таблица 10

Нормативы на допустимое количество бактерий в молоке

Продукт	Количество МАФАНМ, выраженное в КОЕ/г, не более	Масса продукта, в которой не допускаются патогенные бактерии (в г)		Примечание
		БГКП	Листерии сальмонелл	
Молоко, пастеризованное в потребительской таре	100 000	0,01	25	<i>S. aureus</i> в 1 г не допускаются
Молоко, пастеризованное во флягах	200 000	0,01	25	то же
Сливки, пастеризованные в потребительской таре	100 000	0,01	25	то же
Сливки, пастеризованные во флягах	200 000	0,01	25	то же

В кисломолочных продуктах количество МАФAnM не определяют из-за наличия специфической флоры, используемой для их изготовления, но обязательно контролируют состав молочнокислых бактерий под микроскопом, соотношение молочнокислых стрептококков и палочек.

Определение коли-титра. При определении санитарно-показательных микроорганизмов в молоке учитывают наличие и количество бактерий группы кишечной палочки (БГКП).

БГКП являются постоянными обитателями кишечного тракта человека и животных, находятся на коже животного, в кормах, почве и подстилке, поэтому получить молоко без кишечной палочки довольно сложно. При попадании в молоко эти бактерии вызывают различные пороки, изменяя вкус, запах и консистенцию молока.

Для характеристики санитарно-гигиенических условий производства и реализации молока устанавливают степень обсеменения продукта бактериями группы кишечной палочки, то есть определяют коли-титр.

Титр — это наименьшее количество продукта, выраженное в мл (г), в котором обнаружены БГКП. Титр кишечной палочки в молоке и молочных продуктах определяют в три этапа. При этом учитывают цитратотрицательные разновидности кишечных палочек, которые не растут на среде Симмонса.

Первый этап заключается в посеве продукта* в среду Кесслера**.

Схема определения коли-титра молока представлена на рисунке 10.

Для определения коли-титра проводят посев молока в объеме 3,3 мл в шесть пробирок. Для этого в три пробирки со

* Если проверяют кисломолочный продукт, то его исследуют по этой же схеме, но перед посевом нейтрализуют. Для этого к 10 мл исследуемого кисломолочного продукта добавляют 1 мл 10%-ного раствора питьевой соды.

** В состав этой среды входят: 5% желчи, 1% пептона, 0,25% глюкозы, а в качестве ингибитора добавляют краску генцианвиолет, подавляющую размножение грамположительной микрофлоры. Среду Кесслера разливают в пробирки по 5 мл с поплавками, готовая среда окрашена в фиолетовый цвет. При посеве продукта с наличием кишечной палочки в среду Кесслера — она мутнеет, а в поплавках появляется пузырек газа.

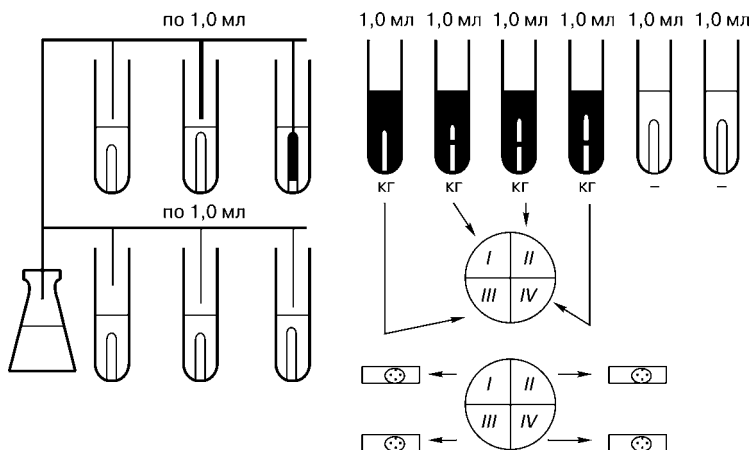


Рис. 10

Схема определения бродильного титра и коли-титра молока:

КГ — образование кислоты и газа; — — без изменений; I этап: посев на среду Кесслера, культивирование при 43°C 24 ч; II этап: результаты посева, высев на среду Эндо по секторам, культивирование при 37°C 24 ч; III этап: приготовление препаратов, окраска по Граму, посев на среды Козера и ГПС.

средой Кесслера вносят по 1 мл молока, а в три оставшиеся — по 0,1 мл молока.

Посевы ставят в термостат при температуре 43°C на 24 ч (при такой температуре растет кишечная палочка только тепловых).

Второй этап. Пробирки с посевами просматривают, отмечают изменения — появление помутнения среды и газа в поплавках. По сумме признаков устанавливают коли-титр исследуемого молока.

Из каждой забродившей пробирки со средой Кесслера делают пересев на среду Эндо с таким расчетом, чтобы получить изолированные колонии, для чего петлей берут минимальное количество посевного материала и проводят посев частым штрихом, чтобы выросли изолированные колонии. Перед посевом дно чашки с агаром Эндо делят на четыре сектора. Из каждой забродившей пробирки со средой Кесслера проводят пересев в отдельный сектор. Чашки с посевами помещают в термостат при температуре 37°C на 24 ч.

Третий этап. Чашки с посевами на агар Эндо просматривают:

1) при отсутствии на среде Эндо колоний, типичных для БГКП (красных с металлическим блеском, розовых) — в продукте *E. coli* отсутствует;

2) при наличии на среде Эндо колоний, типичных для БГКП, а также бесцветных — их изучают. Готовят препарат из изолированных колоний.

Схема определения коли-титра молока. Условные обозначения: КГ — образование кислоты и газа; — — нет роста, окрашивают по Граму и микроскопируют. Если в препарате будут обнаружены мелкие, с закругленными концами грамотрицательные палочки, проводят дальнейшие исследования, цель которых — установление фекальной принадлежности кишечных палочек. Для этого проверенные с каждого сектора колонии отсевают на цитратную среду Симмонса и глюкозопептонную среду (ГПС).

Посевы в среде Симмонса помещают в термостат при 37°C, а ГПС — при 43°C на 24 ч, при этой температуре не размножается кишечная микрофлора водных хладнокровных. Среда Симмонса содержит цитрат натрия и индикатор бромтимолблау, придающий готовой среде травянисто-зеленый цвет. Эшерихии фекального происхождения на этой среде не растут, так как являются цитратотрицательными.

Учет результатов посева колоний с агара Эндо на среду Симмонса:

- изменение зеленого цвета среды на васильковый — свидетельствует о том, что обнаруженные БГКП относятся к цитратположительным разновидностям, которые не учитываются;
- отсутствие роста на цитратной среде Симмонса указывает на присутствие в исследуемом продукте цитратотрицательных разновидностей БГКП, которые учитываются.

Учет результатов посева колоний с агара Эндо на глюкозопептонную среду:

- если в ГПС при 43°C нет брожения, то считают, что в продукте БГКП отсутствуют;
- если в ГПС произошло брожение и одновременно отсутствует рост на среде Симмонса, то считают, что в продукте

обнаружена кишечная палочка фекального происхождения.

После учета результатов на ГПС и среде Симмонса вычисляют коли-титр исследуемого молока и молочных продуктов по таблице 11:

- если ни в одном из засеянных объемов продукта не обнаружено кишечной палочки, то считают коли-титр более 3,0 мл;
- если в одном из засеянных объемов по 1 мл продукта обнаружена кишечная палочка, считают, что коли-титр равен 3,0 мл;
- если кишечная палочка обнаружена в пяти посевах или во всех объемах продукта, то считают коли-титр менее 0,3 мл;
- во всех остальных случаях считают коли-титр равным 0,3 мл.

Результаты бактериологического исследования качества готовой продукции из-за длительности анализов не могут быть использованы для задержки выпуска молочной продукции, но по ним судят о санитарно-гигиеническом благополучии предприятия.

Изучение микрофлоры кисломолочных продуктов. Общим признаком всех кисломолочных продуктов является молочнокислое брожение, вызванное молочнокислыми бактериями. Микроорганизмы выделяют фермент лактазу, расщепляющую дисахарид лактозу на 2 молекулы моносахаридов: глюкозу и галактозу.

