

ДОМИНИРУЮЩИЕ ДРОЖЖИ ПРИРОДНЫХ НИШ АНДИЖАНСКОЙ ОБЛАСТИ

Шахноза Агзамова

Институт микробиологии АН РУз. Младший научный сотрудник

Email: agzamovashaxnoza896@gmail.com

998937873

Мавлоний Машхура

Институт микробиологии АН РУз. Академик,

зав.лаб. “Технической микробиологии”

Мардонов Икром

Институт микробиологии АН РУз. Докторант

Аннотация

В данной статье были взяты пробы из природных источников Андижанской области и проведены исследовательские работы в 3 сезона года. В результате были идентифицированы и таксономически описаны эти дрожжевые грибы (*Candida* sp. *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces vini*, *Torulopsis bacillaris*, *Hanseniaspora apiculata*, *Rhodotorula rubra*).

Ключевые слова: видовое разнообразие, дрожжи, питательные среды, *Candida*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* и т.д.

Introduction

Введение. Фрагментом Национальной Программы по изучению «Биоразнообразия растений, животных и микроорганизмов», принятой в 1995 г., являются крупномасштабные исследования биоразнообразия микроорганизмов трёх физиологических групп (бактерий, дрожжей, актиномицетов) различных эколого-географических зон Республики Узбекистан.

Наибольшую физиологическую группу микроорганизмов составляют дрожжи. Нами были изучены спорогенные и аспорогенные дрожжи природных ниш Андижанской области, которая входит в состав Восточной эколого-географической зоны Республики Узбекистан.

Целью исследований являлось глубокое изучение и описание количественного содержания и видового разнообразия дрожжей природных ниш Андижанской области за три сезона года – весенний, летний, осенний.

Отбор проб для выделения дрожжевых микроорганизмов в чистую культуру производили следующим образом.

Весенний сезон года

1. Естественные водоемы
2. Искусственные водоемы
3. Почва под виноградником
4. Слезотечение виноградников
5. Ржаной хлеб
6. Пшеничный хлеб
7. Шесть видов молочных продуктов; 2 вида творога, 2 сорта сыра, йогурт, молоко
8. Восемь видов плодово-ягодных соков Андижанского консервного завода (цех контрольной выдержки)
9. Овощные консервы (4 вида овощной икры)
10. Четыре вида детского питания.

Летний сезон года

1. Естественные водоемы
2. Искусственные водоемы
3. Эпифитная микрофлора винограда, яблок, абрикосов и груш.
4. Почва под плодовыми и фруктовыми деревьями
5. Микрофлора инжира 2 сортов
6. Молочные продукты 6 видов.

Осенний сезон года

1. Эпифитная микрофлора двух сортов яблок, шести сортов винограда
2. Эпифитная микрофлора двух сортов груш и цитрусовых
3. Слезотечение виноградников
4. Сердцевина дыни
5. Эпифитная микрофлора зерновых
6. Детское питание (пюре)
7. Молочные продукты.

Методика исследования

Эпифитную микрофлору изучали в динамике созревания винограда, с технической зрелостью до физиологической зрелости и уборки урожая.

Представители преобладающих групп микроорганизмов были выделены в чистую культуру для определения видового состава.

Классификацию микроорганизмов осуществляли на основании изучения их культуральных, морфологических и физиологических признаков.

При определении систематического положения изолированных культур микроорганизмов использовались определителями В.И. Кудрявцева [1] – спорогенные дрожжи, J. Lodder [5] и J. Lodder a. N. I. W. Kroger van Rij (1952) — аспорогенные дрожжи.

Для изучения дрожжей применялись следующие питательные среды:

- 1) Солодовое сусло
- 2) Солодовое сусло-агар
- 3) виноградное сусло сорта БАЯН ширей с сахаристостью от 18 до 20% и титруемой кислотностью 7.8 г/л;
- 4) 2%-ный виноградный сусло-агар;
- 5) синтетическая среда Ридер следующего состава (по Кудрявцеву): водопроводная вода – 1000 мл, $(\text{NH}_4)\text{SCO}_2$ – 3.0 г, K_2HPO_4 – 1.0 г, H_2KPO_4 – 0.2 г, MgSO_4 – 0.05 г, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ – 0.4 г, NaCl – 0.5 г, дрожжевой автолизат – 5.0 мл, исследуемый сахар – 20 г;
- 6) среда Ридер с 2% агара и 0.04% щелочного раствора бромфенол синий.

