

УДК 579: [663.12: 663.131]: 57.017

ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ДРОЖЖЕЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЧАЙНОГО ГРИБА (*MEDUSOMYCES GISEVII* LINDAU)

Байрамалиева Э. О.¹, Сидякин А. И.^{1,2}, Решетник Г. В.¹

¹Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия

²НПО Биотехсоюз, Москва, Россия

E-mail: elli94@list.ru

Из плодового тела и культуральной жидкости чайного гриба выделены и охарактеризованы морфологические и цитологические особенности тринадцати штаммов дрожжей. Установлено, что изученные штаммы на дифференциально-диагностических средах образуют типичные для дрожжей колонии: от 1 до 9 мм в диаметре, с плоским, почти каплевидным или конусовидным профилем, белые, бежевые или желтоватые, не выделяющие в питательные среды пигмент. Колонии изученных штаммов с ровным, слегка волнистым, ризоидным или амебовидным краем. Одиннадцать из исследованных штаммов имеют округлую форму клеток с размерами (Dxd) 4,5 – 6,5 × от 4,5 – 5,0 мкм, четыре штамма 2,0 – 2,8 × 2,0 – 2,9 мкм. Тринадцать штаммов размножаются почкованием. Один из исследованных штаммов – бинарным делением. Одиннадцать штаммов образуют псевдомицелий.

Ключевые слова: *Medusomyces gisevii*, дрожжи, штамм, чайный гриб, морфология колоний.

ВВЕДЕНИЕ

Дрожжи – один из самых массовых продуктов современной промышленной биотехнологии, т.к. наряду с простотой культивирования, нетребовательностью к промышленным субстратам и высокой интенсивностью роста и накопления биомассы являются продуцентами большого количества ценных в практическом отношении продуктов: кормового белка, аминокислот, витаминов, пигментов, каротиноидов и их производных, этанола и других [1–4].

Чайный гриб (комбуча) – *Medusomyces gisevii* Lindau сложный симбиотический «организм», состоящий из дрожжей и уксуснокислых бактерий. Как показывают многочисленные исследования, симбиотические компоненты чайного гриба могут использоваться в промышленной биотехнологии в качестве высокоэффективных источников различных продуктов с высокой ценностью [5].

В связи с вышесказанным актуальным является создание банка штаммов дрожжевой составляющей *Medusomyces gisevii* и дальнейшее изучение их морфолого-культуральных особенностей с целью последующее возможности использования в качестве высокоэффективного промышленного биологического агента.

Таким образом, в связи с вышесказанным, целью работы являлось исследование культурально-морфологических особенностей штаммов дрожжей, выделенных из чайного гриба.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Предкультивирование и выделение чистых культур дрожжей. В качестве исследуемого объекта выступала культуральная жидкость и «плодовое тело» *M. gisevii* (чайного гриба), отобранные на 10-е, 20-е и 30-е сутки культивирования этого симбиотического организма, при комнатной температуре по классической методике на питательной среде, состоящей из кипяченой водопроводной воды, сахарозы (10,0 %), настоя черного чая (0,1 %) [6–8].

Для выделения штаммов дрожжей, входящих в состав *Medusomyces gisevii*, «плодовое тело» с его культуральной жидкостью измельчали в гомогенизаторе при 5000 об/мин в течение 5 минут. Гомогенат в количестве 1 – 2 % вносили в литровые колбы с 200 мл жидкой стандартной питательной среды MRS [9], в которую для создания селективных условий культивирования (подавления роста посторонней микрофлоры, выделения максимального штаммового разнообразия по признаку устойчивости к этанолу) вносили этанол от 1 до 10 %. Инокулированные гомогенатом чайного гриба питательные среды культивировали на качалке при 280 – 300 об/мин в течение четырнадцати суток. Ежедневно из колб на качалке отбирали 0,1 мл культуральной жидкости, которую высевали на агаризованную питательную среду MRS, содержащую этиловый спирт в концентрации от 1 до 10 %. Выделение чистых культур проводили по методу Дригальского, с последующей доочисткой методом посева «штрихом», как это принято в работах по микробиологии [10]. В результате проведенных экспериментов по получению чистых культур дрожжей из чайного гриба и созданию коллекции таких штаммов нами коллекция штаммов чистых культур дрожжей *Medusomyces gisevii*, включенных в генеральную коллекцию производственно – ценных штаммов микроорганизмов НПО Биотехсоюз, из которой, для дальнейшего исследования морфологических особенностей нами случайно отобрано тринадцать штаммов.

Изучение морфолого-культуральных особенностей. Проводили на питательных средах: виноградное сусло-агар (не консервированный виноградный сок – 50,0 %; агар – 2,0 %, дистиллированная вода до 100%, pH до автоклавирования 7,0 – 7,2), среда Сабуро [11]; морфологический агар, глюкозо-пептонная среда [12].

Образование мицелия и псевдомицелия изучали на кукурузном агаре с использованием метода культур на стекле («slide-culture») [9].