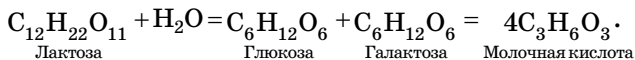


Таблица 11

Коли-титр молока и молочных продуктов

Варианты	Кишечная палочка обнаружена в следующих объемах, в мл						Установленные коли-титры, в мл
	1	1	1	0,1	0,1	0,1	
А	—	—	—	—	—	—	> 3,0
Б	+	—	—	—	—	—	= 3,0
В	+	+	+	+	+	—	< 0,3
	+	+	—	+	+	+	
	+	+	+	+	+	+	

Таким образом, из одной молекулы сахара лактозы образуются четыре молекулы молочной кислоты. Молоко скисает, а содержащийся в нем казеин свертывается и образует сгусток.

В некоторых кисломолочных продуктах наряду с молочнокислым брожением протекает и спиртовое брожение. В связи с этим различают следующие виды продуктов:

1) продукты молочнокислого брожения: сметана, простокваша, ацидофильное молоко;

2) продукты смешанного (молчнокислого и спиртового) брожения: кумыс, кефир, катык и др.

Технология производства кисломолочных продуктов:

1) молоко нормализуют по проценту жира (от 1,0% до 4,0%);

2) молоко пастеризуют;

3) молоко охлаждают до температуры заквашивания. В зависимости от микрофлоры, входящей в состав закваски, применяют различную температуру при заквашивании:

а) для мезофильных микроорганизмов — 30–35°C,

б) для термофильных микроорганизмов — 40–42°C,

4) в молоко вносят закваску и выдерживают при заданной температуре до появления сгустка. В зависимости от технологического процесса заквашивание может происходить **термостатным** или **резервуарным** методом в течение 6–8 ч. Качество сгустка при этом получается разное: при термостатном — молочный сгусток в потребительской таре сохраняет плотность, а при резервуарном заквашивании — образовавшийся сгусток перед розливом разрушают размешиванием, а потом продукт разливают в потребительскую тару;

5) готовый молочнокислый продукт передают на склад, где происходит созревание и хранение при +4–6°C до отправки потребителям.

Для получения кисломолочного продукта желательной консистенции с выраженным вкусом и ароматом необходима хорошая закваска. На молочных заводах применяют закваски, состоящие из чистой культуры молочнокислых бактерий, полученных из ВНИИМП (Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности). Каждая культура должна иметь паспорт, в котором указаны

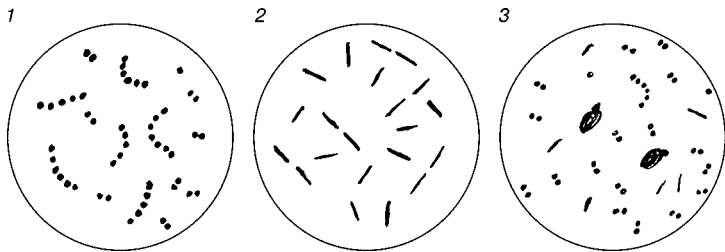


Рис.11

Микрокартина в препаратах из кисломолочных продуктов:

1 — сметана; 2 — ацидофилин; 3 — кефир.

их морфологические и тинкториальные свойства, температурный оптимум, способность ферментировать ароматические соединения, образовывать молочную кислоту до 110 или 300°Т. Чаще применяются следующие виды молочнокислых бактерий:

1) молочнокислый стрептококк — *Streptococcus lactis*, *Str. thermophilus*, *Str. cremoris*, *Str. diacetylactis*;

2) молочнокислые палочки — *Lactobacterium bulgaricum*, *L. acidophilus*.

Для каждого кисломолочного продукта применяется специфическая закваска (рис. 11). Отличие между ними заключается в том, что в каждой закваске находится один или несколько видов микроорганизмов, которые, размножаясь в продукте, придают нужные, только ему характерные свойства. Чистоту закваски, а также соотношение между ее компонентами проверяют ежедневно путем приготовления препаратов, окрашивания и микроскопией.

Препараты молочнокислого брожения. *Ацидофильное молоко* относится к продуктам молочнокислого брожения, для приготовления которого применяется ацидофильная палочка. Ацидофильная палочка в отличие от других молочнокислых бактерий хорошо приживается в желудочно-кишечном тракте. Это объясняется тем, что ацидофильные бактерии относятся к постоянным обитателям желудочно-кишечного тракта молодняка, детей, находящихся на молочном вскармливании. При переходе на смешанное кормление ацидофильная палочка заменяется другими микроорганизмами.

Ацидофильная палочка образует больше молочной кислоты, антибиотических веществ, чем другие молочнокислые бактерии, которые губительно действуют на гнилостные, болезнетворные виды бактерий. Поэтому рекомендуют использовать ацидофильные препараты для профилактики и лечения болезней желудочно-кишечного тракта, при дисбактериозе, а также для ускорения восстановления полезной микрофлоры кишечника после приема антибиотиков.

Ацидофильное молоко. Для приготовления этого продукта в пастеризованное и охлажденное до 42°C молоко вносят 3% закваски, содержащей чистую культуру *L. acidophilum*, перемешивают и ставят в термостат при 42°C, сгусток образуется через 6–8 ч — он должен иметь однородную тягучую консистенцию. Для контроля чистоты закваски из готового продукта бактериологической петлей берут каплю и наносят на предметное стекло, готовят мазок, окрашивают метиленовой синью. При микроскопии препаратов из ацидофильного молока в поле зрения должны быть крупные палочки, расположенные одиночно или в виде коротких цепочек.

Сметана. В пастеризованные и охлажденные до 30°C сливки вносят 0,5–3% закваски, состоящей из чистой культуры *Str. lactis* или *Str. cremoris*. Заквашивание происходит через 8–10 ч. При микроскопии препаратов, приготовленных из сметаны, в поле зрения должны быть молочнокислые стрептококки, расположенные парно или в виде коротких цепочек.

Простокваша. В домашних условиях для приготовления простокваши сырое молоко ставят в теплое место, в котором последовательно проходят все фазы до молочнокислой, в процессе которой происходит образование сгустка. Готовую простоквашу ставят в холодное место. При микроскопии препаратов, приготовленных из простокваши, преобладают молочнокислые стрептококки. Простокваша заводского приготовления должна содержать чистую культуру *Str. lactis*, к которой в определенном соотношении добавляют болгарскую палочку.

Кефир — кисломолочный продукт смешанного брожения, для приготовления которого используются кефирные

грибки. Кефирные грибки имеют определенную структуру и ведут себя биологически как живой саморегулирующийся организм: они растут, делятся и обладают наследственностью. В зависимости от температуры созревания может активизироваться кислomолочное брожение или спиртовое. Кефирный грибок требует особых условий хранения, защиты от загрязнения сопутствующей вульгарной микрофлорой.

При гистологическом исследовании срезов кефирных грибков видны переплетения нитей, которые образуют стро-му грибка, удерживающую остальную группу микроорганизмов, состоящую из:

- 1) мезофильные молочнокислые стрептококки (*Str. lactis*);
- 2) мезофильные молочнокислые палочки (*Beta- u Strepto- bacterium*);
- 3) термофильные молочнокислые палочки (*L. casei*);
- 4) молочные дрожжи прочно связаны со стромой гриба.

Между молочнокислыми микроорганизмами и дрожжами существуют симбиотические взаимоотношения. Молочнокислые бактерии, гидролизуя лактозу, снабжают молочные дрожжи кислотой, необходимой им для жизнедеятельности, а дрожжи, вызывая спиртовое брожение, насыщают продукт углекислотой, что придает кефиру особый вкус.

Методика приготовления грибковой кефирной закваски: в пастеризованное и охлажденное до 20°C молоко вносят 5% от общей массы кефирных зерен, заквашивание происходит в течение 10–12 ч. Затем грибковую закваску процеживают через сито и используют как производственную закваску для приготовления потребительского кефира, у которого определяют вкус, запах и качество сгустка. Окончание сквашивания определяют по кислотности, которая должна быть около 80°Т. В зависимости от продолжительности выдержки различают однодневный, содержащий 0,2% этилового спирта; трехдневный — до 0,6% этилового спирта.

Качество закваски регулярно проверяют, определяют активность (время сквашивания, кислотность), наличие посторонней микрофлоры путем просмотра микроскопического препарата в 10 полях зрения. В препарате из однодневного кефира преобладают диплококки и стрептококки, одиноч-

ные палочки, а в трехдневном кефире появляется ощутимое количество молочных дрожжей.

Кумыс — кисломолочный напиток готовят из кобыльего молока, которое сильно отличается от коровьего по химическому составу (жира 1,5–2,0%, сахара — 6% и высокое содержание альбумина, а у коров большое количество казеина).