Дрожжевой автолизат готовили из обычных прессованных хлебных дрожжей (400 г в 1000 мл). Автолиз производили в термостате при постоянной температуре 48° С в течение двух суток.

Морфологические свойства дрожжей изучали как на *молодых* 48-часовых культурах в момент активного размножения в виноградном соке, так и на старых (2–3-месячных). Интенсивность размножения изучали при помощи счетной камеры Цейса. Затем давали описание формы и величины вегетативных клеток, характера почкования и спорообразования.[2]

Спорообразование изучали на среде Городковой (1908) и гипсовых блоках, а также в «голодном» или водном агаре.

Гигантские колонии изучали на 2%-ном агар-виноградном сусле сахаристостью в 18–21%. Наблюдения продолжали в течение 1 месяца. Описание колоний давали после окончательного их оформления. Характер роста гигантских колоний (форма, размер, окраска и структура) описывали на виноградном сусле с 3% агар-агар в 20–30-дневном возрасте.[3] Образование исследуемыми дрожжами псевдомицелия изучали на картофельном агаре. Параллельно делались микрофотосъемки двух-, трехсуточных культур, псевдомицелия и гигантских колоний дрожжей.

Биохимические качества каждого штамма определяли по отношению к диагностическим сахарам и источникам углеродистого и азотистого питания по методике В.И. Кудрявцева [1]. Сбраживающая способность выделенных дрожжей устанавливалась на виноградном сусле с сахаристостью 18% в трубках Дунбара.

При изучении отношения дрожжей к сбраживанию виноградного сусла и различных сахаров в качестве посевного материала использовали двухсуточные культуры дрожжей, выращенные в пробирках на сусло-агаре. Из них готовили суспензию, которая в количестве 2% от общего объема среды переносилась в трубку Дунбара или в количестве 1-й капли (1/20 мл) – на твердые питательные среды.[4]

Одним из основных показателей, характеризующих биологическое (физиологическое) состояние микрофлоры, является процентное содержание живых и мертвых клеток.

При определении количества мертвых клеток пользовались водными растворами метиленовой сини и нейтральрота (1:10000). Более отчетливые данные получаются с нейтральротом, особенно после предварительной промывки дрожжей стерильной водопроводной водой в центрифужных пробирках при центрифугировании.

Окрашивание производили не на предметном стеклышке, а в пробирках в течение 20–30 мин. При таком способе мертвые клетки окрашиваются диффузно в интенсивно красный цвет, *живые не окрашиваются.*[7] *Процент мертвых клеток устанавливается* подсчетом окрашенных и неокрашенных клеток на 50 полях зрения.

Результаты исследований. Доминирующие дрожжи, выделенные в чистую культуру за 3 сезона года (весенний, летний, осенний приведены в табл. 1,2,3).

Таблица 1 Доминирующие дрожжи природных ниш Андижанской области (весенний сезон года)

№ п/п	Вид	Частота встречаемости
1	<i>Candida sp.</i>	повсеместно
2	<i>Torulopsis bacillaris</i>	часто
3	<i>Saccharomyces vini</i>	часто

Таблица 2 Доминирующие дрожжи природных ниш Андижанской области (летний сезон года)

№ п/п	Вид	Частота встречаемости
1	<i>Candida sp.</i>	Повсеместно
2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Часто
3	<i>Saccharomyces vini</i>	Часто
4	<i>Torulopsis bacillaris</i>	Часто
5	<i>Hanseniaspora apiculata</i>	Часто
6	<i>Rhodotorula</i>	Часто

Таблица 3 Доминирующие дрожжи природных ниш Андижанской области (осенний сезон года)

№ п/п	Вид	Места обитания
1	<i>Candida sp.</i>	Повсеместно
2	<i>Saccharomyces vini</i>	Часто
3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Часто
4	<i>Torulopsis bacillaris</i>	Часто
5	<i>Hanseniaspora apiculata</i>	Часто
6	<i>Rhodotorula</i>	Часто

Таксономическое описание доминирующих дрожжей.

