



Т.Н.Танашук, к.т.н., с.н.с., нач. отдела микробиологии,
В.А.Загоруйко, д.т.н., проф., член-корр. НААН, и.о. директора,
В.А.Щербина, м.н.с. отдела микробиологии,
Г.М.Ананченкова, инженер отдела микробиологии,
О.Е.Кухаренко, аспирант
Национальный институт винограда и вина «Магарач»

ОБ ЭКОЛОГИИ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ КРЫМА

Прогноз биологической стабильности готовой продукции требует глубоких исследований роли разных групп микроорганизмов в процессах болезни вин. Особое место при этом отводится молочнокислым бактериям (МКБ), исследование влияния которых на процессы, происходящие в вине, возможно только после предварительного изучения их экологии, физиолого-биохимических особенностей и определения их видовой принадлежности.

Основные исследования по изучению МКБ вина проведены французскими учеными Пейно Э., Рибери-Гайон Ж., Лафон-Лафуркад С., Домерк С., Сюдро Р., и др., и обобщены Рибери-Гайоном и соавт. [1]. Молочнокислые бактерии вина изучали Ранкин Б. и Форначон Ж. (Австралия), Росси И., Костамагна Л., Клементин Ф. (Италия); Марэ Р. и Соцци (Швейцария); Ингрэхэм Ж., Вогн Р., Кук Г., Райс А. (США); Чэлфэн Ж., Гольдберг И., Мателс Р. (Израиль); Квасников Е., Кондо Г., Бурьян Н., Кишковская С.А., Горина В.А. (Украина). Данными исследованиями установлено, что в вине присутствуют представители МКБ родов: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*.

Несмотря на все имеющиеся знания о данных микроорганизмах, изучение вопросов их экологии остается по-прежнему актуальным. Быстро меняющиеся требования в систематике бактерий, введение новых критериев и издание новых определителей делают неполными и зачастую устаревшими полученные ранее сведения о биоразнообразии МКБ, обитающих на винограде. Кроме того, сложность культивирования МКБ, выделенных из вина, а также изменчивость морфологических и биохимических свойств затрудняет их определение до вида. Продолжение исследований в данном направлении с использованием современных молекулярно-генетических методов диагностики микроорганизмов может значительно расширить знания о роли МКБ в пищевой экосистеме, выявить специфические характеристики конкретных штаммов, способствующие их размножению в занимаемой нише и тем самым облегчить прогнозирование болезней вина.

Целью данного исследования являлось изучение некоторых вопросов экологии молочнокислых бактерий современного винодельческого производства АР Крым и формирование рабочей коллекции изолятов МКБ.

Объектами исследования служили виноград, виноматериалы и вина из винодельческих регионов АР Крым (ОАО «Агрофирма «Золотая Балка», ПАО «Солнечная Долина», ГП «Ливадия», ПОХ «Магарач»). Образцы готовой продукции с признаками помутнений оценивали по мере поступления из различных винодельческих регионов Украины.

Микробиологическое состояние образ-

В статье представлены результаты исследования особенности экологии молочнокислых бактерий АР Крым. Дана морфологическая и физиолого-биохимическая характеристика выделенным изолятам МКБ.

Ключевые слова: микробиологическое состояние образцов, биоразнообразие МКБ, культивирование, морфология колоний и клеток.

цов на присутствие в них молочнокислых бактерий определяли путём микроскопирования отобранных проб после центрифугирования. Физиологическое состояние МКБ определяли, анализируя результаты роста бактерий в анаэробных условиях на жидкой питательной среде (получение накопительной культуры на солодово-яблочном сусле) и на плотной питательной среде (агаризованное солодово-яблочное сусло) при поверхностном культивировании.

Чистые линии МКБ получали по схеме: рассев накопительной культуры МКБ на плотную питательную среду, выделение отдельных колоний. Идентификацию чистых линий изолятов МКБ проводили в соответствии с методическими подходами, описанными в работе Квасникова и Нестеренко [2] по совокупности признаков: морфологических (форма клеток и колоний) и культуральных (признаки, проявляющиеся при культивировании чистых культур). Физиолого-биохимическую характеристику давали по результатам исследования способности изолятов образовывать газ из глюкозы, по наличию каталазной активности, по росту при температурах 15°C и 45°C, по устойчивости к спирту.