В молоке кобылиц преобладает альбумин, который при воздействии молочной кислоты образует рыхлый осадок, неплотный сгусток с мелкими хлопьями, поэтому сквашенное кобылье молоко остается однородным без осадка.

Кумыс, как и кефир, является продуктом смешанного брожения. Благодаря большому содержанию молочного сахара деятельность дрожжей активизируется и количество спирта доходит до 2,5%.

При получении кобыльего молока необходимо строго соблюдать все санитарно-гигиенические требования, так как его нельзя пастеризовать. При пастеризации оно свертывается, поэтому закваску вносят в парное молоко.

Методика приготовления кумыса. В парное кобылье молоко вносят закваску, состоящую из болгарских молочнокислых палочек и дрожжей рода *Torula* — оптимальная температура заквашивания 26°C (при высокой температуре происходит молочнокислое брожение, при низкой — спиртовое), сквашивание происходит за 6–8 ч. Во время микроскопии препаратов из кумыса обнаруживают молочные дрожжи и палочки.

При получении кумыса в домашних условиях в качестве закваски применяют кумыс прежней выработки.

Задания для самостоятельной работы

1. Провести постановку редуктазной пробы с молоком различной бактериальной загрязненности. Оценить качество различных проб молока.
2. Провести определение наличия ингибиторов в различных пробах молока.
3. Провести бактериологическое исследование сырого и пастеризованного молока.
4. Изучить микрофлору кисломолочных продуктов, микрокартину зарисовать.

Тема 9

**БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ МЯСА**

Цель занятия. Ознакомиться с микроскопическими и бактериологическими методами исследования мяса.

Материальное оснащение. Образцы свежего и испорченного мяса. Пинцеты, ножницы, скальпель, фарфоровые ступки. Набор питательных сред: МПА, МПБ, агар Эндо, элективные среды. Спиртовки, бактериологические петли, предметные стекла, набор красок по Граму, чашки сливные с мостиком. Микроскоп, иммерсионное масло.

Бактериологическое исследование мяса проводят во всех случаях, предусмотренных правилами ветеринарно-санитарной экспертизы, а именно:

- во всех случаях вынужденного забоя животных, независимо от причин забоя;
- при тяжело протекающих заболеваниях желудочно-кишечного тракта и органов дыхания;
- во всех случаях, когда предполагают обсеменение возбудителями зооантропонозов или пищевых токсикоинфекций и токсикозов;
- при удалении кишечника из туши позднее двух часов после убоя животного.

В зависимости от предполагаемого диагноза и характера патологоанатомических изменений в бактериологический отдел от каждой туши направляют пробы мышц, лимфатических узлов и паренхиматозных органов. Каждую пробу завертывают отдельно, помещают в общую упаковку, тару с образцами опечатывают, оформляют сопроводительный документ.

На бактериологическое исследование должно быть направлено мясо, если невозможно определить пригодность его в пищу по результатам органолептического исследования, а также по ряду физико-химических показателей.

На поверхности мясных туш находятся стафилококки и микрококки, молочнокислые бактерии, БГКП, различные виды гнилостных аэробных и анаэробных клостридий, дрожжи и споры плесневых грибов.

Органолептическая оценка мяса. Доброкачественное мясо при подсыхании образует корочку бледно-красного цвета. На

разреze оно плотное, эластичное, ямка после надавливания быстро исчезает. *Несвежее мясо* покрыто плотной, темно-красной или ослизненной корочкой. Консистенция его мягкая, несколько дряблая, образующаяся при надавливании ямка медленно восстанавливается. Поверхность *испорченного мяса* ослизненная, консистенция дряблая, мажущаяся; жир слизистый, с прогорклым запахом — такое мясо бракуют.

Микроскопическое исследование мяса. Из исследуемого мяса на предметном стекле делают 2 мазка-отпечатка: один из поверхностного слоя, другой — из глубинных слоев.

Для приготовления препарата-отпечатка из поверхностных слоев мяса профламбированными ножницами вырезают кусочек весом 1,0–1,5 г и делают препарат-отпечаток свежесрезанной стороной на предметном стекле.

Для приготовления препарата-отпечатка из глубинных слоев поверхность мяса прижигают скальпелем и делают разрез вглубь. Из глубины вырезают небольшой кусочек мяса, которым делают препарат-отпечаток на предметном стекле. Препараты высушивают на воздухе, фиксируют в пламени горелки и окрашивают по Граму. Исследуют 10 полей зрения и подсчитывают отдельно кокковые и палочковидные бактерии (табл. 12).

Препарат-отпечаток из свежего мяса окрашивается плохо, при микроскопии видны единичные кокки и палочки, в препаратах из глубинных слоев бактерии должны отсутствовать.

Препарат-отпечаток из мяса подозрительной свежести окрашивается удовлетворительно. При микроскопии препа-

Таблица 12

Оценка свежести мяса микроскопическим методом

Степень свежести мяса	pH мяса	Микроскопические показатели. Среднее количество в одном поле зрения
Свежее	5,8–6,2	Единичные кокки или палочки; на стекле остатков ткани нет
Подозрительной свежести	6,3–6,5	До 30 бактерий, с преобладанием кокков, единичные палочки. На стекле следы распада мышечной ткани
Несвежее	6,7 и выше	Более 30 бактерий в одном поле зрения, с преобладанием палочек, на стекле распавшаяся мышечная ткань

рата из поверхностного слоя в поле зрения обнаруживают не более 20–30 кокков, единичные палочки, в препаратах из глубинных слоев — до 20 кокков и палочек. На стекле ясно заметны распавшиеся ткани мяса.

Препарат-отпечаток из мяса, непригодного в пищу, окрашивается хорошо. В поле зрения из поверхностных и глубинных слоев большое количество палочек. При сильном разложении мяса кокки почти отсутствуют и в одном поле зрения можно насчитать несколько сотен палочек. На стекле обнаруживается большое количество распавшейся ткани мяса.

Бактериологическое исследование мяса проводят для обнаружения микроорганизмов, вызывающих мясные отравления, к числу которых относятся *E. coli*, *Salmonella*, *Staph. aureus*, *P. vulgaris*, *Cl. botulinum*.

Для определения наличия в исследуемом мясе бактерий кишечного семейства делают посев кусочком исследуемого мяса на поверхности агара Эндо. После культивирования в термостате при 37°C в течение 20–24 ч изучают появившиеся колонии. При обсеменении исследуемого мяса кишечной палочкой вырастают колонии, окрашенные в красный цвет с металлическим оттенком, если сальмонеллами — появляются неокрашенные колонии.

Для определения в мясе палочки протей, наличие которой является показателем антисанитарных условий хранения мяса, применяют метод Щукевича. Для этого бактериологической петлей берут соскоб с поверхности исследуемого мяса и делают посев в конденсат свежескошенного агара в пробирке, не прикасаясь к поверхности косяка. При наличии в мясе палочки протей, после культивирования в термостате на поверхности агара появляются кружевные, ползущие вверх колонии, издающий гнилостный запах.

Для определения наличия в исследуемом мясе стафилококка, продуцирующего энтеротоксин токсин, делают посев мяса на поверхность солевого агара в чашках Петри. После культивирования в термостате на агаре появляются типичные колонии S-формы, имеющие желтый пигмент.

Мясо и мясopодукты после проведения бактериологического анализа оценивают в соответствии с санитарными правилами и нормами (СанПиН), по которым в 25 г мяса не

Таблица 13

Микробиологические показатели мяса и мясопродуктов

Наименование продуктов	МА-ФАИМ, КОЕ/г, не более	Масса продукта в г, в которой не допускаются		
		БГКП	СРК	Патогенные МО, в том числе сальмонеллы
Мясо свежее (все виды убойных животных)				
Парное в отрубях (полтуши, четвертины)	10	1,0	—	25
Охлажденное и переохлажденное в отрубях	1000	0,1	—	25

допускается присутствие патогенных бактерий, в том числе сальмонелл (табл. 13).

Обеззараживание условно годного мяса. Обеззараживанию подлежат мясо и мясопродукты, которые не могут быть выпущены без предварительной обработки. Мясо и мясопродукты, подлежащие обеззараживанию провариванием, варят кусками массой не более 2 кг и толщиной до 8 см в открытых котлах в течение 3 ч, а в закрытых котлах — при 112°C в течение 2,5 ч. Мясо считается обеззараженным, если в толще куска температура достигла 80°C.

