

МИКРОФЛОРА КОНСЕРВИРОВАННОЙ РАСТИТЕЛЬНОЙ ПРОДУКЦИИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НАСЫЩЕННОГО РАССОЛА В КАЧЕСТВЕ КОНСЕРВАНТА

С помощью прямой микроскопии и метода культивирования были изучены численность и биологическое разнообразие микроорганизмов в двух образцах папоротника *Pteridium aquilinum*, консервированного с помощью насыщенного раствора соли. Первый образец хранился 3 месяца после засола, второй – 15 месяцев после засола. В обоих образцах не обнаружено мицелиальных грибов, дрожжей и спорообразующих бактерий. Общее число аэробных и факультативно анаэробных бактерий, способных к росту на питательном агаре (пептон – 9,0 г/л, гидролизат казеина – 8,0 г/л, дрожжевой экстракт – 3,0 г/л, NaCl – 5,0 г/л, Na₂HPO₄ – 2,0 г/л, pH 7,2 ± 0,2), составило 4400 ± 937 КОЕ мл⁻¹ в первом образце и 4950 ± 992 КОЕ мл⁻¹ во втором образце. Общее число бактериальных клеток, подсчитанных с помощью фазово-контрастной микроскопии, составило соответственно 2,556 ± 0,385 миллионов и 0,878 ± 273 миллиона на 1 мл. Бактериальные клетки – палочковидные, подвижные и неподвижные. Культивирование в среде с высокой концентрацией соли показало, что данные бактерии способны расти аэробно в присутствии 15–36 % NaCl с оптимумом в районе 20–25 % NaCl, и с оптимальной температурой роста +37 °C или выше. Всё это позволяет идентифицировать данных бактерий как экстремально галофильных археев, принадлежащих к семейству *Halobacteriaceae* (домен Archaea, царство *Euryarchaeota*, тип *Euryarchaeota*, класс *Halobacteria*, порядок *Halobacterales*). Все галобактерии в образцах находятся в рассоле, в то время как ткани папоротника остаются стерильными.

Ключевые слова: консервирование, засолка, галофильные археи, *Halobacteriaceae*.

S.V. Khizhnyak, G.A. Demidenko, E.Y. Muchkina

MICROFLORA OF CANNED VEGETABLES WHEN USING SATURATED SALT BRINE AS A PRESERVATIVE

The number and biological diversity of microorganisms in two samples of preserved using saturated salt brine fern *Pteridium aquilinum* was studied by direct microscopy and cultivation method. The first sample was stored for 3 months and the second sample was stored for 15 months after salting. No filamentous fungi, yeasts and spore forming bacteria were found in both samples. Total number of aerobic and facultative anaerobic bacteria able to grow on nutrition agar (peptone – 9,0 g/L, casein hydrolysate – 8,0 g/L, yeast extract – 3,0 g/L, NaCl – 5,0 g/L, Na₂HPO₄ – 2,0 g/L, pH 7,2±0,2) was 4400 ± 937 CFU ml⁻¹ in the first sample and 4950 ± 992 CFU ml⁻¹ in the second sample. The total number of bacterial cells counted using phase-contrast microscopy was 2,556 ± 0,385 millions and 0,878 ± 273 millions per ml, respectively. The bacterial cells are rod-shaped, motile or non-motile. Cultivation in the culture media containing high salt concentration showed that these bacteria are able to grow aerobically at 15–36 % NaCl with the optimal concentration in between 20–25 % NaCl, and with the optimal growth temperature +37 °C or higher. All these facts allow us to identify these bacteria as extremely halophilic archaea belonging to the family *Halobacteriaceae* (domain Archaea, kingdom *Euryarchaeota*, phylum *Euryarchaeota*, class *Halobacteria*, order *Halobacterales*). All the halobacteria in the samples are localized in the brine , whereas tissues of fern remain sterile.

Key words: preservation, salting, halophilic archaea, *Halobacteriaceae*.

Введение. Несмотря на развитие разнообразных технологий консервирования, засолка остаётся одним из распространённых способов сохранения пищевых продуктов во всём мире [4]. Метод основан главным образом на создании осмотического стресса за счёт снижения водного потенциала, что предотвращает развитие сапротрофных микроорганизмов, вызывающих порчу продукта при хранении [1]. Кроме этого, соль может снижать растворимость кислорода, взаимодействовать с клеточными ферментами, а также вынуждать микробные клетки расходовать дополнительную энергию на вывод ионов натрия, что также способствует снижению скорости роста микроорганизмов в солёной продукции [6]. Тем не менее, при длительном хранении солений в них наблюдается

развитие галофильных и галотолерантных бактерий и микроскопических грибов, вызывающих помутнение рассола, изменение цвета, снижение вкусовых качеств продукта, уменьшение содержания биологически ценных веществ [2].

