



**Universitatea Tehnică a Moldovei**

**Izolarea și caracterizarea speciilor potential  
implicate în producerea oțetului din produse  
vitivinicole**

**Student:**

**Națibulina Maria**

**Conducător:**

**Dr.conf.univ. Chirsanova Aurica**

**Chișinău 2019**

## АННОТАЦИЯ

Исследование посвящено вопросу выделения уксуснокислых бактерий. Целью работы было изолировать уксуснокислые бактерии, провести всевозможные исследования касательно питательных сред для их культивирования, анализировать их способность окислять субстраты, содержащие алкоголь, до уксусной кислоты, а также привести доказательства принадлежности выделенных микроорганизмов к уксуснокислым бактериям. Проанализированы возможные источники уксуснокислых бактерий, лучшими из которых признаны окисленное белое вино и уксус произведенный в лабораторных условиях. В результате изолирования получены три штамма чистых уксуснокислых бактерий. По итогу анализа эффективности питательных сред наиболее эффективными признаны среды RAE и GYC. При прохождении тестов на идентификацию бактерий, доказана принадлежность двух изолированных штаммов к роду *Acetobacter*.

## REZUMAT

Studiul este dedicat selecției bacteriilor acetice. Scopul lucrării a fost de a izola bacteriile acetice, de a efectua tot felul de studii privind mediile de cultură pentru cultivarea lor, de a analiza capacitatea lor de oxidare a substraturilor care conțin alcool la acid acetic și de a furniza dovezi ale apartenenței microorganismelor selectate la bacterii acetice. Sunt analizate posibilele surse de bacterii acetice, dintre care cele mai bune sunt vinul alb oxidat și oțetul produs în condiții de laborator. Ca urmare a izolării, au fost obținute trei tulpini pure de bacterii acetice. Conform rezultatelor analizei eficienței mediilor nutritive, RAE și GYC sunt recunoscute ca fiind cele mai eficiente. La trecerea testelor pentru identificarea bacteriilor, se dovedește apartenența a două tulpini izolate la genul *Acetobacter*.

## SUMMARY

The study is dedicated to the selection of acetic acid bacteria. The aim of the work was to isolate acetic acid bacteria, to conduct all kinds of studies regarding culture media for its cultivation, to analyze its ability to oxidize substrates containing alcohol to acetic acid, and also provide evidence of the belonging of the selected microorganisms to acetic acid bacteria. Possible sources of acetic acid bacteria are analyzed, the best of which are oxidized white wine and vinegar produced in laboratory conditions. As a result of isolation, three strains of pure acetic acid bacteria were obtained. According to the results of the analysis of the efficiency of nutrient media, RAE and GYC are recognized as the

most effective. When passing tests for identification of bacteria, the affiliation of two isolated strains to the genus *Acetobacter* is proven.

## СОДЕРЖАНИЕ

АННОТАЦИЯ	7
ВВЕДЕНИЕ	10
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	11
1.1 Состав естественной микрофлоры винограда и виноградного сока	11
1.2 Микрофлора виноградного суслу	12
1.3 Микрофлора вина. Уксуснокислосое брожение вина	13
1.4 Особенности жизнедеятельности уксуснокислых бактерий в вине и виноматериалах	15
1.5 Характеристика уксуснокислых бактерий	17
1.5.1 Классификация уксуснокислых бактерий	17
1.5.2 Морфология и физиология уксуснокислых бактерий	18
1.5.3 Размножение уксуснокислых бактерий	19
1.5.4 Рост и развитие уксуснокислых бактерий	20
1.5.5 Метаболизм уксуснокислых бактерий	23
1.5.6 Факторы, влияющие на рост и развитие уксуснокислых бактерий	23
1.5.7 Уксуснокислые бактерии в производстве	26
1.5.8 Свойства уксуснокислых бактерий	26
1.6 Изолирование чистых культур уксуснокислых бактерий	28
Предварительные выводы	28
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	32
2.1 Материалы	32
2.2 Методы	35
2.2.1 Метод определения кислотности вина. Метод потенциометрического титрования	38
2.2.2 Определение массовой концентрации органических кислот в уксусе в пересчете на уксусную кислоту	39
2.2.3 Определение объемной доли остаточного (неокисленного) спирта в уксусе	39
2.2.4 Определение содержания спирта и сахара в вине	41
2.2.5 Определение плотности в вине, винопродукции и уксусе	42
2.2.6 Метод определения pH вина и уксуса при помощи pH-метра	42