***Candida tropicalis* Berkhout (1910)**

Штаммы этого вида встречались повсеместно.

Культуральные свойства. Через сутки при 36°C солодовом сусле (7%) образуется небольшой осадок и пристенное кольцо, через месяц – толстая морщинистая пленка. Колония на солодовом агаре округлая, правильной формы, беловато-кремовая, поверхность складчатая, с концентрическими кругами, часто покрыта ворсинками. Профиль колонии выпуклый, край изрезанный, зубчатый или бахромчатый с обильной зоной псевдомицелия. Структура колоний однородная, консистенция от мягкой до плотной, иногда волокнистой.

Морфологические свойства. Клетки овальные и круглые, размер их (4–7) x (5–10) мкм. Псевдомицелий развит хорошо, состоит из длинных, вытянутых и разветвленных псевдогиф, несущих бластоспоры в веточках и цепочках. Аскоспоры отсутствуют. В старых клетках обильно накапливается жир.

Физиологические свойства. Активно сбраживает глюкозу, сахарозу, лактозу.

Ассимилирует следующие источники углерода: глюкозу, галактозу, сахарозу, мальтозу, трегалозу, рафинозу, инулин, *d*-ксилозу, *l*-арабинозу, *l*-рамнозу, этанол, глицерин, *d*-маннит, сорбит, *l*-метил-*d*-гликозид, *dl*-молочную, янтарную, лимонную кислоты, растворимый крахмал.[3]

Не усваивает *l*-сорбозу, **лактозу**, **дульцит**, инозит и салициловую кислоту. Не расщепляет **или очень слабо** расщепляет арбуцин. Не образует крахмалоподобные соединения, гидролизует мочевины. Нитраты не ассимилирует или ассимилирует слабо.

Рост стимулируют пантотеновая, парааминобензойная кислоты, инозит. Рис.1

***Candida robusta* Diddens et Lodder (1942)**

Дрожжи данного вида также широко распространены.

Культуральные свойства. На жидком сусле образует кольцо и плотный осадок. Колонии на солодовом сусле-агаре серовато-желтые, блестящие, плоские, гладкие, со слегка изрезанным краем, более матовые со слабой морщинистостью в центре.

Морфологические свойства. Клетки овальные или округлые, иногда вытянутые и продолговатые, средних размеров и крупные (3.4–4.2) x (5.0–5.8) мкм, одиночные, реже в небольших цепочках и веточках. Псевдомицелий развит хорошо.

Физиологические свойства. Активно сбраживает глюкозу, галактозу, сахарозу, мальтозу, трегалозу, рафинозу, инулин, *l*-арабинозу, *l*-рамнозу, этанол, глицерин, *d*-маннит, *l*-метил, *d*-гликозид, *dl*-молочную, янтарную, лимонную кислоты, растворимый крахмал.

Не усваивает *l*-сорбозу, лактозу, дульцит, инозит, салициловую кислоту. Слабо расщепляет арбутин, не образует крахмалоподобных соединений, гидролизует мочевины. Нитраты ассимилируют слабый рост. Рост штамма стимулирует биотин. Рис.2

***Saccharomyces vini*, Meyen, 1838**

Представлен 40 штаммами, выделенными из винограда, сливы, яблока и всех фруктовых соков.

Представители этого вида в жидкой питательной среде развивались за счет сбраживания, а на твердой – за счет окисления глюкозы, галактозы, сахарозы, 1/3 рафинозы и

мальтозы. Они не усваивали лактозу, ксилозу, арабинозу, инулин и декстрины. Из других углеродных соединений ассимилировали этиловый спирт, слабо – глицерин, молочную и уксусную кислоты, из источников азота – пептон, аспарагин, слабо – гликокол и сульфат аммония.