В ходе выполнения исследований и при оформлении работы использовали следующее **программное обеспечение**: внутреннее приложение Windows XP и пакет прикладных программ Microsoft Office. Фотосъемку проводили цифровой фотокамерой Nikon COOLPIX A10 (Nikon Corp., Japan). Микрофотосъемку осуществляли цифровой фотокамерой TC-500 (5,0 Мпикс), интегрированной с системой анализа и обработки изображений Micro Анализ View (версия 3.01); измерение размеров клеток проводили на микрофотографиях при помощи пакета прикладных программ ImageTool v 3.00 (UTHSCSA). Фотографии и рисунки обрабатывались при помощи пакета прикладных программ CorelDraw 13.0.

Статистическая обработка данных. Все эксперименты проводили в трехкратной биологической и двукратной аналитической повторности, полученные

экспериментальные данные подвергались статистической обработке с помощью методов статистического анализа [13–15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для проведения исследований нами отобрано 13 штаммов чистых культур дрожжей *Medusomyces gisevii*: 3 штамма (№№ 001, 003, 018), выделенные на среде с концентрацией этанола 6 %, 3 штамма (№№ 005, 009, 020), выделенные на среде с концентрацией этанола 7 %, 2 штамма (№№ 007, 010), выделенные на среде с концентрацией этанола 5 %, 1 штамм (№ 004), выделенный на среде с концентрацией этанола 2 %, 1 штамм (№ 013), выделенный на среде с концентрацией этанола 1 %, 1 штамм (№ 002), выделенный на среде с концентрацией этанола 10 %, 1 штамм (№ 021), выделенный на среде с концентрацией этанола 9 %, 1 штамм (№ 008) выделенный на среде с концентрацией этанола 4 %.

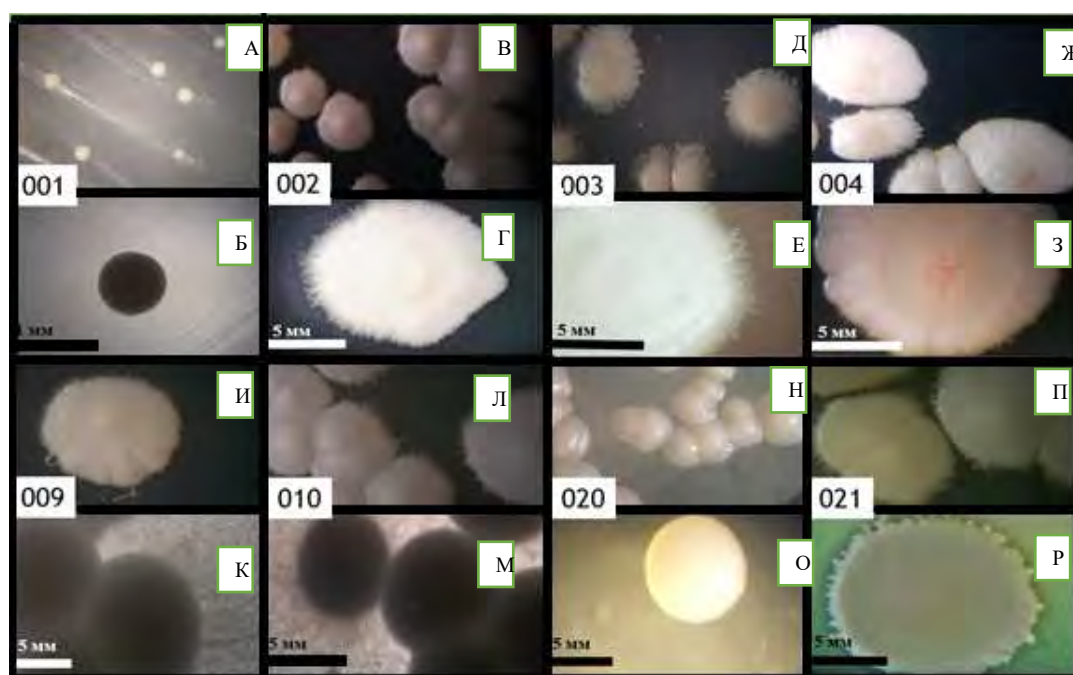


Рис. 1. Морфология наиболее типичных колоний дрожжей (на рисунке указаны номера штаммов), выделенных из чайного гриба, при их культивировании на питательной среде виноградное сусло-агар (А, В, Д, Ж, И, Л, Н, П – общий вид колоний под биноклем (ув. $\times 24$); Б, Г, Е, З, К, М, О, Р – морфология колонии под микроскопом (ув. $\times 100$)).

Штаммы дрожжей, выделенные из чайного гриба при их культивировании на питательной среде Сабуро образуют колонии непрозрачные, округлой, ризоидной или

неправильной формы, диаметром от одного до десяти миллиметров с конусовидным или выпуклым профилем, бежевой пигментацией, с фестончатым краем.