2.2.7	Метод глубинного посева микроорганизмов на твердую питательную среду	43
2.2.8	Метод посева на поверхность агаризированной среды штрихом, зигзагом, полигоном	43
2.2.9	Метод посева на поверхность агаризированной среды культуры, разведенной в стерильной воде	44
2.2.10	Приготовление препаратов микроорганизмов и их микроскопическое исследование	44
2.2.11	Простой метод окраски микроорганизмов	45
2.2.12	Сложные методы окраски. Окраска по Граму	45
2.2.13	Метод изучения физиологических свойств уксуснокислых бактерий. Тест на каталазу	46
2.2.14	Метод изучения физиологических свойств уксуснокислых бактерий. Тест на гидроокись калия	47
3.	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	48
3.1	Исследование микрофлоры материалов на наличие уксуснокислой бактерии	48
3.2	Изолирование уксуснокислых бактерий	56
3.3	Исследование наиболее подходящих сред для культивирования и выделения уксуснокислых бактерий	60
3.4	Изучение способности изолированных бактерий окислять этиловый спирт до уксусной кислоты. Исследование возможных субстратов для культивирования уксуснокислых бактерий.	69
3.5	Идентификация и выявление свойств уксуснокислых бактерий	72
	Выводы	73
	Библиография	75

## БИБЛИОГРАФИЯ

1. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, ninth edition, The Williams & Wilkins Co., Baltimore (1994)
2. BOGDAN NINA Teză de doctor în științe biologice Valorificarea tulpinilor microbiene izolate din lapte de capră pentru aplicare industrial, Chișinău, 2019
3. Catalogue of Bacteria and Bacteriophages, 1992, 18th Ed., American Type Culture Collection, Rockville, MD.
4. FRANCESCO SPAGNOLLI Nota sul controllo microbiologico dei vini //Rivista di Viticoltura e di Enologia – 1975. - №1.
5. FRATEUR, J. "Essai sur la systematique des acetobacters." Cellule (1950)
6. JOAO NUNO SERODIO DE MELO. Microbiology of Vinegar: from isolation, phenetic characterization and detection of acetic Bacteria to Microbial profiling of an industrial production. 2016
7. LAFON-LAFOURCADE S. RIBEREAU-GAYON P. Developments in the microbiology of wine production // Progress in Industrial Microbiology. – 1984.
8. S.RUBȚOV, E.RUDENCO, L.SANDULACHI Microbiologia generală. Îndrumar de laborator/ UTM 2006
9. SM 84:2015 Struguri proaspeți destinați prelucrării industriale. Condiții tehnice.
10. VALENTINA CALMĂȘ Îndrumările metodice pentru lucrări de laborator la disciplina *Microbiologia, sanitaria și igiena mărfurilor*. Editura IULIAN, Chișinău, 2014.
11. VANDERZANT C., SPLITTSTOESSER D. F., (Eds.), 1992, Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 3rd Ed., APHA, Washington, D. C.
12. CALCATINIUC, Dumitru; GRIȚCO, Cătălina; CHIRSANOVA, Aurica; BOIȘTEAN, Alina. The impact of organic food on the moldavan market. In: *Microbial Biotechnology*. Ediția 4, 11-12 octombrie 2018, Chișinău. Chișinău, Republica Moldova: Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, 2018, p. 76. ISBN 978-9975-3178-8-7.  
[https://ibn.idsi.md/vizualizare\\_articol/72333](https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/72333)
13. Chirsanova Aurica, Reșitca Vladislav. Factori de bază ce influențează politicile alimentare și nutriționale la nivel internațional. Meridian ingineresc. Univestitatea Tehnică a Moldovei. Nr.3, 2013, ISSN 1683-853X. p.86-92. [https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare\\_articol/27531](https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/27531)