Цель исследования: изучение микрофлоры растительной продукции, консервированной с использованием насыщенного раствора поваренной соли на примере папоротника-орляка *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования были образцы папоротника-орляка солёного производства ООО «Курагинский промхоз». Данное предприятие осуществляет промышленные заготовки папоротника в Курагинском и Карагузском районах для последующей реализации на территории Российской Федерации и экспорта в Японию и Китай. Особенностью технологии консервирования является использование насыщенных солевых растворов, что достигается наличием в готовой продукции некоторого количества нерастворившейся соли в рассоле. В исследованиях использовали два образца продукции – свежий образец (заготовка в мае-июне 2015 г., хранение после засолки – 3 месяца) и прошлогодний образец (заготовка в мае-июне 2014 г., хранение после засолки – 15 месяцев). В прошлогоднем образце наблюдалось ухудшение органолептических показателей в сравнении со свежим – размягчение стеблей и изменение их цвета с зелёного на бурый.

Общую численность и морфологическое разнообразие микроорганизмов в рассоле, в гомогенате стеблей папоротника и в жидких средах определяли прямым счётом с использованием фазово-контрастной микроскопии. Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) определяли высеиванием на ПД-агар (пептон ферментативный, сухой для бактериологических целей – 9,0 г/л; гидролизат казеина ферментативный, неглубокой степени расщепления – 8,0; дрожжевой экстракт – 3,0; хлорид натрия – 5,0; натрий гидроортогофосфат – 2,0; агар микробиологический – 10,5 г/л, pH 7,2±0,2) производства ОАО «Биомед» им. И.И. Мечникова, в соответствии с ГОСТ 10444.15-94 «Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов». Скорость роста микроорганизмов рассола при разной концентрации NaCl определяли по числу клеток в микроколониях на агаровых слайдах и по числу клеток в жидкой среде после инкубирования при температурах +28 и +37 °C в течение 14–48 ч в зависимости от варианта эксперимента. Для агаровых слайдов использовали ПД-агар с добавлением соответствующего количества NaCl, в качестве жидкой среды использовали среду того же состава без агара. Время генерации определяли как $t/\log_2(N)$, где t – время инкубирования, N – число клеток в микроколониях (в случае высеива рассола на агаровые слайды) или отношение численности клеток в среде после инкубирования к стартовой численности клеток (в случае использования жидких сред).

Результаты исследования и их обсуждение. Результаты прямых микроскопических исследований образцов и анализа КМАФАнМ суммированы в таблице 1.

Таблица 1

**Результаты микроскопических исследований и анализа КМАФАнМ
образцов папоротника солёного**

Показатель	Свежий		Прошлогодний	
	рассол	гомогенат стеблей	рассол	гомогенат стеблей
Общая численность бактерий, тыс. клеток на 1 см ³	2556,2±385,5	Не выявлены	878,7±273,4	Не выявлены
Бактериальные споры и спорообразующие бактерии	Не выявлены	Не выявлены	Не выявлены	Не выявлены
Мицелиальные грибы	Не выявлены	Не выявлены	Не выявлены	Не выявлены
Одноклеточные грибы	Не выявлены	Не выявлены	Не выявлены	Не выявлены
КМАФАнМ, тыс. КОЕ на 1 см ³	4,400±0,937	Не выявлены	4,950±0,992	Не выявлены

Как видно из представленных данных, несмотря на достаточно высокую общую численность бактерий в рассоле ($2556 \cdot 10^3$ клеток на 1 см³ для свежего образца, и $879 \cdot 10^3$ клеток на 1 см³ для

прошлогоднего образца), микроорганизмы, традиционно вызывающие порчу консервированной растительной продукции (мицелиальные грибы и дрожжи), в исследуемых образцах не выявлены. КМАФАнМ рассола ($4,40\text{--}4,95 \cdot 10^3$ КОЕ на 1 см³) на 1-2 порядка ниже допускаемых СанПиН 2.3.2.1078-01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов» значений для растительной продукции ($10^4\text{--}10^5$ КОЕ/г в зависимости от вида продукции и способа употребления). Ткани папоротника в обоих образцах оказались практически стерильными, микроорганизмы в тканях не выявлены ни высеиванием, ни прямой микроскопией.