Штамм 001 на среде Сабуро, на третьи сутки роста образует точечные, непрозрачные, с ровным краем, просвечивающие белесые колонии. На 30-е сутки культивирования колонии непрозрачные, бежевые, с ровным краем диаметром $2,0 \pm 0,1$ мм. На среде морфологический агар на третьи сутки колоний не образуется, к 30 суткам культивирования образуются точечные колонии. На питательной среде глюкозо-пептонный агар на третьи сутки культивирования колонии точечные, которые к 30 суткам выращивания достигают $3,0 \pm 0,15$ мм в диаметре, бежевые, непрозрачные, с ровным краем, выпуклые. На среде виноградное суло-агар ни к третьим, ни к 30-м суткам колоний не образуется. Выдерживает концентрацию спирта в среде до 6 %.

Клетки штамма 001 на исследованных плотных питательных средах округлые, $5,9 \times 5,0$ мкм не образуют псевдомицелий, размножаются почкованием. В жидких средах клетки эллипсоидные, слегка вытянутые ($5,7 \times 5,2$ мкм), размножаются почкованием. На кукурузном агаре, при исследовании методом «slide-culture» образуют псевдомицелий.

Штамм 002 на среде Сабуро, на третьи сутки роста образует округлые, бежевые, гладкие непрозрачные, с ровным краем колонии средних размеров (2,0 мм в диаметре). На 30-е сутки культивирования колонии крупные – в диаметре 10,0 мм, округлые, бежевые, с ризоидным краем и конусовидным профилем. На виноградном сусле-агаре колонии на третьи сутки диаметром 1,0 мм, округлые, бежевые, гладкие, не прозрачные; на 30 е сутки культивирования колонии диаметром 5,0 мм, округлые, белесые, с фестончатым краем и выпуклым профилем. На морфологическом агаре колонии штамма 002 диаметром 1,0 мм, округлые, бежевые, гладкие, не прозрачные. К 30-м суткам колонии средние (диаметром 5,0 мм) округлые, белесые, с фестончатым краем и выпуклым профилем. На глюкозо-пептонной питательной среде колонии этого штамма 1,5 мм в диаметре, округлые, бежевые гладкие, не прозрачные. Месячные культуры около 6,0 мм в диаметре, округлые, белые, с ризоидным краем и конусообразным профилем. Выдерживает концентрацию спирта в среде до 8 %.

Клетки штамма 002 на плотных и жидких питательных средах овальные диаметром $7,8-7,9 \times 5,2$ мкм, размножаются почкованием. На кукурузном агаре, при исследовании методом «slide-culture» образуют псевдомицелий.

На виноградном сусле штамм 003 после трех суток культивирования образует колонии 1,0 мм в диаметре, округлые, бежевые, гладкие, не прозрачные. К 30-м суткам колонии диаметром 5,0 мм, бежевые, гладкие, округлые, выпуклые, с фестончатым краем. На среде Сабуро колонии штамма 003 к третьим суткам 1,5 мм, округлые, бежевые, гладкие и непрозрачные. Через месяц культивирования колонии крупные (9,0 мм), округлые, бежевые, с ризоидным краем, конусовидным профилем. На питательной среде морфологический агар как на третьи, так и на 30 сутки выращивания колонии штамма 003 точечные, просвечивающие. На глюкозопептонной среде на третьи сутки после посева колонии 2,0 мм в диаметре, округлые, бежевые, гладкие, не прозрачные. Через 30 суток выращивания колонии

крупные – 9,0 мм в диаметре, округлые, бежевые, с фестончатым краем и конусообразным профилем. Устойчивы к концентрации этанола в среде до 8 %. Клетки штамма 003 на плотных питательных средах округлые ($D \times d = 6,1 \times 5,5$ мкм), в жидких средах – яйцевидные ($D \times d = 6,3 \times 5,1$ мкм), размножаются почкованием. На кукурузном агаре образуют псевдомицелий.

На виноградном сусле и питательной среде Сабуро штамм 004 на третьи сутки культивирования образует округлые, бежевые, гладкие, не прозрачные, с ровным краем колонии. Через месяц культивирования колонии штамма 004 диаметром 4,0 мм, округлые, бежевые, с ризоидным краем и выпуклым профилем. На питательной среде Сабуро колонии диаметром 5,0 мм, округлые, оранжевые, с ризоидным краем и конусовидным профилем. На морфологическом агаре на третьи и тридцатые сутки выращивания колонии штамма 004 точечные. На глюкозо-пептонной среде на третьи сутки штамм 004 образует колонии диаметром 2,0 мм, округлые, бежевые, гладкие, не прозрачные. Через 30 суток культивации на глюкозо-пептонной среде образуются колонии диаметром 9,0 мм, округлые, бежевые с фестончатым краем и конусообразный профилем. Выдерживает концентрацию спирта в среде до 8 %. На плотных средах клетки штамма 004 округлые или слегка яйцевидные ($D \times d = 6,4 \times 4,9-5,0$ мкм), размножаются почкованием, на кукурузном агаре образуют псевдомицелий.