В данном сообщении дана оценка результатам, полученных в течение 2008-2012 гг. За этот период были проанализированы более 500 образцов винограда, виноматериалов и вин. Обследованы все основные этапы технологического процесса: брожение сусла, виноматериалы на стадии дображивания, виноматериалы на хранении и выдержке, виноматериалы, подготовленные к розливу.

Микроскопическая картина броющего сусла из винограда, поступившего на переработку, показала, что молочнокислые бактерии встречаются на винограде значительно реже, чем дрожжи и уксуснокислые бактерии. На стадии активного брожения присутствия МКБ не наблюдалось, по окончании брожения представители данной группы бактерий различного вида были обнаружены только в 5% исследованных проб. Частота встречаемости МКБ на винограде зависела в основном от активной кислотности и соотношения органических кислот и не зависела от региона произрастания винограда. Так, в виноградном сусле при pH 3,0-3,4 МКБ не развивались.

В виноматериалах на дображивании частота обнаружения МКБ зависела от ви-

нодельческого региона и от климатических условий года, а также от применяемых на производстве технологических приёмов. На данном этапе МКБ были обнаружены только в 20% проанализированных проб. В основном это были очень мелкие бактерии кокковой формы, единичные в поле зрения. Наличие МКБ существенно зависело от активной кислотности и соотношения органических кислот в сусле. Благополучные виноматериалы сохранили винную и яблочную кислоты благодаря отсутствию МКБ или их наличию в очень небольшом количестве. В виноматериалах, инфицированных МКБ, наблюдалось, вследствие их жизнедеятельности, полное отсутствие яблочной, а в некоторых – и винной кислот. Все эти образцы отличались высоким значением pH (от 3,8 до 4,5).

Особо следует отметить результаты, полученные при анализе виноматериалов на хранении и готовой продукции. Все образцы, в которых наблюдалось присутствие МКБ, характеризовались нами как биологически нестабильные, поскольку на данных этапах производственного процесса при недостаточном микробиологическом контроле МКБ могут способствовать прохождению необратимых биохимических преобразований в вине, приводящих к их заболеваниям. В данных образцах обнаруженная бактериальная микрофлора была представлена до 90% МКБ палочковидной формы.

Таким образом, исследование различных этапов технологии приготовления виноматериалов с точки зрения микробиологии, подтверждает данные о том, что МКБ присутствуют на всех стадиях технологического цикла и сопровождают полученные молодые и здоровые виноматериалы на всех этапах до готовой продукции. Благоприятные условия для развития МКБ создаются при наличии таких факторов, как отсутствие или низкое содержание диоксида серы, низкая активная кислотность, относительно высокая температура брожения, недоброды, санитарное состояние производства.

В результате изучения жизнеспособности выявленных МКБ в чистую линию выделено и изучено 48 штаммов МКБ, из них – 12 фертильных линий. Установлено, что все выделенные изоляты МКБ в обследованных виноматериалах были в физиологически активном состоянии и на селективных средах давали рост на 3-5 сутки. Молочнокислая микрофлора в накопительной культуре отличалась большим разнообразием, особен-