Бактерии, присутствующие в растворе, представлены подвижными галофильными палочками не менее чем двух морфологических типов (рис. 1).



Рис. 1. Галофильные бактерии, выделенные из рассола (микроколонии на агаровых слайдах в присутствии 15 % NaCl, фазовый контраст, масляная иммерсия)

Данные бактерии способны расти в диапазоне концентраций NaCl в среде от 15 до 36 %, при этом оптимальная для роста концентрация NaCl, очевидно, лежит несколько ниже 25 %, а оптимальная температура соответствует мезофильным микроорганизмам (рис. 2, табл. 2). Анализ роста при различных концентрациях NaCl в сочетании с температурными характеристиками позволяет идентифицировать данные микроорганизмы как представителей семейства *Halobacteriaceae* Gibbons 1974, относящегося к домену Archaea (Археи), царство Euryarchaeota, тип Euryarchaeota, класс Halobacteria, порядок Halobacterales. Ранее археи относили к бактериям из-за прокариотического строения клетки, однако, начиная с 90-х годов XX века, домен Археи, наряду с доменами Бактерии (Bacteria) и Эукариоты (Eukarya), рассматривается как одна из трёх главных эволюционных ветвей живых организмов [7].

Семейство *Halobacteriaceae* объединяет экстремально галофильных археи, способных к росту при концентрации соли 20–36 % и обитающих в солёных и гиперсолёных водоёмах [5]. Наиболее вероятный путь попадания данных археи в солёную продукцию – соль, используемая при приготовлении рассолов. Представителей *Halobacteriaceae* нередко выделяют из солевых отложений, причём есть данные, что они способны сохраняться в каменной соли до 200 млн лет [3].

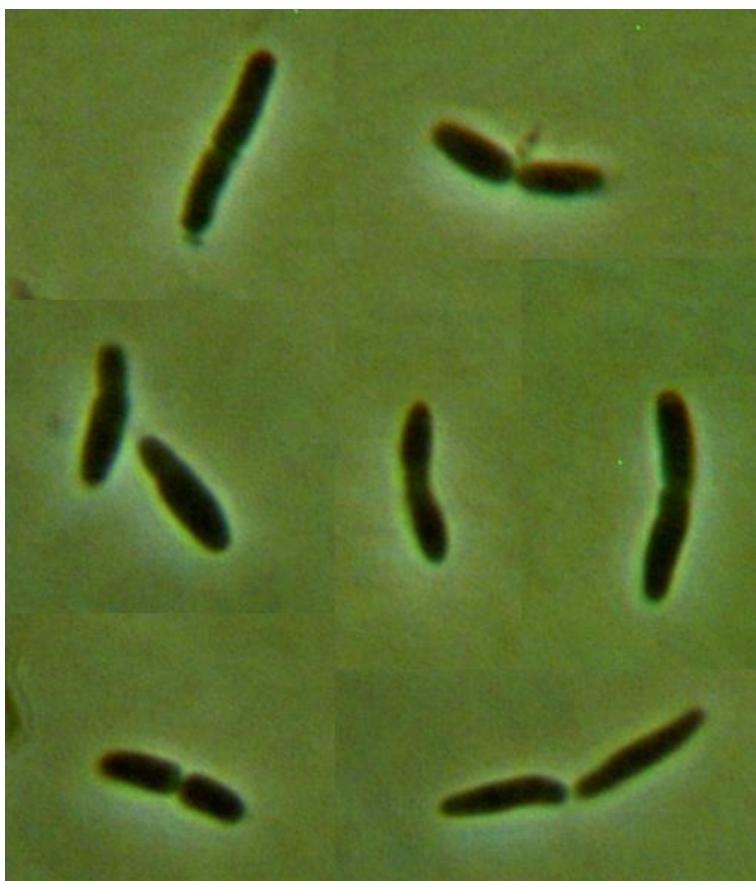


Рис. 2. Рост микроорганизмов рассола в жидкой среде при концентрации NaCl 36 %
(фазовый контраст, масляная иммерсия)

Таблица 2
Влияние температуры и концентрации NaCl на рост бактерий, выделенных из рассола (приведены усреднённые значения)