На виноградном сусле – агаре штамм 005 на третьи сутки образует точечные колонии, после 30 суток культивирования колонии диаметром 7,0 мм, округлые, белые, с ризоидным краем и выпуклым профилем. На среде Сабуро на третьи сутки после посева колонии диаметром 2,0 мм, округлые, бежевые, гладкие не прозрачные. Колонии месячного возраста диаметром 5,0 мм, округлые, белые, с конусовидным профилем и ризоидным краем. На питательной среде морфологический агар колонии штамма 005 после трех суток культивирования диаметром 1,0 мм, округлые, бежевые, гладкие, не прозрачные. Через 30 суток после посева колонии диаметром 3,0 мм, округлые, бежевые, с выпуклым профилем и фестончатым краем. На глюкозо-пептонной среде колонии штамма 005 после трех суток культивирования мелкие (диаметром 1,5 мм), бежевые, гладкие, не прозрачные. На тридцатые сутки культивирования колонии средних размеров (3,0 мм), округлые, бежевые с выпуклым профилем и ризоидным краем. Устойчивы к концентрации этанола в среде до 8 %. При исследовании цитоморфологических особенностей на плотных питательных средах штамма 005 клетки округлые или слегка яйцевидные ($D \times d = 8,3 \times 5,6$ мкм), размножаются почкованием, на кукурузном агаре образуют псевдомицелий, в жидких средах наблюдалась идентичная картина, различия лишь в несколько мкм.

Штамм 007 на среде Сабуро, на третьи сутки роста образует непрозрачные, округлые, с ровным краем, бежевые колонии диаметром $1,5 \pm 0,1$ мм. На 30-е сутки культивирования колонии непрозрачные, бежевые, с ризоидным краем и конусовидным профилем диаметром $5,0 \pm 0,1$ мм. На виноградном сусле образуют колонии округлые, бежевые, гладкие, не прозрачные диаметром 2,0 мм. На тридцатые сутки колонии диаметром $6,0 \pm 0,2$ мм, округлые, бежевые с ризоидным краем и выпуклым профилем. На кукурузном агаре, при исследовании методом

«slide-culture» образуют псевдомицелий. На среде морфологический агар и глюкозо-пептонный агар на третьи и тридцатые сутки культивирования образуются точечные колонии. Выдерживает концентрацию спирта в среде до 6 %. На плотных средах клетки штамма 007 округлые ($D \times d = 6,1 \times 5,2-5,4$ мкм), размножаются почкованием, образуются псевдомицелий.

Штамм 008 на плотных питательных средах образуют колонии точечных размеров на протяжении всего периода культивирования. Выдерживает концентрацию спирта в среде до 6 %. А исследование цитоморфологии показало, что клетки круглые ($D \times d = 2,7 \times 2,5$ мкм), размножаются почкованием, образуют псевдомицелий.

На питательной среде виноградное сусло-агар штамм 009 колонии на третьи сутки культивирования средних размеров (1,0 мм) округлые, бежевого оттенка, гладкие, не прозрачные. На тридцатые сутки культивирования колонии крупные, (6 мм в диаметре), бежевые, с ризоидным краем и выпуклым профилем. На питательной среде Сабуро образуют колонии непрозрачные, округлой или неправильной формы диаметром от одного до одиннадцати миллиметров с плоским, конусовидным или выпуклым профилем, белесой или бежевой пигментацией, с ровным или зубчатым краем. На питательной среде морфологический агар образуют колонии непрозрачные, неправильной формы диаметром от одного до восьми миллиметров с выпуклым профилем бежевой пигментацией, с зубчатым краем. При культивировании на глюкозо-пептонной питательной среде к 3 суткам образуют колонии средних размеров (1,5 мм), бежевой окраски с гладким профилем и ровным краем. На 30 сутки колонии до 6 мм в диаметре с ризоидным краем, бежевые с выпуклым профилем. На кукурузном агаре, при исследовании методом «slide-culture» образуют псевдомицелий. Устойчивы к концентрации этанола в среде до 8 %. Клетки штамма 009 на плотных питательных средах округлые ($D \times d = 7,3 \times 5,2$ мкм), в жидких средах – овальные ($D \times d = 7,3 \times 5,1$ мкм), размножаются многосторонним почкованием.

Штамм 010 на виноградном сусле-агаре на третьи сутки образует колонии точечных размеров. К 30 суткам культивирования колонии диаметром 9,0 мм, округлые, бежевые, гладкие, не прозрачные с конусообразным профилем. На питательной среде Сабуро образуют колонии округлые, бежевые, гладкие, не прозрачные диаметром 1,0 мм. После тридцати дней культивирования колонии диаметром 11,0 мм, округлые, белесые, с ризоидным краем и конусовидным профилем. На питательной среде морфологический агар после месячного культивирования колонии достигают точечных размеров. На глюкозо-пептонной среде на третьи сутки штамм 010 образует колонии диаметром 2,0 мм, округлые, бежевые, гладкие, не прозрачные. Через 30 суток культивации на глюкозо-пептонной среде образуются колонии диаметром 9,0 мм, округлые, бежевые с фестончатым краем и выпуклым профилем. Устойчивы к концентрации этанола в среде до 8 %. При исследовании цитоморфологических особенностей на плотных питательных средах штамма 010 клетки эллипсоидные ($D \times d = 6,0 \times 4,8$ мкм), размножаются почкованием, на кукурузном агаре образуют псевдомицелий, в жидких-наблюдалась схожая картина, различия лишь в несколько мкм.