Таблица

Коллекция изолятов молочнокислых бактерий виноделия

| Номер в коллекции | Морфология клеток | Морфология колоний | Образование газа из глюкозы | Устойчивость к спирту | Происхождение |
|-------------------|--|---|-----------------------------|-----------------------|--|
| П-17 | тонкие мелкие палочки, единичные, в парах и коротких цепочках | мелкие, выпуклые, сферические колонии, ровный край, прозрачные, маслянистые | – | до 12 % об. | виноматериал на дображивании ООО «Агрофирма «Золотая Балка» |
| П-18 | палочки тонкие, короткие, в парах и длинных нитевидных цепочках | мелкие, выпуклые, сферические колонии, ровный край, прозрачные, маслянистые | + | до 10 % об. | Виноматериал на хранении (Мускат, ГП «Ливадия») |
| П-22 | средние, короткие палочки, единичные, в парах и коротких цепочках | мелкие, пологие, сферические колонии, ровный край, блестящие, пастообразные | + | до 10 % об. | виноматериал на дображивании, ООО «Агрофирма «Золотая Балка» |
| П-27 | крупные палочки, образуют нитеобразные цепочки | мелкие, пологие, сферические колонии, ровный край, блестящие, пастообразные | + | до 10 % об. | Каберне, виноматериал на хранении, ГП «Гузуф» |
| П-28 | тонкие длинные палочки, единичные и в парах, образуют нитевидные цепочки | колонии мелкие, слабо выпуклые, сферические, блестящие, маслянистые | – | до 14 % об. | виноматериал Меганом белый, ЧАО «Солнечная Долина» |
| П-29 | короткие палочки, единичные, в парах и коротких цепочках | мелкие, пологие, сферические колонии, ровный край, блестящие, пастообразные | + | до 10 % об. | мезга Меганом белый, ЧАО «Солнечная Долина» |
| К-12-2 | очень мелкие бактерии, типа <i>Leuconostoc</i> , одиночные, в парах и цепочках | точечные, блестящие, выпуклые, сферические с ровным краем. | + | до 14 % об. | шампанский виноматериал, ООО «Агрофирма «Золотая Балка» |
| К-13-2 | очень мелкие бактерии, типа <i>Leuconostoc</i> , одиночные, в парах и цепочках | точечные, блестящие, выпуклые, сферические с ровным краем. | + | до 14 % об. | виноград, ГП «Ливадия» |
| К-15 | Мелкие кокки, в парах и коротких цепочках | мелкие, блестящие, прозрачные, сферические, выпуклые | + | до 10 % об. | шампанский виноматериал, ООО «Агрофирма «Золотая Балка» |
| К-16 | Крупные кокки, одиночные, в парах и цепочках | мелкие, блестящие, прозрачные, сферические, выпуклые | + | до 10 % об. | виноматериал Каберне, ЧАО «Солнечная Долина» |
| К-26 | очень мелкие кокки, в основном единичные и в парах, встречаются короткие цепочки | мелкие, блестящие, прозрачные, сферические, выпуклые | + | до 10 % об. | шампанский виноматериал, ООО «Агрофирма «Золотая Балка» |
| К-36 | очень мелкие кокки, в основном единичные и в парах, в коротких цепочках | точечные колонии, прозрачные, мелкие, сферические с ровным краем | + | до 10 % об. | виноматериал Меганом белый, ЧАО «Солнечная Долина» |

но это касается виноматериалов с высокими значениями pH.

Анализ морфологических особенностей МКБ позволил выделить несколько групп (табл.). При культивировании на жидкой питательной среде – МКБ палочковидной и кокковой формы, одиночные, в парах и цепочках разной длины. Обычно обнаруживался рост палочек различной морфологии – коротких толстых, длинных тонких, мелких яйцевидных; практически всегда присутствовали кокки. При культивировании отдельные представители имели тенденцию к образованию хлопьевидных скоплений. Обнаруженные МКБ относятся к родам *Leuconostoc* и *Lactobacillus*. Отсутствие представителей рода *Pediococcus* подтверждает сведения о том, что данная группа МКБ встречается довольно редко и в основном присутствует в больных винах [1, 3]. Морфология колоний не отличалась разнообразием – это мелкие (до 1 мм) и точечные колонии, блестящие, прозрачные, круглые с ровным краем, выпуклые; консистенция – маслянистая или пастообразная, часто без видимого поверхностного роста.

Сформированная коллекция содержит 12 фертильных линий изолятов МКБ, что подтверждает многочисленные данные о сложности сохранения МКБ в культуре [2, 4]. Исследования по данной проблеме показывают, что результаты во многом зависят от правильного выбора культуральной среды, физиологического состояния бактерий и применяемого способа их идентификации. Однако, одна из проблем,

возникающая при выделении МКБ из вина, вызвана тем, что сублетарно поврежденные бактерии не размножаются на селективных средах и поэтому не обнаруживаются. Более того, в вине могут присутствовать так называемые VBNC-бактерии (*viable but non-culturable*, «жизнеспособные, но не культивируемые»), то есть некоторые бактерии порчи могут оказаться вообще некультивируемыми. Известно, что такие бактерии остаются метаболически активными и жизнеспособными (обуславливая органолептические дефекты продуктов), но они не образуют колоний на обычных для них питательных средах. VBNC-состояние могут вызывать различные стрессовые факторы – недостаток питательных веществ, низкая температура, диоксид серы и др. [4, 5]. Такие клетки, тем не менее, способны вернуться к своему обычному состоянию [6].