У большинства выделенных штаммов клетки овальной и эллиптической формы. У некоторых рас клетки круглые или овально-удлиненные, длиной 4.2–11.8 мкм и шириной 2.4–7.8 мкм. Почти все штаммы отличаются обильным спорообразованием.

Исследования на среде Ридер с сахарами в трубках Дунбара показали, что различные штаммы сбраживают сахара с неодинаковой интенсивностью. Большинство штаммов хорошо сбраживали глюкозу, сахарозу, слабее – мальтозу. Некоторые (П-12, ВШ-12) уже через сутки показали полное колено запаянного конца трубки Дунбара. Лактозу и арабинозу, как правило, не сбраживали. Рафинозу все штаммы сбраживали слабее, чем другие сахара. Это вполне понятно, так как дрожжи способны вызывать брожение этого сахара после расщепления его на фруктозу и мелибиозу с использованием впоследствии только фруктозы, т. е. 1/3 части рафинозы.

***Saccharomyces Cerevisiae* Meyen, 1838**

Из эпифитной микрофлоры зерна а также ржаного и пшеничного хлеба в наибольшую массу нами выделенные дрожжи рода *Saccharomyces* после обстоятельного изучения культуральных, морфологических и физиологических свойств отнесены к виду *Saccharomyces Cerevisiae*.

Морфологические свойства.

Saccharomyces Cerevisiae не отличается от других видов своего рода. Как правило, способность к образованию сумок со спорами у этих дрожжей понижена по сравнению с дрожжами видов *Saccharomyces globosus*, *Saccharomyces vini* и др.

Клетки 3-х суточных культур штаммов дрожжей данного вида были овальной формы с асками спор размером 5мкм в длину и 2-3 мкм в ширину.

Физиологические свойства.

Все изученные штаммы хорошо развиваются в жидкой питательной среде за счет сбраживания, а на твердой – за счет окисления:

Глюкозы, галактозы, сахарозы, ^{1/3} рафинозы, мальтозы, простых декстринов солодового сусле.

При этом глюкозидаза, сахараза, рафиназа и мальтаза являются стойкими ферментами, а галактозидаза – колеблющимся ферментом.

Не усваивают:

лактозу, инулин, ксилозу, арабинозу.

Отношение к спиртам

Усваивают:

этиловый спирт, глицерин.

Не усваивают:

маннита, сорбита, дульцита.

Отношение к органическим кислотам

Усваивают:

уксусную, молочную

Не усваивают:

Янтарную, яблочную, винную, лимонную.

Штаммы относятся к виду *Saccharomyces Cerevisiae*. *Рис.4.*

Rhodotorula rubra (Demme), Lodder, 1889

В наших исследованиях на данный вид приходился только 1% выделенных штаммов.

Культуральные свойства. Колония 2-суточной культуры, круглая, выпуклая, по краям ровная, оранжево-розовая, влажная, блестящая, диаметром 0.7–1.0 мм. 10-дневная колония розовато-коричневая, диаметром 3–4 мм, на жидких питательных средах и виноградном соке образует бледно-розовое кольцо.

Морфологические свойства. Клетки удлинённо-овальные, размером (4.6–11.0) x (2.2–5.3) мкм, почкующиеся. На сусло-агаре штрих красно-оранжевый, матовый, гладкий, иногда слегка морщинистый.

Физиологические свойства. Глюкозу, галактозу, лактозу, сахарозу и мальтозу не сбраживает. Развивается только за счёт окисления глюкозы и галактозы. Ассимилирует сернокислый аммоний, аспарагин, пептон, этиловый спирт, не усваивает нитратный азот, мочевины. Усваивает этиловый спирт. *Рис.3.*

Вид *Torulopsis bacillaris*, Lodder, 1922

Штаммы выделены почти со всех следующих видов овощных консервных продуктов: икры баклажанной, зелёного горошка, лечо, томатной пасты, вырабатываемых на консервных заводах Сурхандарьинской области.

Культуральные свойства. Двухсуточные колонии этого вида кремовые, блестящие, маслянистые, с волнистыми краями размером 2.8–4.2 мм. Шероховатые колонии с выпуклыми краями.