Штамм 013 на плотных питательных средах образуют колонии точечных размеров даже после тридцати дней культивирования. Лишь на виноградном сусле-агаре сформировались колонии бежевой пигментации с фестончатым краем, выпуклым профилем и диаметром 5,0 мм. На кукурузном агаре, при исследовании методом «slide-culture» образуют псевдомицелий. Устойчивы к концентрации этанола в среде до 8 %. Выдерживает концентрацию спирта в среде до 8 %. Клетки на плотных питательных средах округлые ($D \times d = 5,0 \times 4,5$ мкм), в жидких средах – эллипсоидные ($D \times d = 5,3 \times 4,6$), размножаются почкованием.

Штамм 015 на плотных питательных средах образуют колонии точечных размеров на протяжении всего периода культивирования. На питательной среде Сабуро, после тридцати дней культивирования, штамм 018 образуют колонии непрозрачные, округлой или неправильной формы, диаметром 2 мм, с выпуклым профилем, бежевой пигментацией, с ровным краем. На глюкозо-пептонной питательной среде образуют колонии непрозрачные, неправильной формы диаметром 6 мм, с выпуклым профилем, белесой пигментацией, с ровным краем. На других испытуемых питательных средах штамм не показал признаков роста. Устойчивы к концентрации этанола в среде до 6 %. Клетки штамма 015 на плотных питательных средах округлые ($D \times d = 2,7 \times 2,8$ мкм), в жидких средах – яйцевидные ($D \times d = 2,5 \times 2,7$ мкм), размножаются почкованием. На кукурузном агаре псевдомицелий образуют.

Штамм 020 на третьи сутки культивирования на питательной среде виноградное сусле-агар образуют колонии диаметром 1 мм. А вот после тридцати дней выращивания образуются колонии непрозрачные, округлой формы диаметром 10 мм с выпуклым профилем, белесой пигментацией, с зазубренным краем. Аналогичная ситуация наблюдалась и на питательной среде Сабуро. На питательной среде морфологический агар после тридцати дней нахождения в термостате штамм образует колонии не прозрачные, чаще округлой формы, диаметром 3 мм, с выпуклым профилем, бежевой пигментацией, с фестончатым краем. На глюкозо-пептонной питательной среде после длительного выращивания образуются колонии непрозрачные, неправильной формы диаметром 9 мм, с выпуклым профилем, бежевой окраски, с фестончатым краем. Устойчивы к концентрации этанола в среде до 8 %. При исследовании цитоморфологических особенностей на плотных питательных средах штамма 020 клетки эллипсоидные ($D \times d = 6,2 \times 4,0$ мкм), размножаются почкованием, на кукурузном агаре образуют псевдомицелий, в жидких-наблюдалась схожая картина, различия лишь в несколько мкм.

Штамм 021 на среде Сабуро, на третьи сутки роста образует непрозрачные, с ровным краем, диаметром 2 мм, бежевые колонии. На 30-е сутки культивирования колонии непрозрачные, бежевые, с ризоидным краем диаметром $10,0 \pm 0,1$ мм. На среде морфологический агар к 30 суткам культивирования образуются точечные колонии. На питательной среде виноградное сусле-агар на третьи сутки культивирования колонии точечные, которые к 30 суткам выращивания достигают $6,0 \pm 0,15$ мм в диаметре, бежевые, непрозрачные, с ризоидным краем, выпуклые. На среде глюкозо-пептонный агар ни к третьим, ни к 30-м суткам колоний не образуется. Выдерживает концентрацию спирта в среде до 6 %. Клетки штамма 021 на плотных и жидких питательных средах овальные, эллипсоидные, диаметром

(Dxd = 7,8×5,2 мкм), размножаются почкованием. На кукурузном агаре, при исследовании методом «slide-culture» образуют псевдомицелий.

Так как описываемые культуры выделялись на питательных средах, содержащих этанол в различных концентрациях, то определенный интерес вызывает спиртоустойчивость полученных штаммов, как их физиолого-биологическая характеристика.

Спиртоустойчивость исследовалась на стандартной MRS среде, методом пластинок. В среду перед разливкой в чашки прибавляли этанол в концентрациях от 2 до 18 %. Посевы инкубировали после инокуляции в течение недели для выявления.

Наиболее интересными из изученных штаммов представляются следующие штаммы: № 002, 003, 009, 010, так как у них наблюдается наиболее интенсивный рост (к 30-м суткам культивирования образуют гигантские колонии). Штаммы № 002, 004, 009, 021 отличаются активным ростом на синтетических питательных средах (например, морфологический агар). К 30 суткам культивирования штамм № 004 меняет свою окраску на ярко-оранжевую.

