

## ВЛИЯНИЕ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ НА ЭПИФИТНЫЕ ДРОЖЖЕВЫЕ КУЛЬТУРЫ

Д.А. Кузнецова, Е.А. Грибанова

БГУ, г. Минск, Республика Беларусь, kuzndar2003@gmail.com

Дрожжи являются важным объектом биотехнологии. Они широко используются в различных отраслях промышленности: в пивоварении, виноделии, хлебопечении, в производстве этанола. Сухие пивные дрожжи используются для изготовления лекарственных препаратов и биологически активных добавок. Белок дрожжей по содержанию аминокислот превосходит белок зерна злаковых культур и незначительно уступает молочному белку и белку рыбной. Виды дрожжей *Rhodosporidium diobovatum*, *Danuliella salina* являются продуцентами каротинов. Каротины являются предшественниками витамина А, поэтому каротинсинтезирующие дрожжи широко используются в качестве кормовой добавки для животных. Также в состав клеток дрожжей входит большое количество витаминов группы В. По содержанию витаминов дрожжи превосходят все белковые корма. Для очистки воды от нефтяных загрязнений используют дрожжи рода *Candida*, ассимилирующие нефть и нефтепродукты [2].

Однако, на производстве дрожжи подвергаются различным стрессовым факторам, таким как изменение температуры, кислотности среды, осмотического давления, что может повлиять на общую эффективность производства. Поэтому очень важным направлением исследований является изучение влияния неблагоприятных условий культивирования на клетки дрожжей и поиск методов повышения устойчивости дрожжей к стрессовым факторам.

Целью данной работы являлось выделение чистых культур мезофильных дрожжей из природных источников, изучение их морфологических свойств, параметров роста и устойчивости к стрессовым факторам среды.

**Материал и методы.** Объектами выделения дрожжевых культур являлись плоды винограда (чёрного, зелёного, красного), эпифитная почва и листья растений эпипремнума (*Epipremnum*) и гибискуса (*Hibiscus*).

Выделение чистых культур дрожжей. Культуры мезофильных дрожжей с поверхности листьев и эпифитной почвы выделяли методом Коха при 28 °С. Культуры липомицетов выделяли методом почвенных комочков из эпифитной почвы. Культуры дрожжей с поверхности листьев получали высевом методом отпечатка. Использовали плотные питательные среды Сабуро, YPD, ХАТА и ГПА с добавлением антибиотика стрептомицина (25 ед/мл) [1].

Определение термоустойчивости. Температурный диапазон роста определяли при росте на питательной среде Сабуро при 10 °С, 18 °С, 28 °С, 37 °С, 42–44 °С, культивировали в течение 5–7 суток. По окончании роста делали вывод о температурном диапазоне роста культур [3].

Построение кривых роста. Построение кривых роста вели двумя методами: нефелометрическим и определением количества колониеобразующих единиц в мл исследуемой жидкости методом drop plate. а) *Нефелометрический метод.* Проводился с использованием спектрофотометра Metertech SP-8000 при длине волны 600 нм и толщине кюветы 1 см, с обнулением по жидкой среде Сабуро. Измерения проводили 2 раза в день. б) *Метод drop plate.* В точках снятия результатов делали 10-кратные разведения. Посев на питательную среду Сабуро проводили по 5 мкл в 4 повторах для каждого разведения. Культивировали при оптимальной температуре в течение 1–2 суток [3].

Определение пределов осмоотолерантности. Осмотическое давление создавали за счет различных концентраций NaCl в питательной среде Сабуро (исследуемые

концентрации соли 2,5%, 5%, 10%, 15%, 20%). Методом предельных разведений достигали плотности клеток, оптимальной для получения изолированных колоний при высеве методом Коха на поверхность плотной питательной среды. В качестве контролей использовали культуры *Saccharomyces cerevisiae* и *Candida utilis* [3].

**Результаты и их обсуждение.** С использованием указанных методов выделения чистых культур дрожжей были получены и описаны следующие изоляты мезофильных дрожжей: 2 изолята из черного винограда – D7, K3; 2 из красного винограда – E2.3, E2.4; 1 из зеленого винограда – E3.1; 2 из почвы эпипренума (*Epipremnum*) и гибискуса (*Hibiscus*) – P1 и P3. Исследуемые дрожжи характеризовались кремовой или белой окраской колоний, при этом культуры E2.4 и E3.1 формировали субстратный мицелий. Форма клеток варьировала от округлой до овальной. Средний диаметр клеток находился в диапазоне от 2,87 мкм у D7 до 5,27 мкм у E2.4.

Первым этапом в исследовании являлось построение кривых роста мезофильных культур дрожжей двумя методами: нефелометрическим и определением количества колониеобразующих единиц в мл исследуемой жидкости. Исследование проводили в течение 4 суток. Следует отметить, что культуры, выделенные из черного и красного винограда, росли быстрее остальных и переход к стационарной фазе роста наблюдался уже после 15 часов культивирования. У остальных изолятов стационарная фаза роста наблюдалась ближе к 39 часу, так как темпы увеличения оптической плотности, а соответственно и прирост биомассы значительно снизились.

К стрессовым факторам, ингибирующим рост культур в процессе биотехнологического производства или применения объектов биотехнологии в условиях окружающей среды, относятся периоды перепадов температур и повышенное содержание солей в окружающей среде, ингибирующие рост и развитие микроорганизмов.