14. GÎNCU, Ecaterina; CHIRSANOVA, Aurica; POPA, Irina; CALCATINIUC, Dumitru. Proprietățile fizico-chimice a făinii de topinambur (*helianthus tuberosus*). Conferința tehnico-științifică a colaboratorilor, doctoranzilor și studenților 2016. P. 440-443.  
<http://repository.utm.md/handle/5014/1601>
15. Chirsanova, Aurica. Analiza senzorială a produselor lactate : Ciclu de prelegeri, Univ. Tehn. a Moldovei, Fac. Tehnol. și Manag. în Industria Alimentară, Cat. Tehnol. și Organiz. Alimentației Publice.- Ch.: U.T.M., 2009.
16. Chirsanova, Aurica, Vladislav Reșitca, Alina Boiștean, and Boaghi Eugenia Covaliov. "Influența condițiilor de păstrare asupra conținutului unor micotoxine în nuci." *Meridian Ingineresc* 3 (2013): 63-75.
17. Boiștean Alina, Chirsanova Aurica, POSSIBILITIES OF USING SOY PROTEINE ISOLATE FOR THE PACKAGING OF JUGLANS REGIA L. NUTS International Scientific Conference on Microbial Biotechnologi 4th edition, Chisinau, Moldova, October 11-12, 2018 ,p.75, ISBN 978-9975-3178-8-7
18. Boiștean Alina, Chirsanova Aurica, Ciumac Jorj, The particularities of the clarification process with bentonite of the wine vinegar. The 9th international symposium. 5-6 september 2019, Galati, România, p. 60, ISSN 1843-5114.
19. Боиштян Алина,. Кирсанова Аурика. Влияние озонирования и технологических обработок на количество остаточных пестицидов в овощах. the 8th International Specialized Scientific and Practical Conference September 12, 2019 Kyiv, Ukraine , p.68, ISBN 978-966-612-227-1
20. Boiștean Alina, Chirsanova Aurica, Națibulina Maria. Influence of the edible coatings viscosity on organoleptic characteristics of walnut kernels. International Conference Modern Technologies in the Food Industry, Chisinau, Moldova, October 18-20, 2018, ISBN 978-9975-87-428-1 [https://ibn.idsi.md/sites/default/files/imag\\_file/113-114\\_5.pdf](https://ibn.idsi.md/sites/default/files/imag_file/113-114_5.pdf)
21. BOIȘTEAN Alina, CHIRSANOVA Aurica, Possibilities of using soy proteine isolate for the packaging of juglans regia l. nuts International Scientific Conference on Microbial Biotechnologi 4th edition, Chisinau, Moldova, October 11-12, 2018, ISBN 978-9975-3178-8-7
22. Chirsanova Aurica, Reșitca Vladislav - Influence du teneur du calcium sur les proprietes de texture de fromage. International Conference Modern Technologies in the Industry-2016”, (MTFI-2016), ISBN 978-9975-80-645-9, p.211-216.