Клетки всех штаммов дрожжей, выделенных из чайного гриба, размножаются почкованием, кроме штамма №008, который размножается бинарным делением, что свидетельствует о его возможной принадлежности к роду *Schizosaccharomyces*, представители данного рода являлись характерными представителями микробиоты *Medusomyces gisevii* и описаны ранее в работах [16, 17].

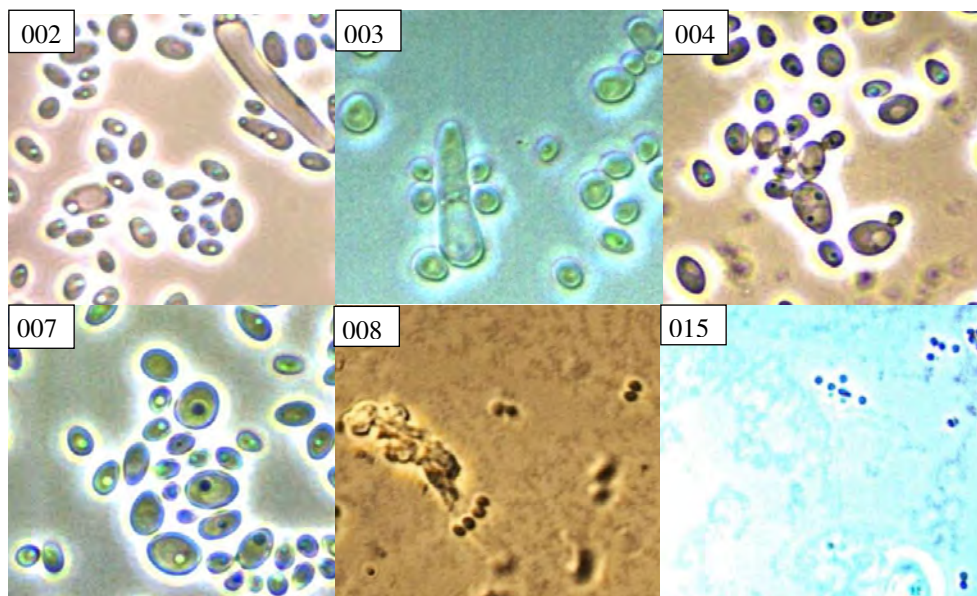


Рис. 2. Цитоморфологические особенности штаммов дрожжей, выделенных из *M. gisevii*: штаммы №002, 003, 004, 007, 015 – клетки округлые, вплоть до овальных, размножаются почкованием; штамм 008 – клетки округлые, размножаются бинарным делением. (Питательная среда виноградное сусло-агар, 30-е сутки культивирования, препарат раздавленная капля, фазово-контрастная микроскопия ув. × 1000)

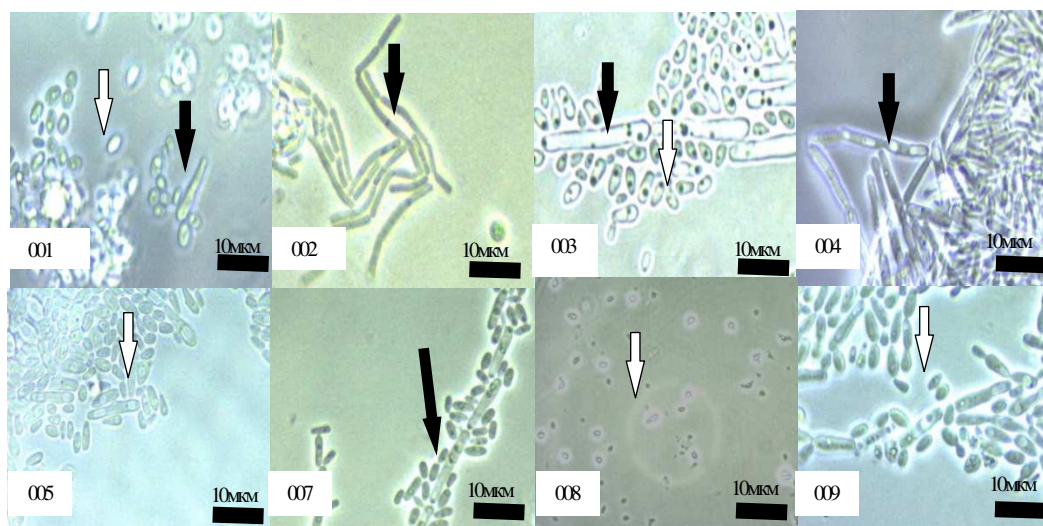


Рис. 3. Пример образования псевдомицелия штаммами дрожжей, выделенными из *Medusomyces gisevii*. Штаммы №№ 001, 002, 003, 004, 005, 007, 009 образуют псевдомицелий (клетки псевдомицелия отмечены черными стрелками). Штаммы № 008, 015 псевдомицелий не образует. Метод «slide-culte», кукурузный агар, ув. × 400. (Белыми стрелками отмечены клетки, образовавшиеся в результате почкования или деления).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для тринадцати изолятов дрожжей, выделенных из культуральной жидкости и «плодового тела» чайного гриба исследованы морфолого-культуральные, цитоморфологические и физиолого-биохимические особенности и свойства.