Показатель	Время генерации, ч
При +28 °C (15 % NaCl , агаризованная среда)	4,3
При +37 °C (15 % NaCl , агаризованная среда)	2,2
При +37 °C (25 % NaCl , жидкая среда)	5,5
При +37 °C (30 % NaCl , жидкая среда)	16,3
При +37 °C (36 % NaCl , жидкая среда)	57,0

Таким образом, можно констатировать, что использование насыщенных солевых растворов при консервировании растительной продукции делает её безопасной в микробиологическом плане и полностью предотвращает развитие мицелиальных и одноклеточных микроскопических грибов. Однако даже максимально высокая концентрация соли не препятствует развитию в продукции экстремально галофильных архей, численность которых через 3 месяца после засолки может достигать свыше $2 \cdot 10^6$ клеток на 1 см³ рассола. При этом в случае хранения солёной продукции в тёплом помещении галофильные археи в течение суток могут давать до шести генераций, что соответствует увеличению их численности в 64 раза каждые 24 ч. В этой связи для улучшения сохранности солёной продукции можно рекомендовать хранение при температурах ниже минимальной температуры роста мезофильных микроорганизмов (+8...+10 °C) либо применение дополнительных консервантов, эффективных против *Halobacteriaceae*.

Выводы

1. Использование насыщенного раствора поваренной соли при консервировании растительной продукции полностью предотвращает развитие мицелиальных и одноклеточных грибов, а также мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, нормируемых СанПиН 2.3.2.1078-01.

2. Микрофлора продукции, консервированной с использованием насыщенного рассола, представлена экстремально галофильными археями семейства *Halobacteriaceae*. Через три месяца после засолки численность архей в рассоле достигает $2,556 \cdot 10^6$ клеток на 1 см³, через 15 месяцев после консервирования снижается до $0,879 \cdot 10^6$ клеток на 1 см³.

3. Наиболее эффективным способом предотвращения развития галофильных архей является хранение продукции при температуре +8...+10 °C. В качестве альтернативы пониженной температуре можно рекомендовать поиск безопасных для здоровья человека антимикробных средств, избирательно подавляющих развитие архей.

Литература

1. *Davidson P.M., Taylor T.M., Schmidt S.E.* Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds // Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, 4th Edition. – American Society for Microbiology, Washington, DC., 2012. – P. 765–801.
2. *Doan T., Babu D., Buescher R.* Inhibition of Yeast in Commercial Pickle Brines // Journal of Food Research. – 2012. – Vol. 1, № 3. – P. 295–301.
3. *Fredrickson J.K., Chandler D.P., Onstott T.C.* Potential for preservation of Halobacteria and their macromolecular constituents in brine inclusions from bedded salt deposits // Proc SPIE. – 1997. – № 3111. – P. 318–329.
4. *Henney J.E, Taylor C.L, Boon C.S.* Strategies to Reduce Sodium Intake in the United States. – Washington, DC: National Academies Press, 2010. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK50956>.
5. *Oren A.* Life at High Salt Concentrations // Prokaryotes. – 2006. – № 2. – P. 263–282.
6. *Shelef L.A., Seiter J.* Indirect and miscellaneous antimicrobials // Antimicrobials in food. 3rd ed. – Boca Raton, FL: Taylor and Francis, 2005. – P. 573–598.
7. *Woese C.R., Kandler O., Wheelis M.L., Kandler, Wheelis.* Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1990. – Vol. 87, № 12. – P. 4576–4579.

Litetatura

1. *Davidson P.M., Taylor T.M., Schmidt S.E.* Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds // Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, 4th Edition. – American Society for Microbiology, Washington, DC., 2012. – P. 765–801.
2. *Doan T., Babu D., Buescher R.* Inhibition of Yeast in Commercial Pickle Brines // Journal of Food Research. – 2012. – Vol. 1. – № 3. – P. 295–301.
3. *Fredrickson J.K., Chandler D.P., Onstott T.C.* Potential for preservation of Halobacteria and their macromolecular constituents in brine inclusions from bedded salt deposits // Proc. SPIE. – 1997. – № 3111. – P. 318–329.
4. *Henney J.E, Taylor C.L, Boon C.S.* Strategies to Reduce Sodium Intake in the United States. – Washington, DC: National Academies Press, 2010. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK50956>.
5. *Oren A.* Life at High Salt Concentrations // Prokaryotes. – 2006. – № 2. – P. 263–282.