23. Gîncu Ecaterina, Chirsanova Aurica. Determinarea proprietăților fizico-chimică ale făinii de topinambur (*Helianthus Tuberosus*). Conferința "25 de ani de reformă economică în Republica Moldova: prin inovare și competitivitate spre progres economic" Chișinău, Moldova, 23-24 septembrie 2016. Pag. 323-326
24. Gheorghîța D., Martiney-Alonso S., CHIRSANOVA A. Substitution de la matière grasse dans un fromage crème au chocolat. Proceedings of the International Conference MODERN TRECHNOLOGIES, IN THE FOOD INDUSTRY- 2016, 20-22 October, 2016. p. 406-411
25. Micleușanu Sanda, Croguennec Thomas., CHIRSANOVA Aurica. L'imagerie de la micelle de caséine par microscopie à force atomique. Proceedings of the International Conference MODERN TRECHNOLOGIES, IN THE FOOD INDUSTRY- 2016, 20-22 October, 2016. p. 418-423
26. Ciумac, Jorj; Reșitca, Vladislav; Chirsanova, Aurica; Capcanari, Tatiana; Boaghi. Eugenia. Общая технология пищевых производств. Chișinău, Editura „Tehnică – UTM”, 2019. – 435p. ISBN 978-9975-45-582-4. CZU 663/664(075.8), O-280. Coli de tipar 54,5.
27. Chirsanova, Aurica ; Capcanari, Tatiana. Prelucrarea sanitară în cadrul unităților de alimentație publică. INSTRUCȚIUNI. Chișinău, Editura „Tehnică – UTM”, 2018. – 33p. ISBN 978-9975-45-559-6. CZU 613.6:663/664(083.13), C 45. Coli de tipar 4.125.
28. Ciумac, Jorj; Reșitca, Vladislav; Chirsanova, Aurica; Capcanari, Tatiana; Boaghi, Eugenia. Tehnologia generală a produselor alimentare. Îndrumar metodic pentru efectuarea lucrărilor de laborator. Chișinău, Editura „Tehnică – UTM”, 2019. – 147 p. ISBN 978-9975-45-586-2. CZU 663/664.0(076.5), T 32. Coli de tipar 9,18.
29. Paladi, Daniela; Chirsanova, Aurica; Mija, Nina; Capcanari, Tatiana. Toxicologie și securitate alimentară. Îndrumar metodic pentru îndeplinirea lucrărilor de laborator. CHIȘINĂU: Editura „Tehnică – UTM”, 2017. - 45 p. Coli de tipar 2,8.
30. Popovici, Cristina ; Deseatnicova, Olga ; Chirsanova, Aurica. Tehnologia produselor alimentației publice : Culegere de fișe tehnologice / red. resp.: Cristina Popovici ; Univ. Teh.a Mold., Fac. Tehnol. Alimentelor, Dep. Alimentație și Nutriție. – Ch.: Tehnica – UTM, 2017.– 88 p.
31. Попович, К. Десятникова, О. И., Кирсанова А. И. Технология производства продукции общественного питания : Сб. технол. карт /отв. ред.: К. М. Попович ; Техн. Унив. Молдовы, Фак. Пищевых Технологий, Деп. Продовольствия и Питания – Ch.: Tehnica – UTM, 2017. – 91 p.



32. CHIORU Ana, PANAINTE Cristina, Irina POPA, Iana ȚISLINSKAIA, Aurica CHIRSANOVA. Bunele practici de instruire online. Enseignement mixte: motivation, attentes et perceptions des étudiants (temoignage). Conferința internațională CRUNT 2014. 24-27 septembrie 2014.
33. Gore E, Chirsanova A. La géosmine- molécule responsable du goût moisi-terreux des vins. Conferința tehnico-științifică a doctoranzilor, cercetătorilor și studenților. UTM, Chișinău. Volumul II. 2016, p.57.
34. Usafii Agafia, Molodoi Elena, Moldoveanu Tamara, Topală Lilia, Calcatiniuc Aurica, Screeningul drojdiilor de perspectivă pentru biotehnologii de producere a sterolilor. Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții. Nr.3. 2007. p.106-111.
35. Usafii Agafia, Topală Lilia, Chirița Elena, Calcateniuc Aurica, Borisova Tamara. Productivitatea, lipidogeneza și carotenogeneza drojdiei *Rhodotorula gracilis*-CNM-YS-III/20 la cultivarea în prezența compușilor coordinațivi ai Mo (IY). 2003.
36. Turtă C., Mereacre V., Șova S., Produis D., Usafii A., Rudic V., Topală L., Calcatiniuc A. Trimetanol-hexakis- $\mu$ -triclorațato (O, O')- $\mu$ 3-oxo-difier(III) mangan(II), care manifestă proprietăți de stimulator al productivității biomasei de tulpini de drojdie din genul *Rhodotorula*. MD 2283 G2. Buletinul Oficial de Proprietate Industrială (BOPI), Chișinău, 2003.
37. Usafii A., Calcatiniuc A., Grosu L., Șirșov T. Procedeu de extracție a lipidelor din drojdie. MD 1930 G2. Buletinul Oficial de Proprietate Industrială (BOPI), Chișinău, 2002.
38. Usafii A., Calcatiniuc A., Șirșov T., Rudic V., Gulea A., Borisov T. Mediu nutritiv pentru cultivarea drojdiei *Sporobolomyces pararoseus*. MD 1328 G 2, 1999.09.30. Buletin Oficial de Proprietate Industrială (BOPI), Chișinău, 1999.
39. Usafii A., Borisov T., Calcatiniuc A., Șirșov T. Tulpina *Sporobolomyces pararoseus* – sursă de lipide. MD 892 G. Buletin Oficial de Proprietate Industrială (BOPI), Chișinău, 1997.
40. Ciumac, Jorj ; Chirsanova, Aurica ; Reșitca, Vladislav. Technologie culinaire. ISBN 978-9975-87-563-9. 2020. CZU 641.5(075.8). Aporbat spre editare la Senatul UTM din 26.11.2019. 201 p.
41. Siminiuc R., Chirsanova A., Coșciug L. Research of quality changes of gluten-free cookies of sorghum flour (*Sorghum oryzoides*) during the storage, Papers of the Sibiu Alma Mater University Conference, Fifth Edition 24-26 March 2011, ISSN 2064-1423, 106-112 pag
42. Siminiuc, Rodica; Gutium, Olga; Reșitca, Vladislav; Chirsanova, Aurica. Analiza senzorială și controlul fizico-chimic al produselor alimentației publice. Savoarea. 75 p. Suport de curs.