Изученные штаммы на дифференциально-диагностических средах образуют типичные для дрожжей колонии: от одного до девяти миллиметров в диаметре, с плоским, почти каплевидным или конусовидным профилем; белые, бежевые или желтоватые, не выделяющие в питательные среды пигмент, с ровным, слегка волнистым, ризоидным или амёбовидным краем.

Десять из тринадцати исследованных культур имеют округлую форму клеток. Размеры клеток штаммов варьируют от 4,5 до 6,5 мкм в длину и от 4,5 до 5,0 мкм в ширину. Клетки штаммов № 001, 002, 003, 004, 005, 007, 009, 010, 013, 020, 021 размножаются почкованием, а штамм № 008 размножается бинарным делением. Клетки штаммов № 001, 008, 015, 018 значительно мельче остальных культур (2x2,5 мкм). Штаммы № 001, 002, 003, 004, 005, 007, 009, 010, 013, 020, 021 образуют псевдомицелий. В дальнейшем планируются исследования физиолого-биохимических особенностей и определение видовой принадлежности исследуемых штаммов.

Список литературы

1. Патент РФ № 21033510/13, 27.01.1998. Штамм дрожжей *Rhodotorula glutinis* – продуцент каротиноидов. / Авчиева П.Б., Буторова И.А., Вустин М.М. // Патент России № 21033510/13. 1998. Бюл. №3.
2. Воробьева Л. И. Промышленная микробиология. / Воробьева Л. И. – М., МГУ, – 1989. – Т. 21, вып. 5 – С. 958–962.
3. Патент РФ № 2284355/C12P7, 27.09.2006. Способ получения этанола. / Лагутина Т.Б. // Патент России № 2284355 C12P7.2006. № Бюл. 27.
4. Розанов А.С. Рекомбинантные штаммы *Saccharomyces cerevisiae* для получения этанола. / Розанов А.С., Котенко А.В., Акбардин И.Р., Пельтек С. Е. // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2014. – С. 989–900.
5. Pedersen J. A. Kombucha: a tasty Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts. / J. A. Pedersen – 2013. – P. 91–95.
6. Даниелян Л. Т. Чайный гриб (kombucha) и его биологические особенности / Л. Т. Даниелян. – М. : ОАО изд-во «Медицина», 2005. – 156 с.
7. Даниелова Л. Т. К морфологии чайного гриба / Л. Т. Даниелова. – М. : Мир. – 1954. – С. 35–49.
8. Барбанчик Г. Ф. Чайный гриб и его лечебные свойства / Г. Ф. Барбанчик. – Омск. : Омское книжное издательство, 1957. – 56 с.
9. De Man J. C. A Medium for the Cultivation of Lactobacilli / J. C. De Man, M. Rogosa, M. Sharpe // Appl. Bact. – 1960. – 196023 – P. 130–135.
10. Бабьева И. П. Биология дрожжей / И. П. Бабьева, И. Ю. Чернов. – М. : Мир, 2004. – С. 221.
11. ГОСТ 10444.1-84. Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе. – Москва: ИПК Изд-во стандартов, 2017. – 16 с.
12. Бабьева И. П. Методы выделения и идентификации дрожжей / И. П. Бабьева, В. И. Голубев // Пищевая промышленность. – 1979. – С. 76–86.
13. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. – 4-е изд., пер. и доп. – М.: Высшая школа, 1990. – 354 с.
14. Плохинский Н. А. Математические методы в биологии / Н. А. Плохинский. – М.: изд-во МГУ, 1978. – 265 с.
15. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика / П. Ф. Рокицкий. – 3-е изд., испр. – Минск: Вышш. школа, 1973. – 320 с.
16. Mayser P. The yeast spectrum of the «tea fungus kombucha» / Mayser P., Fromme S., Leitzmann C., & Grunder K. // Mycoses. – 1995 – 38 – P. 289–295.
17. Берри Д. Биология дрожжей / Д. Берри. – М. : Мир. – 1985. – С. 96.

STUDY OF MORPHOLOGICAL-CULTURAL AND CYTOLOGICAL
FEATURES OF THE STRAINS OF YEAST OF KOMBUCHA (*MEDUSOMYCES
GISEVII LINDAU*)

Bayramaliyeva E. O.¹, Sidyakin A. I.^{1,2}, Reshetnik G. V.¹

¹*V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Crimea, Russia*

²*Research and production association Biotechsoyuz, Moscow, Russian Federation*

E-mail: elli94@list.ru

The purpose of this work is to study the strains of yeast of kombucha (*Medusomyces gisevii Lindau*) with the aim of further opportunity to use it as highly efficient manufacturing biological agent.