Морфологические свойства. *Zygosaccharomyces lactis* не отличаются от других видов своего рода. У отдельных штаммов оболочки сумок быстро разрушаются и споры освобождаются. При развитии организмов в музейных условиях способность к спорообразованию ослабевает и затем совсем теряется.

Физиологические свойства. Все культуры хорошо развиваются на питательной среде за счёт окисления глюкозы (фруктозы, маннозы), галактозы, сахарозы, 1/3 рафинозы, лактозы, мальтозы. Вызывают сбраживание тех же сахаров, кроме мальтозы. Не усваивают инулин, ксилозу и арабинозу.

Отношение к спиртам. Усваивают этиловый спирт, глицерин, маннит и сорбит. Не усваивают дульцит.

Отношение к органическим кислотам. Усваивают уксусную, молочную, янтарную и яблочную кислоты. Не усваивают лимонную и винную кислоты.

***Hanseniaspora apiculata* (Reess), Zikes, 1911**

В.И. Кудрявцев подробно изучил около 20 штаммов этого вида, присланных из Нидерландов и 172 штамма, выделенные им из ягод и других сладких плодов, а также из самозабродивших соков, портящихся овощей, почвы.

Культуральные свойства. Колония круглой формы, грязно-белого цвета, ровная, гладкая, плоская, со слабовыпуклым центром, слабоблестящая, диаметром 6 мм.

Гигантская колония круглая, грязно-белого цвета, плоская, матовая, диаметром 4.5 мкм. Поверхность колонии гладкая, со слаборадиальными полосами, центр – слабобородавчатый, края извилистые.

В жидкой среде образует рыхлую скользящую пленку. Кольцо размером 2 мм. Раствор прозрачный, при взбалтывании мутнеет, крупные частицы оседают.

Морфологические свойства. Клетки у всех выделенных штаммов мелкие, иногда по размерам приближающиеся к бактериям. Длина их колебалась от 4 до 10 мкм, ширина – от 3 до 4.2.

В старых культурах встречались также овальные и удлинённые (колбасовидные) клетки, обладающие огромной энергией размножения. Размножение происходило почкованием на полярных концах клеток. В свежесделанных культурах этого вида мы наблюдали 1 крупную спору в сумке овальной формы. Через несколько месяцев одни штаммы уже не образовывали споры, другие вообще оказывались аспорогенными.

Физиологические свойства. Культура сбраживает глюкозу, фруктозу и хорошо развивается за счет окисления этих сахаров. Не усваивает галактозу, сахарозу, раффинозу, мальтозу, лактозу, инулин, ксилозу, арабинозу.

Не усваивает этиловый спирт, глицерин, манит, дульцит, сорбит, уксусную, янтарную, яблочную, лимонную и винную кислоты.

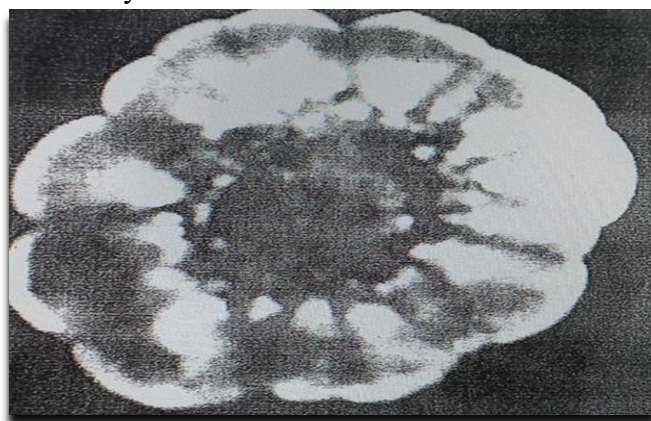


Рис.1 Гигантская колония аспорогенных дрожжей *Candida tropicalis*. Натуральная величина