Исследования показали, что по морфологической картине обнаруженных молочнокислых бактерий можно предварительно судить об их способности к культивированию. Ни один из выделенных изолятов МКБ, обладающих способностью к образованию хлопьевидных скоплений и утрачивающих при длительном культивировании четкие морфологические признаки, не был сохранен в коллекции.

Анализ полученных результатов говорит о разнообразии морфологических свойств клеток, однако следует отметить, что в основном выделенные культуры имеют чрезвычайно малые размеры. Отмечается зависимость морфологии клеток от среды

культивирования. Так, палочки были выделены в основном из виноматериалов на хранении и вин, в которых наблюдали помутнение, вызванное МКБ. Кокки были выделены из виноматериалов на дображивании.

Для более детального изучения 12 фертильных линий МКБ были изучены их физиолого-биохимические свойства (табл.). Все коллекционные изоляты МКБ катализаторно-негативны, растут при 15°C и не дают роста при 45°C, положительно окрашиваются по Грамму. В основном все штаммы МКБ – гетероферментативные бактерии и только П-17 и П-28 – гомотерментативные. Эти же культуры оказались более устойчивыми к спирту, сохраняя способность к росту при 12% об. и 14% об. спирта соответственно. Данное свойство предварительно позволяет, как отмечает Е.И. Квасников в своих работах [2, 7], характеризовать данные штаммы как обладающие высокой энергией кислотообразования.

Технологическая оценка 12 выделенных штаммов МКБ указывает на преобладание гетероферментативных палочек в микрофлоре проанализированных вин, которые существенно разнятся между собой по морфологии. Во то же время наличие гомотерментативных палочек и гетероферментативных кокков рода *Leuconostoc* свидетельствует о потенциальной возможности проведения биологического кислотопонижения виноматериалов и создания условий для регулирования их кислотности. Гетероферментативные палочки (П-18 и П-27) технологически самые нежелательные виды.



Выделенные из больных вин, они могут иметь высокую сопротивляемость к спирту и кислотности, обладать способностью утилизировать пентозы.

Данные, полученные в результате работы по изучению экологии молочнокислых бактерий АР Крым, позволили на данном этапе сформировать рабочий музей изолятов МКБ, рекомендовать некоторые методологические подходы по выделению МКБ в чистую линию, изучить их морфологические и физиолого-биохимические особенности. Дальнейшее изучение метаболизма гомо- и гетероферментативных палочек и кокков будет направлено на исследование

влияния молочнокислых бактерий на качество готовой винопродукции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рибера-Гайон Ж., Пейно Э., Рибера-Гайон П., Сюдро П. Теория и практика виноделия. - М.: Пищевая промышленность. - 1979. - Т.2. - 352 с.
2. Е.И.Квасников, О.А. Нестеренко Молочнокислые бактерии и пути их использования. - М.: Наука. 1975. - С. 32, 92, 95, 100, 164.
3. В.А.Горина. Проблемные вопросы биологии молочнокислых бактерий вина. - Симферополь: Таврия плюс. - 2000. - 104 с.
4. Клив де Блэкберн Микробиологическая порча пищевых продуктов. - С.-Петербург: Профессия,

2008. - 781 с.

5. Fleet, G.H. Microorganisms in food ecosystems// Int. J. Food Microbiol., - 1999. № 50. - P.101-117.

6. Millet, V., Lonvaud-Funel, A. The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage// Lett.Appl.Microbiol., - 2000. - №30. - P.136-141.

7. Е.И. Квасников Биология молочнокислых бактерий // Автореф. дис. - М. -1960. - 40 с.

Поступила 03.04.2013

© Т.Н.Танашук, 2013

© В.А.Загоруйко, 2013

© В.А.Щербина, 2013

© Г.М.Ананченкова, 2013

© О.Е.Кухаренко, 2013