Задания для самостоятельной работы

1. Приготовить препарат-отпечаток из поверхностных и глубоких слоев исследуемого мяса, окрасить по Граму, провести микроскопию и оценить качество мяса.
2. Сделать посев исследуемого мяса на агар Эндо.
3. Сделать посев мяса по Щукевичу в конденсат свежескошенного МПА.

*Тема 10***МИКРОБИОЛОГИЯ КОРМОВ.
ВОЗБУДИТЕЛИ МИКОТОКСИКОЗОВ**

Цель занятия. Ознакомить студентов с методами санитарно-бактериологического исследования кормов.

Материальное оснащение. Образцы сенажа, зернофураж, силос, некоторые имеют признаки поражения плесневыми

грибами, 50% -ный глицерин, бактериологические петли, препаровальные иглы, стерильная вода по 9 мл, горячий МПА в пробирке высоким столбиком, агар Чапека и Сабуро в чашках, элективные среды для выделения молочнокислых бактерий, чашки с готовыми посевами *Aspergillus*, *Stachybotrys*, *Fusarium*.

Микотоксикозы — кормовые отравления, возникающие у сельскохозяйственных животных после скармливания им кормов, пораженных токсигенными грибами, продуцирующими микотоксины. Восприимчивы все виды животных. Клинические признаки разнообразны: расстройство желудочно-кишечного тракта, поражение центральной нервной системы, дистрофия печени. Название болезни зависит от родового названия микроскопического гриба, вызвавшего кормовое отравление: аспергиллотоксикоз (*Aspergillus*), стахиботриотоксикоз (*Stachybotrys*), фузариотоксикоз (*Fusarium*).

При несоблюдении правил хранения комбикормов, сена, неправильной закладке силоса и сенажа, нарушении герметичности начинают развиваться плесневые грибы и гнилостные бактерии.

В лабораторию посылают пробы корма с признаками плесневого поражения (силос, сено, зернофураж), пораженные участки кишечника, паренхиматозные органы. Общее количество корма для исследования 0,5–1,0 кг, в сопроводительном документе указывают вид корма, цель исследования, основные клинические признаки у больных животных.

При лабораторной диагностике микотоксикозов одновременно и параллельно проводят:

- микологическое исследование, основная цель которого — выделение чистой культуры микроскопического гриба и идентификация его;
- миксобиологическое исследование корма, основная цель которого — определение токсичности корма и чистой культуры плесневого гриба.

Микологическое исследование проводят для выделения чистой культуры и определения родовой принадлежности микроскопических грибов из исследуемого корма. Для этого делают посев корма в чашки Петри со специальными питательными средами (Сабуро, Чапека, сусло-агар), в состав ко-

торых вводят антибиотики, подавляющие развитие сопутствующей бактериальной микрофлоры. Кусочки корма, зерно раскладывают на питательной среде в чашке Петри по часовой стрелке, культивируют при комнатной температуре 3–10 дней, по мере появления колоний приступают к определению вида гриба. Учитывают культуральные свойства: характер роста, форму и величину колоний, наличие пигмента. Для микроскопии часть мицелия изучаемого гриба вносят в каплю глицерина на предметном стекле, осторожно прикрывают покровным стеклом и микроскопируют под $\times 8$ и $\times 40$ объективами со слегка опущенным конденсором. При микроскопии изучают строение мицелия и, самое главное, органов спороношения, по которым определяют родовую и видовую принадлежность.

1. При отсутствии перегородок и наличии спорангиеносцев с округлым спорангием на конце, заполненном эндоспорами, данный гриб можно отнести к низшим, например, *Mucor*.

2. *Penicillium* (кистевидная плесень) — конидиеносцы ветвятся в верхней части несколько раз, образуя кисточки, на которых развиваются метелки с мутовками, из которых выталкиваются споры-конидии.

3. *Aspergillus* (лечная плесень) — возбудитель аспергиллотоксикоза имеет септированный мицелий, булабовидные конидиеносцы окруженные стеригмами с конидиями, на питательной среде образуют желтый, зеленый и черный пигмент.

4. Для грибов рода *Fusarium* характерен мицелий с перегородками, микроконидии грушевидной формы и макроконидии серповидной формы. На питательной среде образуют белый переплетенный мицелий, питательный субстрат окрашивают в вишневый цвет.

Токсикобиологическое исследование корма, основная цель которого — определение токсичности корма и чистой культуры микроскопического гриба.

Применяют следующие методы:

- биопроба на лабораторных животных;
- проба на простейших;
- кожная проба на кроликах.

Биопроба на животных для определения наличия микотоксина: 6–7 животным скармливают исследуемый продукт в течение 8 дней подряд. Изучают появившиеся клинические признаки: рвота, диарея, взъерошенная шерсть. Животных усыпляют, исследуют внутренние органы, отмечают наличие кровоизлияний, жировое перерождение тканей печени, желудка.

Для проведения *пробы на простейших* исследуемый продукт заливают водой и сутки экстрагируют. Каплю экстракта наносят на предметное стекло и в эту каплю вносят взвесь простейших. Если продукт содержал токсичный гриб, движение простейших прекращается через 3–5 мин, а в дальнейшем происходит лизис и гибель клеток.

Кожная проба на кроликах. Суть этого метода сводится к тому, что в колбу засыпают исследуемый корм или зерно, заливают эфиром, сутки экстрагируют, затем фильтруют. Полученный фильтрат выпаривают в вытяжном шкафу, в результате на дне остается маслянистая масса, которую исследуют на токсичность. Маслянистый токсин дважды через сутки втирают в подготовленный участок кожи кролика и наблюдают за появляющимися изменениями. В зависимости от силы токсина появляется покраснение, утолщение кожной складки, выпотевание экссудата, трещины и некроз кожи.

Бактериологическое исследование силоса. Схема исследования включает органолептическое исследование, микроскопию, выделение чистой культуры молочнокислых бактерий.

Микроскопическое исследование. Профламбированным пинцетом берут исследуемый силос и плотно прижимают его к предметному стеклу, так чтобы на предметном стекле остался видимый отпечаток. Препарат высушивают на воздухе, фиксируют в пламени спиртовки 2–3 с, окрашивают по Граму или простым методом.

Микрокартина зависит от «возраста» силоса или срока закладки.

В микрокартине силоса, взятого в первые дни после закладки, т. е. в период смешанной фазы брожения, будет видна эпифитная микрофлора, нормальная микрофлора поверхности здоровых растений: гнилостные бактерии, БГКП,

молочнокислые стрептококки и молочнокислые палочки, маслянокислые бактерии, дрожжи и плесневые грибы.

Микрофлора силоса, взятого в период основного брожения: под влиянием молочной кислоты происходит ингибирование, подавление гнилостной микрофлоры, поэтому в микрокартине в начале этой фазы преобладают молочнокислые стрептококки, которые по мере возрастания кислотности вытесняются молочнокислыми палочками.

Микрофлора третьей фазы характеризуется постепенным отмиранием кокковых и палочковидных бактерий.

Бактериологическое исследование. В колбу с 50 мл стерильной воды вносят 5 г силоса и 2–3 г стерильного речного песка, аккуратно встряхивают в течение 10 мин, чтобы отмыть бактерии от частичек силоса. Из полученного разведения 10^{-1} готовят ряд последовательных разведений в пробирках до 10^{-6} , которые затем используют для определения количества МАФАНМ и молочнокислых бактерий.

Определение количества МАФАНМ в 1 г силоса. Из пробирок с разведением силоса 10^{-5} и 10^{-6} переносят по 1 мл в чашки Петри и заливают расплавленным и охлажденным до 50°C МПА, культивируют 24–48 ч при 30°C , подсчитывают количество колоний и определяют количество бактерий в 1 г силоса.

Для определения количества микроскопических грибов и дрожжей проводится посев исследуемого корма на поверхность сусло-агара со 100 ЕД/мл стрептомицина.

Для определения количества молочнокислых бактерий делают посев из разведения 10^{-5} и 10^{-6} на капустный агар с мелом или на капустный агар со спиртом и мелом (1 мл суспензии методом горячей заливки для получения глубинных колоний и 0,05 мл суспензии распределяют по поверхности плотной среды для получения колоний на поверхности среды).

Посевы культивируют при 30°C 5–6 дней, только вокруг колоний молочнокислых бактерий будет видна прозрачная зона вследствие растворения мела.