As a result of conducted experiments, morphological and cytological features of fourteen strains of yeast have been isolated and characterized from the fruit body and culture fluid of kombucha.

The collection of 54 strains of pure cultures of yeast *Medusomyces gisevii*, which are included in the general collection of valuable for manufacturing strains of microorganisms of research and production association Biotechsoyuz, has been created. From the collection of 54 strains, 14 strains of pure cultures of yeast *Medusomyces gisevii*, which differ by morphological features and by the growth ability on nutrient media with various (from 1 to 10 % volume per volume) ethanol strength, have been selected.

On the differential-diagnostic media, the studied strains form colonies, which are typical for the yeast: from 1 to 9 mm in diameter, with a flat, almost drop-shaped or conoid profile; are white, beige or yellowish, do not evolve pigment into the nutrient media, with an even, slightly wavy, rhizoid or ameboid edge.

The most interesting of the studied strains are the following: No. 002, 003, 009, 010, as they demonstrate the most intensive growth (they form giant colonies by the 30th day of cultivation). The strains No. 002, 004, 009, 021 are distinguished by active growth on synthetic nutrient media (for example, morphological agar). By the 30th day of cultivation, the strain No. 004 changes its color to bright orange.

In the study of cytomorphological features of the studied strains (sizes, shape and methods of cells expansion: division or budding), it was found that the studied strains of yeast, isolated from *Medusomyces gisevii*, form cells of round, circular, oval, ellipsoid shapes, ranging in size from ($D \times d$) $8,0 \times 5,8 \mu\text{m}$ to $2,2 \times 2,3 \mu\text{m}$ at their cultivation on the following media: grape must agar, Sabouraud, glucose-peptone medium, or morphology agar. In the study of the ability to form a pseudomycelium using slide culture method, the strains No. 001, 002, 003, 004, 005, 007, 009, 010, 013, 020, 021 form pseudomycelium; the strains No. 008, 015, 018 do not form pseudomycelium.

Five of the fourteen studied strains studied are able to form pseudomycelium under standard cultivation conditions (both at the cultivation on the liquid medium and at the cultivation on solid media).

The cells of all strains of yeast, which have been isolated from the kombucha, propagate by gemmation, except the strain No.008, which propagates by binary fission. This indicates its possible belonging to the genus *Schizosaccharomyces*; the representatives of this genus were typical representatives of microbiota *Medusomyces gisevii* and have been described earlier in the works of Reiss Y, Mayser, P., Fromme, S., Leitzmann, C.

Keywords: *Medusomyces gisevii*, yeast, strain, kombucha, morphological features.

References

1. Patent 21033510, 27.01.1998 Strain of yeast *Rhodotorula glutinis* – producer of carotenoids, Patent Russia. Published 27.01.98. Bulletin No.3., Avchiyeva P. B., Butorova I. A., Vustin M. M
2. Vorob'yova L.I., *Industrial microbiology*, **21**, **5**, 958 (Moscow State University, 1989).
3. Patent of Russian Federation No. 2284355 C12P7/06. Technique of ethanol production 27, (1998).
4. Rozanov A. S., Kotenko A. V., Akbardin I. R., Peltek S. E., Recombinant strains of *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production, *Vavilov Journal of Genetics and Selection*, **18**, 989 (2014).
5. Pedersen J. A. Kombucha: a tasty Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts, *Microbiology*, 91 (2013).

6. Danielyan L.T. *Tea fungus (kombucha) and its biological features*, 156 (Medizina, 2005).
7. Danielova L.T. *Morphology of kombucham*, 35 (Moscow Mir, 1954).
8. Barbanchik G.F. *Kombucha and its healing qualities*, 56, (Omskoye knizhnoye izdatel'stvo, 1957).
9. De Man J.C., Rogosa M., Sharpe M. A Medium for the Cultivation of Lactobacilli, *Appl. Bact.* 130, (1960).
10. Bab'yeva I. P., Chernov I. Y., *Yeast biology*, 22 (Tovarishchestvo nauchnykh izdaniy KMK, 2004).
11. State standard GOST 10444.1-84. Canned foods. Preparation of reagent solutions, dyes, indicators and culture media for microbiological analysis, *Publ Standart*, 16 (2017).
12. Bab'yeva I.P., Golubev V.I., *Methods of isolation and identification of yeast*, 76 (Pishcheyaya prom-st', 1979).
13. Lakin G.F., *Biometry*, 354, (Moscow: Vysshaya shkola, 1990).
14. Plokhinskiy N.A., *Mathematical methods in biology*, 265, (publ. of the Moscow State University, 1978).
15. Rokitskiy P.F., *Biological statistics*, 320 (Minsk Vyssh. shkola, 1973).
16. Mayer P., Fromme S., Leitzmann C., Gru È., The yeast spectrum of the "tea fungus kombucha, *Mycoses*, **38**, 295 (1995).
17. Berri D., *Yeast biology*, 96, (Moscow: Mir, 1985).