

## АНАЛИЗ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ДРОЖЖЕЙ ВИНОГРАДА КУЛЬТУРНОГО

**Н.Н. Волынчук, О.Н. Жук**

*Полесский государственный университет, г. Пинск, Беларусь*

**Введение.** Дрожжи широко распространены в природе и наиболее часто встречаются в богатых источниками углерода субстратах. Для дрожжей и других микроорганизмов виноград выступает эдификатором и создает специфическую среду обитания, обеспечивая микроорганизмы данными питательными веществами [10,11]. Микрофлора винограда связана с местоположением виноградника, климатическими и почвенными условиями, антропогенным вмешательством и др. Известно, что дрожжевое сообщество оказывает значительное влияние на здоровье растения, а также принимает непосредственное участие в процессе виноделия, сказываясь на качестве и вкусовых особенностях вина. Дрожжевые грибы нашли широкое применение в различных областях промышленности: пищевой, химической, фармацевтической, сельском хозяйстве [7,3]. В последние годы возрос интерес к изучению дрожжевого сообщества винограда в качестве агентов биоконтроля

фитопатогенов, закономерностей их формирования, как на отдельных растениях, так и в ампелозонах в целом, так как возбудители бактериальных и грибных инфекций винограда представляют собой большую опасность, трудно поддаются контролю и недостаточно изучены [6,9,4].

Целью работы являлось изучение морфологических, физиолого-биохимических показателей изолятов дрожжей корней винограда культурного (*Vitis vinifera*).

**Материалы и методы исследования.** Исследования выполнены на кафедре биотехнологии ПолесГУ. Объектами исследований служили изоляты дрожжей, выделенные из ризосферы и эндосферы корней трехлетнего винограда, произрастающего на плантации ОАО «Пинский винодельческий завод». Дрожжи выделяли на твердую питательную среду Сабуро, культивировали при 30°C в течение 72 часов. Контроль роста выделенной культуры осуществляли визуально, учитывая особенности роста на плотных питательных средах [1]. Морфологию живых клеток изучали методом световой микроскопии, используя микроскоп Olympus SC30. Для установления способности сбраживать сахара использовали модификацию метода [2]. Учет результатов производили через 24 ч. Способность дрожжей ассимилировать различные источники углерода определяли путем посева культур дрожжей на агаризованную YP-среду, содержащую определенный источник углерода (сахарозу, галактозу, мальтозу, инулин, лактозу, крахмал – с конечной концентрацией сахаров 0,5 %). Положительным контролем служила агаризованная среда, содержащая глюкозу концентрацией 0,5 %, отрицательным контролем являлась агаризованная среда, не содержащая сахаров. Результаты учитывали на третьи и седьмые сутки после посева. Способность к протеолитической активности определяли путем посева культуры уколом в столбик питательного бульона, содержащего 12% желатина, регистрировали наличие разжижения и его характер. Оценка крахмал-гидролизующей функции дрожжей выполнена на чашках Петри на сусло-агаре с 1% крахмала и действием раствора Люголя по величине зон гидролиза крахмала (при положительном результате среда окрашивалась в синий цвет) [5]. Все тесты выполнили в трех повторях.

**Результаты исследования.** Из ризосферы и эндосферы корней винограда культурного было выделено 8 изолятов дрожжей. При последовательном пересеве выделенных культур дрожжей на среду Сабуро наблюдали колонии разнообразной окраски, размера и формы (таблица 1).

Таблица 1. – Морфологические признаки выделенных изолятов дрожжей корней винограда

Морфология колоний	Описание	Морфология колоний	Описание
 1	Колонии диаметром 2–3 мм, плотные, сухие, круглой формы, поверхность блестящая. Цвет колоний розовато-бежевый. Клетки крупные, округлой и овальной формы, располагаются одиночно, наблюдается почкование клеток.	 5	Колонии диаметром 1–2 мм, круглой формы, край колоний ровный, поверхность матовая. Цвет колоний светло-бежевый. Клетки крупные, овальной формы, наблюдается почкование клеток.
 2	Колонии диаметром 1-3 мм, блестящие, слизистые, с ровным краем. Цвет колоний Оранжевый. Клетки овальной и удлиненной формы, наблюдается активное почкование клеток.	 6	Колонии диаметром до 4 мм, матовые, край мицелиального типа. Цвет бежевый. Клетки округлой формы, располагаются одиночно.
 3	Колонии диаметром до 4 мм, слизистые, край ровный. Цвет колоний желто-коричневый. Клетки округлой формы, располагаются одиночно, наблюдается почкование клеток.	 7	Колонии диаметром 3 мм, слизистые, круглой формы, край колоний ровный, поверхность блестящая, консистенция мажущаяся. Цвет колоний розовый. Клетки округлой и овальной формы, располагаются одиночно, наблюдается почкование клеток.