рис.2 Четырехдневная колония *Candida robusta*. Ув.680

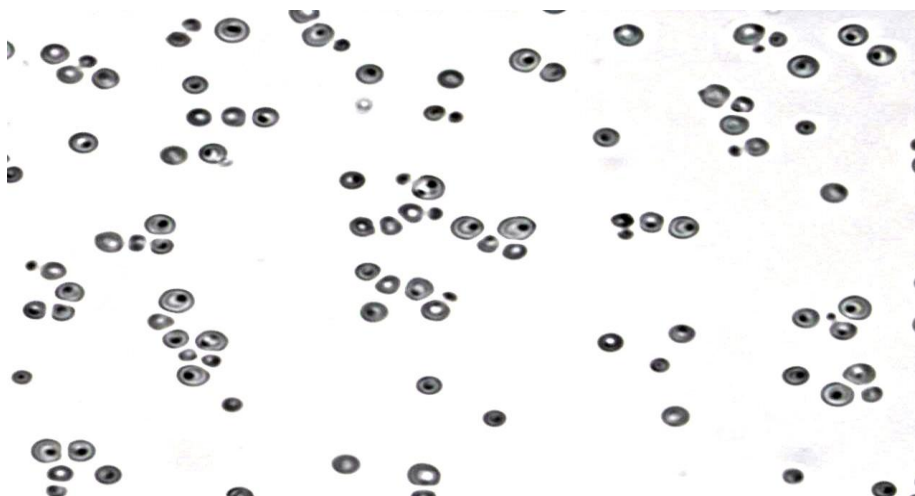


Рис.3 Двухсуточные клетки *Rodotorula rubra*.
ув.680.

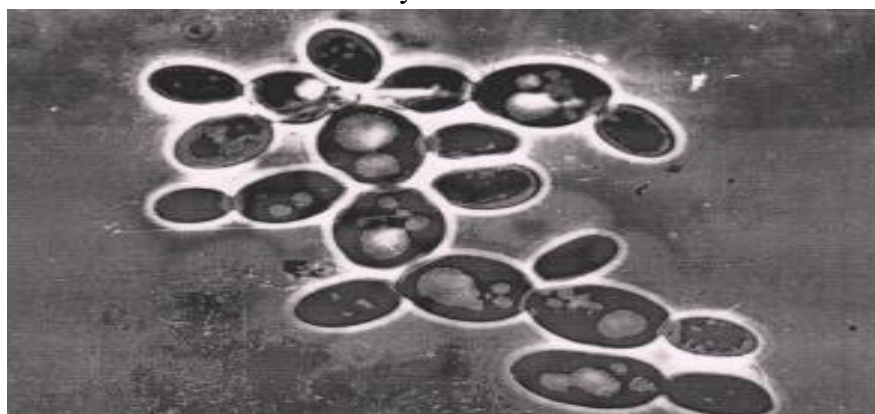


рис.4 Двухсуточные клетки *Saccharomyces cerevisiae*.
ув.680.

Таким образом, нашими многолетними исследованиями достоверно установлены доминирующие виды дрожжей, обитающие в природных нишах Андижанской области, что является маленьким фрагментом большой научной проблемы по изучению и описанию микробного мира Центральной Азии.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кудрявцев В.И. Систематика дрожжей. –М.: Изд-во АН СССР, 1954.
2. Люцканов Н., Соколов В., Драганов Л., Дишев Н., Кипов С., Друлиева Д. Культивирование *Candida Scotti* в лабораторных и производственных условиях на среде с гидролизатом древесины и тростниковой бардой//Науч. тр. Высш. ин-т хранит, и вкус. пром. Вып. 33. –Пловдив, 1986. –С. 239–246.
3. Мавлоний М.И. К систематике микроорганизмов//Узбекский биол. журнал. –2013. – №2. –С.15–17.
4. Шлегель Г. Общая микробиология. –М.: Мир, 1987. – 500 с.
5. Lodder J. The yeasts. A taxonomic study. –Amsterdam; London, 1970.

-
6. G'aniyeva A.B., Nazarova H.A. Mikrobiologiya va mikrobiologik tekshirish usullari/Qayta ishlangan 7-nashr. – Toshkent, 2017.
 7. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology/Boone L.R., Castenholz R.W. (eds). Vol. 1. –New York: Springer-Verlag, 2001. –P.485–487.