Предметом дальнейших исследований являлся температурный диапазон роста мезофильных культур дрожжей. Дрожжи, имеющие широкий температурный диапазон являются более перспективными для биотехнологических целей. Согласно полученным результатам, температурным диапазоном роста изолятов D7, P1 и P3 составил 10–37 °С, а изолятов K3, E2.3, E2.4 и E3.1 – 10–28 °С. Была подтверждена принадлежность исследуемых культур дрожжей к мезофильным по отношению к температуре культивирования. Оптимальная температура для культур D7, K3 и E2.3 – 28 °С, для изолята E2.4 и E3.1 – 18 °С, для P1 и P3 – 28–37 °С. Наиболее широкий температурный диапазон роста у наблюдался у культур D7, P1 и P3.

Определение пределов осмотолерантности проводили с использованием различных концентраций NaCl в среде. Оптимизировав разведения для каждой исследуемой культуры, делали высев методом Коха с последующим подсчетом количества выросших колоний и определением влияния осмотического давления на размер формируемых колоний и клеток дрожжей.

Согласно результатам исследований, повышение осмотического давления в среде приводило к уменьшению выживаемости мезофильных культур дрожжей. Пределом осмотолерантности культур D7, P1, P3 и *Saccharomyces cerevisiae* являлось 7,5% соли в среде, K3, E2.3 – 2,5%, E2.4, E3.1 – 10% и *Candida utilis* – 5%. Оптимальная концентрация соли для нормального роста и развития изолятов D7, P1, P3, *Saccharomyces cerevisiae* составила 2,5%, для культур K3, E2.3, *Candida utilis* – 0%, для изолятов E2.4, E3.1 – 5%. Результаты исследований позволяют отнести исследуемые микроорганизмы к группе умеренных галофилов.

Исследование влияния осмотического давления на размер формируемых клеток дрожжей выявило, что у изолятов D7, K3, P1, P3, *Saccharomyces cerevisiae* и *Candida utilis* происходит уменьшение размеров клеток на 7%, 15,2%, 35,8%, 38,9%, 5,98%, 31%

при увеличении концентрации соли в среде. У изолятов E2.3, E2.4 и E3.1 происходит увеличение размеров клеток на 50%, 23,3%, 37% при увеличении концентрации соли.

**Закключение.** Согласно полученным результатам, наиболее устойчивыми к осмотическому стрессу являлись культуры E2.4 и E3.1, выделенные из красного и зеленого винограда, так как высокая концентрация NaCl (10%) не подавляла их рост и их размер клеток рос при увеличении концентрации соли. Изоляты P1 и P3 являлись более устойчивыми к температурному стрессу, так как у них наиболее широкий температурный диапазон роста (10–37 °C).

Результаты исследований позволяют изучить как дрожжи, широко используемые в биотехнологии, реагируют на стрессовые факторы. Дальнейшие исследования будут направлены на оптимизацию условий культивирования, позволяющих увеличить выживаемость дрожжевых культур в условиях стресса.

### Литература

1. Бабьева, И.П. Методы выделения и идентификации дрожжей / И.П. Бабьева, В.И. Голубев. – Москва: Пищ. пром-сть, 1979. – 120 с.
2. Дрожжи в современной биотехнологии / Т.Е. Банницына [и др.] // Вестник МАХ. – 2016. – №1. – С. 24–29.
3. Чернявская М.И. Экологическая микробиология: учеб.-метод. пособие / М.И. Чернявская [и др.]. – Минск: БГУ, 2016. – 63 с.

## ВЛИЯНИЕ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ НА РОСТ ПСИХРОФИЛЬНЫХ И МЕЗОФИЛЬНЫХ ДРОЖЖЕЙ

*К.Р. Лакисов, Е.А. Грибанова*

БГУ, г. Минск, Республика Беларусь, [kirya.lakisov99@mail.ru](mailto:kirya.lakisov99@mail.ru)

Дрожжи – это одноклеточные грибы с уникальными клеточными характеристиками, сочетающими черты растительных и животных клеток [1].

Дрожжи применяются в различных областях благодаря их уникальным свойствам: для производства хлеба, пива, вина, сыра, йогурта и других продуктов. Они играют ключевую роль в процессе брожения, преобразуя сахара в алкоголь и углекислый газ. Широко применяются в биотехнологических процессах для производства ферментов, белков и других биологически активных веществ. Дрожжи являются важными объектами в производстве медикаментов, вакцин и пробиотиков. Они также могут быть использованы в исследованиях по изучению механизмов заболеваний [2].

Мезофильные дрожжи, предпочитающие умеренные температуры, широко используются в пищевой промышленности, тогда как психрофильные дрожжи, способные расти при низких температурах, имеют потенциал для применения в различных отраслях, несмотря на меньшую изученность [3].

Данная проблема является актуальной, т.к. из-за нехватки информации о психрофильных дрожжах приводит к невозможности их использования в таких отраслях промышленности как медицина, биотехнология, фармакология и инженерная энзимология, где в силу их особенностей они бы смогли принести инновации и новые технологии.

Целью данных исследований являлось изучение и сравнение реакции психрофильных и мезофильных дрожжей на различные стрессовые факторы.

**Материал и методы.** В качестве объектов исследования выступали 6 видов дрожжей: 3 вида мезофильных дрожжей из коллекции культур микроорганизмов кафедры микробиологии биологического факультета БГУ (*Saccharomyces cerevisiae*,