	Колонии диаметром 2–3 мм, круглой формы, поверхность матовая. Цвет колоний белый Клетки крупные, округлой формы, наблюдается почкование клеток.		Колонии диаметром до 3 мм, слизистые, край ровный. Цвет колоний желтый. Клетки округлой формы, располагаются одиночно, наблюдается почкование клеток.
---	--	--	---

Как продемонстрировано в таблице, большинство колоний имеют диаметр около 3 мм, круглую форму ровными краями, блестящей поверхностью и мажущейся консистенцией. Клетки округлой формы, располагаются одиночно, наблюдается почкование клеток.

К культуральным (макроморфологическим) свойствам относятся характерные особенности роста микроорганизмов на питательных средах. По результатам исследования составлена карта (таблица 2) выявленных признаков выделенных штаммов культур дрожжей на плотных стандартных питательных средах.

Из данных таблицы следует, что выделенные культуры дают обильный рост на питательной среде УЕРД. При этом стоит отметить, что при культивировании изолята №6 на плотных средах Лундина и виноградном сусле образуются колонии S-типа, тогда как изменение поверхности, профиля и размера колоний на среде Городковой свидетельствует о явлении диссоциации.

Таблица 2. – Культуральные свойства выделенных чистых культур дрожжей корней винограда

Наименование питательной среды	Характер роста колоний				
	Размер	Форма, профиль	Поверхность	Цвет	Край
УЕРД	Крупные 5 мм	Округлая, выпуклая	Блестящая	Светло-розовый (7), желтый (2,3,8), бежевый (1,4,5,6)	Ровный
Лундина	Средние 3-4 мм	Округлая, выпуклая	Блестящая	Белый, №2–желтый	Ровный
Городковой	Средние 3-4 мм	Округлая, конусов-я	Блестящая Матовая (6)	Белый, №2–желтый	Ровный
Виноградное сусло	Средние 3-4 мм	Округлая, выпуклая	Блестящая	желтый (2,3,8), белый (4), бежевый (1,4,5,6,7).	Ровный

Все изоляты обладают амилолитической активностью, протеолитической активностью не обладают. При определении оптимальных температур для роста исследуемых изолятов на агаре Сабуро, установлено, что оптимальной температурой для культивирования изолятов № 1, 2, 5, 8 является температурный диапазон 20-30°C. Для изолята №3, 4, 6, 7 – 20-38°C. Все изоляты можно отнести к группе мезофильных микроорганизмов.

Характеристика способности исследуемых дрожжей сбраживать сахара приведена в таблице 3. О способности к сбраживанию сахаров свидетельствовало образование газа в сосуде с водой. Как видно из таблицы, только дрожжевой изолят №4 способен сбраживать отдельные сахара, в то время как остальные изоляты – не способны сбраживать данные сахара.

Таблица 3. – Характеристика способности изучаемых дрожжей сбраживать сахара\*

Источник углерода	Изоляты дрожжей							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Глюкоза	-	-	-	+	-	-	-	-
Галактоза	-	-	-	-	-	-	-	-
Сахароза	-	-	-	+	-	-	-	-
Мальтоза	-	-	-	+	-	-	-	-
Инулин	-	-	-	-	-	-	-	-
Лактоза	-	-	-	+	-	-	-	-
Крахмал	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание. Условные обозначения : «+» – наличие роста дрожжей; «-» – отсутствие роста дрожжей; \* – культивирование в течение 7 суток при температуре 25°C.

Согласно данным литературы, дрожжи, пигментация которых обусловлена наличием каротиноидных пигментов, а также дрожжи, образующие крахмалоподобные соединения (*Holtermannia* и *Cryptococcus*), как правило, не способны сбраживать исследуемые сахара [6,8], что является подтверждением их таксономической принадлежности.