- Chişinău Editura „Tehnica–UTM” 2016. Disponibil:  
<http://www.repository.utm.md/handle/5014/15390>
43. Siminiuc, Rodica; Coşciug, L. et al. The effect of dehulling and thermal treatment on the protein fractions in soryz (*Sorghum oryzoidum*) grains (2012). *The Annals of the University Dunarea De Jos of Galati. Fascicle VI - Food Technology* 36 (1), p. 97-103. ISSN: 1843-5157.
44. Disponibil: <https://www.gup.ugal.ro/ugaljournals/index.php/food/article/view/2280>.
45. Siminiuc, Rodica. Distribuția granulometrică a făinii de soriz. Conferința jubiliară tehnico-științifică a colaboratorilor, doctoranzilor și studenților consacrată celei de-a 50-a aniversări a UTM., 20-21 octombrie 2014. V. 2, UTM. Chişinău: Tehnica\_UTM, 2015. Disponibil:  
<http://cris.utm.md/handle/5014/628>
46. Siminiuc, Rodica; Cosciug, Lidia. Impact of decortication of sorghum oryzoidum on glycemia. *Modern Technologies in the Food Industry*, 2018. p. 109-112.pdf. ISBN: 978-9975-87-428-1.
47. Gutium, Olga; Ciurac, Jorj; Siminiuc, Rodica. Proprietățile funcționale ale făinii de năut (*Cicer arietinum* l). *Modern Technologies in the Food Industry*, 2016. p.194-197. p.207-213. ISBN:978-9975-87-138 . Disponibil:  
[http://repository.utm.md/bitstream/handle/5014/6976/MTFI\\_2016\\_pg207-213.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repository.utm.md/bitstream/handle/5014/6976/MTFI_2016_pg207-213.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
48. Siminiuc, Rodica; Chirsanova, Aurica. L'impact de plantago ovata sur les indices de qualite des produits de boulangerie sans gluten. Colloquium Francophone for Healthy LifeStyle of Youth. Publication date 2018/5/31. Vol. 10. P.95. ISBN 978-973-744-672-5.  
[https://www.researchgate.net/profile/Alina\\_Petrache2/publication/330514840\\_HOMEOPATHY\\_COULD\\_BE\\_THE\\_SOLUTION/links/5c45abf3458515a4c7356d9b/HOMEOPATHY-COULD-BE-THE-SOLUTION.pdf#page=102](https://www.researchgate.net/profile/Alina_Petrache2/publication/330514840_HOMEOPATHY_COULD_BE_THE_SOLUTION/links/5c45abf3458515a4c7356d9b/HOMEOPATHY-COULD-BE-THE-SOLUTION.pdf#page=102).
49. БУРЬЯН Н. И., ТЮРИНА Л. В. Микробиология виноделия. — Москва, 1999.
50. БУРЬЯН, Н.И. Практическая микробиология виноделия /Н.И.Бурьян // Симферополь: Таврида, 2003.
51. В.В.ЗАГОСКИНА, Л.В.НАЗАРЕНКО, Е.А.КАЛАШНИКОВА, Е.А.ЖИВУХИНА БИОТЕХНОЛОГИЯ: Теория и практика, Москва, Оникс, 2009
52. ГОСТ 32097-2013 Уксусы из пищевого сырья. Общие технические условия.
53. ГУБЛИЯ, Р.В. Совершенствование технологии красных столовых вин в Республике Абхазия /Автореф. дисс...канд. техн. наук. – Краснодар: 2012.