Рецепт капустного агара с мелом: капустный бульон 900 мл, 100 мл дрожжевого экстракта, 10 г пептона, 20 г глюкозы, 3,35 г ацетата натрия, 0,025 г MnSO_4 , 20 г агар-агара. Стерильный мел добавляют в колбы из расчета 5 г на 200 мл

среды. Стерилизуют при 0,5 атм 30 мин. Подсчет количества выросших колоний проводится на 5–6 день.

Рецепт капустного агара со спиртом и мелом. В расплавленную и охлажденную до 50°C среду прибавляют 20 мл этилового спирта на 200 мл среды, тщательно взбалтывают и заливают в чашки Петри с исследуемым материалом. Подсчет количества выросших колоний проводится на 7–10 день. Спирт в этой среде подавляет рост посторонней микрофлоры.

Задания для самостоятельной работы

1. Ознакомиться с культуральными свойствами возбудителей микотоксикозов на питательной среде в чашке Петри.
2. Приготовить препараты из мицелия микроскопических грибов, выросших на питательных средах: *Aspergillus*, *Stachybotrys*, *Fusarium*, изучить под увеличением в 400 раз их морфологические свойства, определить родовую принадлежность по органам спороношения.
3. Провести посев силоса на элективные среды.

СПЕЦИАЛЬНАЯ ТЕРМИНОЛОГИЯ

- Авирулентный, невирулентный** — отсутствие у возбудителя болезни способности вызывать инфекционный процесс в макроорганизме. См. Вирулентность.
- Агар** — продукт, получаемый из морских водорослей, дающий в водных растворах стойкий студень. А. — сложное органическое соединение из смеси углеводов, растворяется в воде при температуре 80–86°С. Агаровый студень используется в качестве ингредиента полужидких и плотных питательных и дифференциально-диагностических сред в микробиологии.
- Агар мясо-пептонный (МПА)** — плотная или полужидкая питательная среда для культивирования микроорганизмов. МПА — основная среда в лабораторной практике, применяется в виде простого агара или сложных дифференциально-диагностических сред после добавления дополнительных веществ (например, углеводов) или индикаторов.
- Агглютинация** — склеивание и выпадение в осадок взвешенных, обладающих антигенностью частиц (бактерий, форменных элементов крови и др.), содержащихся в различных жидкостях тела, в результате склеивания под воздействием антител. А. специфична и широко применяется в иммунодиагностике инфекционных болезней.
- Агглютинины** — антитела, образующиеся в организме к определенным антигенам (агглютиногенам) и вступающие в реакцию с ними.
- Агглютинирующая сыворотка** — содержит антитела, способные склеивать корпускулярные вещества (микробы), содержащие специфические антигены. А. с. получают от животных, иммунизированных против определенных инфекционных болезней. Применяют А. с. для лабораторной идентификации микробов, а также в иммунотерапии и пассивной иммунопрофилактике при инфекционных болезнях. См. Иммунная сыворотка.
- Адсорбция** — поверхностное поглощение, концентрирование и удержание газообразного или растворенного вещества на по-

верхности твердого тела (адсорбента). А. усиливается при повышении концентрации адсорбируемого вещества или давления и уменьшается при подъеме температуры.

Активный центр антитела — участок молекулы иммуноглобулина, взаимодействующий только с комплементарным участком молекулы специфического антигена. Антитела содержат один, два и более активных центра.

Алиментарный — зависящий от питания (кормления), связанный с передачей возбудителя через корм и воду.

Аллергены — вещества, которые при попадании в организм изменяют его реакции или оказывают сенсибилизирующее действие. После первичного контакта с А. организм становится сверхчувствительным к нему и при повторном контакте отвечает аллергической реакцией. Различают экзо- и эндогенные А. Экзогенные А. могут быть неинфекционные (лекарственные вещества, пищевые продукты и др.) и инфекционные (микробы, вирусы, микроскопические грибы).

Аллергия — изменение реакции организма, повышенная чувствительность его к различным веществам (аллергенам).

Анатоксин — токсин, утративший свою токсичность под воздействием химических или физических факторов, но сохранивший антигенные и иммуногенные свойства, например, столбнячный А., ботулинический А.

Амфитрихи — подвижные бактерии с двумя полярно расположенными жгутиками или имеющие по пучку жгутиков на обоих концах. См. Жгутики бактерий.

Анабиоз — состояние организма, характеризующееся обратимым резким замедлением жизненных процессов при отсутствии видимых внешних проявлений жизни.

Анаэробы — организмы, способные жить и развиваться при отсутствии свободного молекулярного кислорода и брать необходимую энергию при расщеплении сложных соединений, находящихся в среде обитания.

Антагонизм микробный — угнетение жизнедеятельности одного микроба другим. Одна из форм взаимоотношений микробов в ассоциациях. А. м. является принципиальной основой получения и применения антибиотиков.

Антибиотики — продукты жизнедеятельности ряда микроорганизмов (бактерий, актиномицетов, плесневых грибов), растений или животных тканей, угнетающие рост и размножение многих микробов и даже губительно действующие на единичные из них. Некоторые А. обладают противоопухолевым действием.

Антигены — вещества, вызывающие при введении в организм развитие специфических иммунологических реакций (синтез гу-

- моральных антител или дифференциацию клона сенсibilизированных лимфоцитов).
- Антагонизм** — противоположное действие, взаимное противодействие органов, лекарственных средств, микробов.
- Антигенная детерминанта** — активный участок антигена.
- Антигенность** — показатель, характеризующий способность антигена индуцировать синтез антител в организме.
- Антигены бактерий** — образуют сложный комплекс антигенов, состоящих из высокомолекулярных соединений белковой природы, биологически активных специфических полисахаридов и других химических соединений.
- Антигены неполноценные** (гаптены) — низкомолекулярные вещества, которые могут реагировать с антителами, но самостоятельно не способны индуцировать их синтез в организме.
- Антисептика** — совокупность методов и приемов борьбы с патогенными микроорганизмами, внедрившимися в раны, ткани и полости организма.
- Антисыворотка** — сыворотка, содержащая специфические антитела против определенного антигена.
- Антитела** (иммунные тела, иммуноглобулины) — глобулины, синтезируемые в лимфоидной ткани плазматическими клетками после введения антигена в организм.
- Антитоксины** — антитела, образующиеся при попадании в организм токсинов, обладающих антигенными свойствами.
- Антитела гуморальные** — антитела, находящиеся в сыворотке крови. Определение наличия А. г. в сыворотке крови является одним из основных методов лабораторной диагностики инфекционных болезней.
- Антитела моноклональные** — антитела, синтезируемые плазматическими клетками единого клеточного клона В-лимфоцита, окончательными звеньями дифференциации которого они являются.
- Асептика** — система мероприятий, направленных на обеспечение работы в стерильных условиях, предупреждающих внедрение патогенных микроорганизмов в раны и полости исследуемого организма (объекта).
- Аттенуация** — искусственное стойкое ослабление, уменьшение вирулентности возбудителей инфекционных болезней.
- Бактериостатические средства** — лекарства, останавливающие или замедляющие размножение бактерий: сульфаниламидные препараты, антибиотики, химиотерапевтические средства.
- Бактерицидный** — убивающий бактерии.
- Бактерицидная фаза** — сущность этой фазы в том, что количество микроорганизмов в свежесвыдоенном молоке в процессе хранения уменьшается. Это объясняется наличием в молоке различных

противомикробных веществ: лактенинов, бактериолизинов и лизоцима.

Бациллы — палочковидные, грамположительные аэробные микробы, образующие при неблагоприятных условиях (вне организма) споры. Большинство *B.* сапрофиты, некоторые служат возбудителями инфекционных болезней, например, сибирской язвы (*Bac. anthracis*).

Бифидобактерин — новый кисломолочный напиток. Готовят его с использованием бифидобактерий, которые являются представителями нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта.

Биологическая проба — заражения лабораторных животных исследуемым материалом с целью выявления и идентификации возбудителей болезней или их токсинов.

Биотехнология — комплекс естественных или искусственно созданных технологических приемов для создания биологических систем или использования в промышленных и научных целях.

Боксы (бактериологические) — застекленные камеры, предназначенные для микробиологических и вирусологических исследований в асептических условиях.

Брожение — биологический процесс расщепления сложных органических веществ.

Вакцина — биологич. препарат, содержащий ослабленные или убитые патогенные микроорганизмы или продукты их жизнедеятельности, которые применяют для активной иммунизации (вакцинации) с целью создания невосприимчивости (иммунитета) организма к определенным инфекционным болезням

Вакцинопрофилактика — вакцинирование с целью профилактики инфекционных болезней. В. подразделяют на плановую и вынужденную. Плановую В. осуществляют с предохранительной целью в угрожаемой болезнью зоне, вынужденную В. — при возникновении болезни с целью ее ликвидации.