Характеристика способности исследуемых дрожжей к росту и ассимиляции различных источников углерода приведена в таблице 4. Согласно приведенным данным, у некоторых дрожжей наблюдался слабый рост в исследуемых средах, что объясняется возможной медленной адаптацией культур дрожжей к некоторым источникам углерода.

Таблица 4. – Характеристика способности изучаемых дрожжей к росту и ассимиляции источников углерода\*

Источник углерода	Изоляты дрожжей							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Глюкоза	+	+	+	+	+	+	+	+
Галактоза	+	+/-	+	+	+	+	+	+
Сахароза	+	+/-	-	+	+	+	+/-	+
Мальтоза	+	+/-	-	+	+	+	+	+/-
Инулин	+	+/-	-	-	-	-	-	-
Лактоза	+	-	-	+/-	-	-	-	-
Крахмал	+	+	-	-	-	-	-	-

Примечание – Условные обозначения : «+» – наличие роста дрожжей; «-» – отсутствие роста дрожжей; «+/-» – слабый рост дрожжей; \* – культивирование в течение 7 суток при температуре 25°C

Наибольшую активность в ассимиляции источников углерода проявил изолят № 1. В целом плохо ассимилируемыми источниками углерода были инулин, лактоза и крахмал; средне ассимилируемыми – мальтоза, сахароза; отлично ассимилируемыми – глюкоза, галактоза.

По результатам морфологической и физиолого-биохимической идентификации выделенные 8 штаммов дрожжей, относятся к 6 родам: №1,3 – *Cryptococcus sp.*, №2,8 – *Sporobolomyces*, №4 – *Candida*, №5 – *Rhodospordiobolus*, №6 – *Rhodotorula*, №7 – *Metschnikowia*.

**Заключение.** Корни винограда культурного, произрастающего на плантации ОАО «Пинский винодельческий завод», заселены штаммами дрожжевых грибов не менее чем шести родов – *Rhodospordiobolus*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Cryptococcus*, *Metschnikowia* и *Candida*. Требуется дальнейшее изучение данных изолятов в качестве агентов биоконтроля фитопатогенов, закономерностей их формирования, как на отдельных растениях, так и в ампелоценозах в целом.

#### Список использованных источников

1. Бабьева, И. П. Биология дрожжей / И. П. Бабьева, И. Ю. Чернов. – М.: КМК, 2004. – 239 с.
2. Бабьева, И. П. Методы выделения и идентификации дрожжей / И. П. Бабьева, В. И. Голубев. – М.: Пищевая промышленность, 1979. – 120 с.
2. Банницына, Т.Е. Дрожжи в современной биотехнологии / Т.Е. Банницына [и др.] // Вестник МАХ. – 2016. – № 1 – С. 24-29.
3. Васильева, Е.Н. Эндوفитные микроорганизмы в фундаментальных исследованиях и сельском хозяйстве / Е.Н. Васильева, Г.А. Ахтемова, В.А. Жуков // Genetic basis of ecosystems evolution. – 2019. – №.17. – P. 19 – 32.
4. Нетрусов, А. И. Практикум по микробиологии: учебное пособие для студ. высш. учеб. заведений / А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук. – М.: Академия, 2005. – 608 с.
5. Савчик, А.В. Молекулярно-генетическая идентификация дрожжевых грибов из фонда белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов // пищевая промышленность: наука и Технологии Vol. 13, № 3 (49) 2020 С. 61 – 69.
4. Belda, I. From vineyard soil to wine fermentation: microbiome approximations to explain the «terroir» concept / I. Belda et al. // Front Microbiol. – 2017. – No. 7. – P. 805 – 821.
5. Doty, S.L. Endophytic yeasts: biology and applications, in symbiotic endophytes / S.L. Doty et al. // Springer. – 2013. – P. 335 – 343.
6. Kurtzman, P. Advances in yeast systematics and phylogeny and their use as predictors of biotechnologically important metabolic pathways / P. Kurtzman [et al.] // FEMS Journals. – 2015. – P. 1-17.

7. Wassermann, B. Plant Health and Sound Vibration: Analyzing Implications of the Microbiome in Grape Wine Leaves / B. Wassermann et al. // Pathogens. – 2021. – No. 10. – P. 63.

8. Zarraonaindia, I. The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota / I. Zarraonaindia [et al.] // MBio. – 2015. – No. 6. – P. 24 – 39.