54. И. В. ГЕНЮШ, В. Ю. КУЗЬМИЦКАЯ, Н. А. БЕЛЯСОВА Выделение и характеристика бактерий – продуцентов уксусной кислоты Белорусский государственный технологический университет, Минск, Беларусь, 2015
55. И. И. КОНЦЕВАЯ Микробиология: культивирование и рост бактерий Чернигов Издательство «Десна Полиграф» 2017
56. Краткий определитель бактерий Берги: Пер. с английского — Москва, 1980. И. И. Баштанная, Кишинев
57. ЛОЙЦЯНСКАЯ М.С. Синтез полисахаридов уксуснокислыми бактериями //Труды Петергофского биологического института. – 1965. - №19.
58. ЛОЙЦЯНСКАЯ М.С. Метаболизм уксуснокислых бактерий. /Успехи микробиологии. – 1966-№3.
59. Микробиология виноделия : Н.И. Бурьян. – Симферополь: Таврида, 1997.
60. МОГИЛЯНСКИЙ Н.К. Уксусные бактерии и скисание вина: Уксусное скисание вина, способы его предупреждения и лечения. – Кишинев: Ştiinţa; 1960.
61. Морфология и физиология микроорганизмов. Основы санитарной микробиологии /Под ред. В.М. Червинца. – 1-е изд. – Тверь, 2010.
62. Научный журнал КубГАУ, №111(07), 2015 года VARIETY OF MICROORGANISMS GROUPS LIVING ON BERRIES OF GRAPES Ageeva Natalia
63. НИЛОВ В. И., СКУРИХИН И. М. Химия виноделия. — 4-е изд. Москва, 1997
64. ОХРОМЕНКО Н.С., БУРЬЯН Н.И., ВАЛУЙКО Г.Г. и др. 'Виноделие' - Москва: Высшая школа, 1969 - с.176 Глава VIII. Болезни и пороки вина. Микробиологический контроль в виноделии § 38. Болезни вина
65. Промышленная микробиология: учебное пособие для вузов по специальности «Микробиология» и «Биология»/З.А. Аркадьева, А.М. Безбородов, И.Н. Блохина; под редакцией Н.С. Егорова, Москва: Высшая шклла, 1989.
66. РИБЕРО–ГАЙОН, Ж. Теория и практика виноделия. Характеристика вин. Созревание винограда. Дрожжи и бактерии / Ж. Риберо–Гайон, Э. П. Пейно, П. Риберо– Гайон, П. Сюдро. Пер. с франц., под ред. Г. Г. Валуйко // М.: Пищ. промышленность, 1979.
67. РИБЕРО–ГАЙОН, Ж. Теория и практика виноделия: Пер. с французского — Москва, 1999. — Т. 2.
68. САЕНКО Н. Ф., МАЛЬЦЕВА М. А. Микроорганизмы — вредители винодельческого производства. — Москва, 1996.

69. СТ СЭВ 4883-84 Вина. Методы определения общей кислотности.
70. Физико-химические показатели вина и виноматериалов В.А. Субботин, С.Т. Тюрин, Г.Г. Валуйко, Москва 1972
71. ШАНДЕРЛЬ Г. Г. Микробиология соков и вин: Пер. с нем. — Москва, 2002.
72. <http://vinocenter.ru/mikroflora-spontannogo-brozheniya.html>
73. <http://vinocenter.ru/sostav-estestvennoj-mikroflory-vinograda.html>