Вирулентность — степень патогенности и индивидуальных особенностей каждого штамма патогенного микроорганизма, способность проникать в него, преодолевать естественные защитные силы макроорганизма, размножаться в нем и образовывать токсины.

Восприимчивость к инфекции — способность организма отвечать на внедрение, размножение и жизнедеятельность патогенных возбудителей комплексом защитно-приспособительных реакций, развитием инфекции.

Гемолиз — процесс разрушения нормальных эритроцитов с выделением из них в окружающую среду гемоглобина.

Генная (генетическая) инженерия — отрасль биологической науки, изучающая закономерности конструирования *in vitro*

- рекомбинантных молекул ДНК и поведение их в реципиентной клетке.
- Генотип** — совокупность всех наследственных факторов организма как ядерных (геном), так и неядерных, внехромосомных. Г. микроорганизмов — потенциальная способность к фенотипическому выражению любого их признака.
- Ген** — носитель наследственной информации, передаваемой от поколения к поколению.
- Гены** — фрагменты молекулы ДНК, у некоторых вирусов РНК, контролирующие синтез одного белка или пептида.
- Генерализация** — распространение патологического процесса из первичного локального (ограниченного) очага по всему организму.
- Гетеротрофы** — в противоположность аутоотрофным микробам получают углерод главным образом из готовых органических соединений.
- Гипериммунизация** — сверхиммунизация, иммунизация животных большими дозами антигена (однократно или путем повторных введений) с целью получения специфических лечебных или диагностических сывороток.
- Гифы** — ветвящиеся нити, составляющие мицелий микроскопических грибов.
- Гнотобиология** — учение о гнотобиотах.
- Гнотобиоты** — животные, получаемые путем гистерэктомии и выращиваемые в особых условиях, полностью свободные от микрофлоры или являющиеся носителями только определенных видов микроорганизмов.
- Гомогенный** — однородный (по структуре и составу), бесструктурный, обладающий одними и теми же свойствами, не обнаруживающий воспринимаемых глазом различий строения.
- Гомологичный** — соответственный, подобный, сходный.
- Грамотрицательные бактерии** — бактерии, которые при окраске по Граму, окрашиваются в красный цвет. Основой клеточной стенки бактерий является пептидогликан, от него зависят прочность и ригидность клетки.
- Грамположительные бактерии** — бактерии, которые при окраске по Граму окрашиваются в фиолетовый цвет. У Г. б. пептидогликан многослоен и плотный, с ним связаны тейхоевые кислоты.
- Дезинфекция** — обеззараживание, уничтожение возбудителей инфекционных болезней (бактерий, вирусов, риккетсий и т. д.) во внешней среде путем применения физических и химических средств.
- Диссоциация бактерий** — появление в популяции бактерий, отличающихся от исходного типа внешним видом и структурой колоний, а также наследственно закрепленными изменениями

некоторых морфологических, культуральных и биологических свойств.

Единица вирулентности — величина, характеризующая степень патогенности микробов. За Е. в. принимают наименьшее количество живых микробов, вызывающих в определенный срок гибель около 80% соответствующих лабораторных животных.

Желатин — клей, продукт частичного гидролиза коллагена, содержащегося в хрящах и костях животного.

Жгутики бактерий — органоиды движения бактерий.

Зооантропонозы — группа заразных болезней, общих для животных и человека.

Зоонозы — группа болезней, свойственная только животным (например, контагиозная плевропневмония крупного рогатого скота, чума свиней, мыт лошадей).

Идентификация микроорганизмов — система микроскопических, культуральных, биохимических, серологических исследований и определения патогенных свойств для установления этиологического агента, определения его вида.

Изменчивость микроорганизмов — способность к изменениям некоторых признаков и свойств при жизни.

Иммунизация — метод специфической профилактики инфекционных болезней путем создания в организме искусственного иммунитета. Различают активную и пассивную иммунизацию.

Иммунитет — невосприимчивость, способность организма защищать себя от веществ как инфекционной, так и неинфекционной природы, носящих для него генетически чужеродную информацию, с целью сохранения необходимого для существования гомеостаза. Различают активный, пассивный и другие виды И.

Иммунитет антибактериальный — невосприимчивость организма к определенным **бактериальным инфекциям**.

Иммунная сыворотка — сыворотка, содержащая специфич. антитела, полученная от иммунизированного (вакцинированного) или переболевшего животного.

Иммунокомпетентность — иммунореактивность, способность организма ответить на введение антигена иммунной реакцией.

Иммунологическая память — способность организма отвечать ускоренной и усиленной иммунной реакцией при повторном контакте с антигеном.

Иммунологическая толерантность — иммунологическая ареактивность, состояние организма, при котором не происходит иммунной ответной реакции на введение антигена.

Иммунотерапия — метод лечения инфекционных больных путем воздействия на иммунную систему организма.

Инфекция — явление, специфической сущностью которого является внедрение и размножение инфекц. агента в макроорганизм.

- ме с последующим развитием различных форм их взаимоотношений — от носительства возбудителя до выраженного проявления болезни.
- Инфекционный процесс** — комплекс реакций, возникающих в макроорганизме при инфекции и направленных на обеспечение гомеостаза и равновесия с окружающей средой.
- Клон** — полученное бесплодным путем генетически однообразное вегетативное потомство одного вируса или одноклеточного (многоклеточного) организма.
- Коли-индекс** — количество особей кишечной палочки, содержащихся в 1 л (для твердых тел — в 1 кг) исследуемого продукта (воды).
- Коли-титр** — величина, выражающая наименьшее количество исследуемого продукта (воды) в мл (для твердых тел — в граммах), в котором обнаружена одна кишечная палочка.
- Колония бактериальная** — изолированное скопление клеток бактерий одного вида, сформированное на поверхности или внутри плотных или полужидких питательных сред в результате размножения одной или нескольких бактериальных клеток.
- Комплект** — комплекс термолabile белков свежей сыворотки крови животных и человека, играющий важную роль в иммунологических реакциях организма.
- Культура бактериальная** — популяция жизнеспособных бактерий, выращенная на плотной или в жидкой питательной среде.
- Консерванты** — вещества, используемые для предотвращения разложения органических соединений.
- Контагиозность** — способность болезни распространяться вследствие передачи возбудителя при непосредственном соприкосновении больных и здоровых животных или через промежуточные объекты.
- Контаминация** — обсеменение поверхности тела животного, предметов ухода, почвы, воды, кормов, биопрепаратов и других объектов патогенными микроорганизмами.
- Конъюгация** — процесс временного объединения двух особей у одноклеточных организмов, связанный с переносом генетического материала из одной особи в другую, эволюционный аналог полового размножения.
- Культура чистая** — культура микроорганизма, содержащая особей лишь одного биологического вида.
- Кефир** — кисломолочный продукт, получаемый из молока с помощью кефирных грибков.
- Кумыс** — получают из парного кобыльего непастеризованного молока с использованием чистых культур молочнокислых палочек и дрожжей.

- Летальная доза (ЛД₅₀)** — смертельная доза — *dosis letalis (DL)*, доза микроорганизмов, вызывающая смерть у 50% экспериментально зараженных животных.
- Лизис микроорганизмов** — растворение микроорганизмов под влиянием специфич. бактериолизин, бактериофагов, лизоцима.
- Лизоцим** — энзим, расщепляющий сложные полисахариды клеточной оболочки и вызывающий лизис грамположительных микроорганизмов (бактериологический энзим). Л. содержится в белке яйца, в слизистой оболочке носовой полости и кишечника, в печени и селезенке, различных жидкостях организма (слезе, слюне, молоке, сыворотке крови).
- Лофотрихи** — подвижные бактерии, у которых жгутики располагаются в виде пучка на одном конце.
- Лиофилизация** — лиофильная сушка, сублимационное высушивание, метод высушивания биологических объектов (например, вирусов, микробов) и пищевых продуктов в замороженном состоянии под вакуумом.
- Мазки** — препараты, приготовленные из исследуемого материала (гноя, мокроты, крови и т. д.), нанесенного на предметное стекло, и предназначенные для изучения под микроскопом.
- Макрофаги** — большие фагоциты, фагоцитарные клетки, интенсивно фагоцитирующие чужеродный для организма материал.
- Метаболизм** — основной обмен веществ, совокупность химических превращений, происходящих в живом организме, состоящих из ассимиляционной (анаболизм) и диссимиляционной (катаболизм) фаз.
- Микробный пейзаж** — понятие, характеризующее особенности микроорганизмов при их взаимодействии друг с другом, с окружающей средой.
- Микроорганизмы** — мельчайшие организмы, невидимые невооруженным глазом.
- Микрофлора** — микробный пейзаж, совокупность различных видов микроорганизмов.
- Моноклональные антитела** — строго специфические антитела, способные выявить минимальные различия в химическом составе и пространственной конфигурации молекул.
- Монотрихи** — подвижные бактерии, имеющие по одному жгутику на одном из полюсов бактериальной клетки.
- Мутагены** — физические и химические факторы, вызывающие в организме стойкие наследственные изменения — мутации.
- Мутация, мутационная изменчивость** — наследуемые изменения гена или генов, контролируемых определенными наследственными признаками.
- Масло** — сырьем для получения масла являются 25–35%-ные сливки, в которые вносят закваску из молочнокислого стрептококка.

- Молочнокислая фаза** — период нарастания кислотности молока под действием молочнокислого стрептококка, на смену им приходят кислотоустойчивые молочнокислые палочки, и молоко в этой фазе превращается в кисломолочный продукт.
- Нормальная микрофлора молока** — это молочнокислые бактерии. Основным продуктом их жизнедеятельности является молочная кислота.
- Пороки молока** — вызывает гнилостная микрофлора: маслянокислые бактерии, плесневые грибы, кишечная палочка.
- Нормальные антитела** — в крови человека и животных обнаруживают антитела, которые могут реагировать с различными антигенами (эритроцитами, бактериями и т. д.), хотя ранее организм не подвергался иммунизации этими антигенами.
- Нуклеоид** — ядро прокариотов, состоящее из единственной гигантской хромосомы, не изолированной от цитоплазмы мембраной.
- Нуклеотиды** — составные части ДНК и РНК. Каждый нуклеотид в молекуле ДНК состоит из одного азотистого основания, пятиуглеродного углевода — дезоксирибозы и остатка фосфорной кислоты. В РНК сахар представлен рибозой, а тимин заменен урацилом.
- Паразит** — организм, живущий на поверхности или внутри другого организма и питающийся за его счет.
- Пастеризация** (от имени французского ученого Л. Пастера) — способ обеззараживания органических жидкостей (молока, фруктовых соков и т. д.). Используют длительную П. (30 мин при +65°C), кратковременную (15–20 с при 72–75°C) и моментальную (при 85–90°C) без выдержки. Погибают вегетативные клетки, споры при этом не уничтожаются. Продукт обязательно охлаждают до 4–6°C.
- Патогенность, болезнетворность** — способность микробов вызывать инфекционный процесс у макроорганизмов определенного вида.
- Петля бактериальная (бактериологическая петля)** — инструмент для посева и пересева микроорганизмов, состоящий из платиновой проволочной петли, укрепленной в держателе. П. б. из платины быстро накаливается в пламени горелки и так же быстро остывает, когда ее извлекают из огня.
- Пиемия** — форма сепсиса, отличающаяся от септицемии более длительным течением и гематогенным образованием вторичных очагов гнойного воспаления (метастазов) в различных органах (в печени, легких).
- Питание микроорганизмов** — усвоение питательных веществ: аминокислот, углеводов, витаминов, минеральных веществ и др.
- Полиморфизм** — форма существования одного и того же образования в различных видах.

- Популяция** — совокупность особей одного вида макро- и микроорганизмов, длительно населяющих среду при определенных условиях.
- Постулаты Коха** — по имени немецкого ученого Р. Коха (1843–1910), триада Коха — постулаты, или триады, рассматривающие условия, при которых данный микроорганизм может быть признан возбудителем исследуемой болезни.
- Пробиотики** — биопрепараты, содержащие живые, антагонистически активные бактерии. Применяются для профилактики и лечения инфекционных желудочно-кишечных болезней животных.
- Простокваша** — молоко в фазе молочнокислых бактерий.
- Сенаж** — это разновидность консервированного корма из провяленных трав, главным образом бобовых, убранных в начале бутонизации, с влажностью в пределах 40–50%, созревание идет в анаэробных условиях.
- Сено** — сушка, старый и наиболее распространенный способ консервирования зеленой массы.
- Силосование** — сложный микробиологический и биологический процесс консервирования сочной растительной массы.
- Сыр** — молочный продукт, получаемый в результате сычужного свертывания молока, обработке сгустка, его созревания с целью получения продукта со специфическим запахом, **консистенцией и вкусом**.
- Препараты биологические, биопрепараты** — средства биологического происхождения, используемые для диагностики, профилактики и лечения заразных болезней, стимулирования роста сельскохозяйственных животных.
- Преципитация** — иммунологическая реакция, взаимодействие растворимого антигена (преципитиногена) и антитела (преципитина) в присутствии электролита с образованием преципитата.
- Продромальный период** — период предвестников инфекционной болезни, характеризующийся первыми, но не всегда специфическими для конкретной болезни симптомами (температура, слабость, угнетенное состояние, отсутствие аппетита).
- Прокариоты** — доядерные микробы, характеризующиеся отсутствием изолированного ядра. См. Бактерии.
- Резистентность естественная** — повышенная устойчивость организма к инфекции, обусловленная не активной или пассивной иммунизацией, а его врожденными биологическими особенностями.
- Реконвалесцент** — организм, находящийся в стадии выздоровления.
- Сапрофиты** — бактерии и грибы, питающиеся органическими веществами отмерших организмов или выделениями живых.

- Сенсibilизация** — приобретение организмом специфической повышенной чувствительности к чужеродным веществам, чаще белковой природы, аллергенам.
- Сепсис** — состояние организма, при котором патогенные микроорганизмы, проникшие из первичного очага инфекции в кровь, размножаются в ней и заносятся во все ткани и органы, где вызывают воспалительные и дегенеративно-некротические процессы. Клиническая картина С. не зависит от вида возбудителя инфекции.
- Септикопиемия** — смешанная форма сепсиса, периодическое поступление в кровь микробов из первичного септического очага и образование вторичных абсцессов (очагов гнойного воспаления).
- Септицемия** — форма сепсиса, при которой наличие патогенных микроорганизмов в крови не сопровождается образованием метастатических очагов гнойного воспаления.
- Серодиагностика** — методы лабораторной иммунодиагностики, входящие в диагностический комплекс инфекционных болезней.
- Серологические реакции** — методы иммунодиагностики, разработанные для установления в сыворотке крови антител или антигена.
- Серопротекция** — пассивная иммунизация — метод, при котором в организм для предотвращения инфекционной болезни вводят гипериммунные или реконвалесцентные сыворотки, содержащие специфические антитела к антигенам возбудителей этих болезней. См. Иммунная сыворотка.
- Споры** — зародышевые клетки, служащие для бесполого размножения некоторых растений (грибы, водоросли) и части одноклеточных.
- Среды питательные** — различные искусственные среды для культивирования микробов с целью выделения возбудителя болезни из исследуемого материала и определения его вида, для накопления микробной массы при изготовлении биологических препаратов
- Стерилизация** — 1) уничтожение микробов с помощью высокой температуры или химических веществ; 2) обеспложивание, лишение способности к оплодотворению.
- Таксономия** — раздел систематики, изучающий принципы, методы и правила классификации организмов, в том числе и микробов. Таксономические категории, так называемые таксоны, — соподчинение иерархическим группам объектов: вид, род, семейство, порядок, класс, отдел.
- Тиндализация** — метод дробной стерилизации.
- Токсемия** — наличие токсинов в крови, общее болезненное состояние организма, вызванное циркуляцией в крови токсинов.

- Токсины** — вещества бактериального, растительного или животного происхождения, вызывающие при попадании в организм человека или животного заболевание или смерть.
- Условно патогенные микробы** — потенциально патогенные микробы, обитающие в макроорганизме как комменсалы и вызывающие инфекционный процесс лишь при ослаблении резистентности хозяина.
- Фагоцитоз** — процесс активного поглощения клетками организма попадающих в него патогенных живых или убитых микробов и других чужеродных частиц с последующим перевариванием при помощи внеклеточных ферментов.
- Фагоциты** — клетки, с помощью которых осуществляется фагоцитоз.
- Фенотип** — совокупность признаков, структур и свойств организма, сформировавшихся в процессе его индивидуального развития и определяющих сущность данной особи.
- Циля — Нильсена** — сложный метод окраски, применяемый для дифференцировки кислотоустойчивых микробов от кислотоподатливых, предложенный немецкими учеными Цилем и Нильсеном.
- Штамм** — культура микроорганизма одного вида с одинаковыми морфологическими и биологическими свойствами.
- Экология микроорганизмов** — наука, изучающая взаимоотношения микроорганизмов с окружающей средой.
- Энзимы бактерий** — биологические катализаторы белковой природы, обладающие специфичностью и играющие важную роль в обмене веществ микроорганизмов.
- Эпизоотия** — средняя степень напряженности эпизоотического процесса. Характеризуется довольно широким распространением какой-либо инфекционной болезни, охватывающей хозяйство, район, область, страну.
- Этиология** — раздел патологии о причинах и условиях возникновения болезней.
- Эукариоты** — организмы (все, кроме бактерий, включая цианобактерий), обладающие, в отличие от прокариот, оформленным клеточным ядром, ограниченным от цитоплазмы ядерной оболочкой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Асонов, Н. Р.* Микробиология. — М. : Колос, 2002.
2. *Автономов, И. Я.* Технология приготовления сенажа. — М. : Колос, 1968.
3. *Болотников, И. А.* Словарь иммунологических терминов. — 2-е изд., перераб. и доп. — М. : Росагропромиздат, 1991.
4. *Госманов, Р. Г.* Основы противомикробного иммунитета / Р. Г. Госманов, Н. М. Колычев. — Омск : ГАУ, 2002.
5. *Госманов Р. Г.* Общая и специальная микробиология / Р. Г. Госманов, А. И. Ибрагимова. — Казань : КГАВМ, 2004.
6. *Колычев, Н. М.* Ветеринарная микробиология и иммунология / Н. М. Колычев, Р. Г. Госманов. — М. : Колос, 2003.
7. *Макаров, В.* Основы инфекционной иммунологии / В. Макаров [и др.]. — Владимир ; Москва : Фолиант, 2000.
8. *Макарецв Н. Г.* Кормление с/х животных. — Калуга : Облиздат, 1999.
9. *Мишустин, Е. Н.* Микробиология / Е. Н. Мишустин, В. Т. Емцев. — М. : Колос, 1987.
10. *Спесивцева, Н. А.* Микозы и микотоксикозы. — М. : Колос, 1964.
11. *Шлегель, Г.* Общая микробиология. — М. : Мир, 1987.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
Список сокращений	5

Раздел первый

Общая микробиология	6
Тема 1. Предмет и история развития, задачи и основные направления микробиологии и иммунологии. Принципы классификации. Морфология и строение микроорганизмов	6
Тема 2. Физиология микроорганизмов: химический состав, питание, дыхание, рост и размножение	20
Тема 3. Наследственность и изменчивость микроорганизмов	27
Тема 4. Экология микроорганизмов	29
Тема 5. Превращения микроорганизмами соединений азота и углерода	39
Тема 6. Формы взаимоотношений в мире микроорганизмов. Антибиотики	50
Тема 7. Влияние факторов внешней среды на микроорганизмы	56

Раздел второй

Учение об инфекции и иммунитете	59
Тема 8. Учение об инфекции и иммунитете	59

Раздел третий

Частная микробиология	70
Тема 9. Микроорганизмы — возбудители бактериальных инфекций	70
Тема 10. Микроорганизмы — возбудители грибковых инфекций (дерматомикозов)	78
Тема 11. Микроорганизмы — возбудители вирусных инфекций. Бактериофаги	80

Раздел четвертый

Специальная микробиология	87
Тема 12. Микробиология молока и молочных продуктов	87
Тема 13. Бактериологическое исследование мяса	110
Тема 14. Микробиология яиц	120
Тема 15. Микробиология кормов	123
Тема 16. Микрофлора кожевенно-мехового сырья	134
Тема 17. Микробиология навоза	138

Раздел пятый

Лабораторные занятия	142
Тема 1. Микробиологическая лаборатория и техника безопасности. Световой микроскоп, его устройство и правила работы. Бактериологические краски. Приготовление препарата для микроскопии. Простой метод окрашивания. Основные формы бактерий	142
Тема 2. Сложные методы окрашивания. Окраска по Граму, окраска спор и капсул. Исследование бактерий на подвижность	151
Тема 3. Культивирование микроорганизмов в лабораторных условиях. Приготовление питательных сред для их выращивания. Методы стерилизации питательных сред	155
Тема 4. Культивирование бактерий в лабораторных условиях. Посевы и пересевы бактерий. Методы выделения чистых культур микроорганизмов. Культуральные и ферментативные свойства бактерий	163
Тема 5. Санитарно-бактериологическое исследование воздуха и почвы. Определение коли-титра и коли-индекса воды	170
Тема 6. Серологические методы диагностики инфекционных болезней сельскохозяйственных животных	182
Тема 7. Возбудители колибактериоза, сальмонеллеза, туберкулеза и сибирской язвы	190
Тема 8. Микробиологическое исследование молока. Определение общего микробного числа. Редуктазная проба. Коли-титр молока. Изучение микрофлоры кисломолочных продуктов . . .	199
Тема 9. Бактериологическое исследование мяса	216
Тема 10. Микробиология кормов. Возбудители микотоксикозов	219
Специальная терминология	225
Список литературы	237

*Рауис Госманович ГОСМАНОВ
Альфия Исламовна ИБРАГИМОВА
Альберт Камилович ГАЛИУЛЛИН*

МИКРОБИОЛОГИЯ И ИММУНОЛОГИЯ

Учебное пособие

Издание второе, переработанное и дополненное

Зав. редакцией ветеринарной и сельскохозяйственной
литературы *И. О. Туренко*

Ответственный редактор *А. Д. Пузовик*

Технический редактор *М. С. Давыдова*

Корректор *Т. А. Брылева*

Подготовка иллюстраций *Е. В. Ляпусова*

Верстка *М. И. Хетерели*

Выпускающие *Е. П. Королькова, Н. В. Черезова*

ЛР № 065466 от 21.10.97

Гигиенический сертификат 78.01.07.953.П.007216.04.10
от 21.04.2010 г., выдан ЦГСЭН в СПб

Издательство «ЛАНЬ»

lan@lanbook.ru; www.lanbook.com

192029, Санкт-Петербург, Общественный пер., 5.

Тел./факс: (812) 412-29-35, 412-05-97, 412-92-72.

Бесплатный звонок по России: 8-800-700-40-71

ГДЕ КУПИТЬ

ДЛЯ ОРГАНИЗАЦИЙ:

*Для того чтобы заказать необходимые Вам книги, достаточно обратиться
в любую из торговых компаний Издательского Дома «ЛАНЬ»:*

по России и за рубежом

«ЛАНЬ-ТРЕЙД». 192029, Санкт-Петербург, ул. Крупской, 13
тел.: (812) 412-85-78, 412-14-45, 412-85-82; тел./факс: (812) 412-54-93
e-mail: trade@lanbook.ru; ICQ: 446-869-967
www.lanpbl.spb.ru/price.htm

в Москве и в Московской области

«ЛАНЬ-ПРЕСС». 109263, Москва, 7-я ул. Текстильщиков, д. 6/19
тел.: (499) 178-65-85; e-mail: lanpress@lanbook.ru

в Краснодаре и в Краснодарском крае

«ЛАНЬ-ЮГ». 350072, Краснодар, ул. Жлобы, д. 1/1
тел.: (861) 274-10-35; e-mail: lankrd98@mail.ru

ДЛЯ РОЗНИЧНЫХ ПОКУПАТЕЛЕЙ:

интернет-магазины:

Издательство «Лань»: <http://www.lanbook.com>

«Сова»: <http://www.symplex.ru>; «Ozon.ru»: <http://www.ozon.ru>

«Библион»: <http://www.biblion.ru>

Подписано в печать 22.05.13.

Бумага офсетная. Гарнитура Школьная. Формат 84×108¹/₃₂.

Печать офсетная. Усл. п. л. 12,60. Тираж 1000 экз.

Заказ № _____

Отпечатано в полном соответствии
с качеством предоставленных диапозитивов
в ОАО «Издательско-полиграфическое предприятие «Правда Севера».
163002, г. Архангельск, пр. Новгородский, д. 32.
Тел./факс (8182) 64-14-54; www.iprps.ru