

УДК 663.252.41:663.2

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ДРОЖЖЕЙ, ОБИТАЮЩИХ В УСЛОВИЯХ ВИНОГРАДНИКОВ ДАГЕСТАНА

Е. С. Магомедова, Д. А. Абдуллабекова,
Г. Г. Магомедов, Д. А. Аливердиева

Прикаспийский институт биологических ресурсов ДНЦ РАН

Проведено изучение состава дрожжевых грибов виноградников Дагестана, получены сведения об их численности и видовом разнообразии. Максимальные значения численности характерны для опада, минимальные – для почвы. В ходе проведения исследования с различных субстратов виноградника выделено 42 вида дрожжевых грибов. Наибольшее видовое разнообразие среди всех проанализированных субстратов обнаружено на ягодах. Отмечены часто встречаемые виды. Показано, что формирующееся на винограде сообщество дрожжевых грибов включает ресурсные виды, в том числе *Saccharomyces cerevisiae*, представляющие интерес для биотехнологии. Проведен отбор штаммов, потенциально перспективных для бродильных производств.

The composition of yeast fungus inhabiting the vinelands of Daghestan is studied and collected is the information on their population and species diversity. Maximal population values are typical for the litter fall and minimal – for the soil. During the investigation 42 species of yeast were extracted from various substrates of vinelands. The biggest diversity in species among all the analyzed substrates was found on the grape fruits. The most constant species are identified. It is shown that the population of yeast formed on the grapes involves resources species including *Saccharomyces cerevisiae* which are of interest for biotechnologies. Selection of strains potentially useful for the fermentation industry is performed.

Ключевые слова: дрожжи; виноградник; почва; численность; виды; биотехнология.

Keywords: yeast; vineyard; soil; number; species; biotechnology.

Функциональное разнообразие, свойства, сравнительная простота организации и высокие темпы роста микроорганизмов, участвующих во многих природных процессах, определяют их важнейшую и незаменимую роль, а также широкое использование при решении большого числа научных и практических задач. Изучение микробного мира обуславливает возможность формирования общих представлений об организации и структуре биоты, позволяет расширить сведения о микробных ресурсах России, содействовать их оценке и возможному использованию.

Несмотря на то что дрожжи, как ни одна из групп микроорганизмов, использовались человеком с давних времен, зарождение научных знаний о них началось лишь с 30-х гг. XIX в. Возникли новые научные направления, дрожжи получили широкое использование в биотехнологии, начало развиваться экологическое изучение дрожжей, играющих важную роль в формировании знаний об их биоразнообразии, закономерностях распространения в природе, поиске и селекции новых видов.

Важную роль экологические исследования играют в развитии знаний о биоразнообразии дрожжей, закономерностях их распространения в природе, поиске и селекции новых видов. Именно в результате таких работ за последние несколько десятилетий представление о границах этой группы грибов претерпело существенную эволюцию, главной особенностью которой является переход от таксономического содержания понятия «дрожжи» к «экологическому», соответствующему понятию «экоморфа».

Сведения о распространении дрожжей в различных природных местообитаниях, в разных географических регионах, полученные за последние несколько десятилетий, показывают, что они могут служить эффективной модельной группой не только для изучения биохимии и генетики эукариотических организмов, но и для решения ряда общих проблем микробной экологии. Появилась возможность обсуждать экологические проблемы, первоначально сформулированные в геоботанике и синэкологии животных: количественная оценка разнообразия, экологическая целостность высших таксонов, подходы к классификации сообществ. Такие вопросы до настоящего времени практически не возникали в микробной экологии в силу значительной обособленности ее развития от «классической» экологии растений и животных, прежде всего из-за методических сложностей изучения структуры микробных сообществ [1].

Одним из традиционных направлений в микологии остается изучение дрожжевых грибов, ассоциированных с виноградом, на примере которого впервые было выявлено их видовое разнообразие в природе. Результаты исследований дрожжей, обитающих на различных субстратах виноградников и местах переработки винограда, активно проводимых с начала XX в. в винодельческих странах, в том числе в республиках бывшего СССР, внесли большой вклад в развитие их классификации и систематики.

Современный период изучения дрожжевых грибов в природных местообитаниях, в том числе виноградников, характеризуется интенсивным применением молекулярно-биологических методов видовой идентификации. Их активное использование наблюдается в исследованиях, выполняемых в европейских странах с развитым виноделием, имеются сведения о проведении работ такой направленности в развивающихся азиатских и южноамериканских регионах производства вин [2–6].

Однако в России, где развитие виноградарства и виноделия в южных районах насчитывает не один десяток лет, данная тема оставалась практически не затронутой.

В связи с этим в Республике Дагестан, одном из традиционных регионов виноделия страны, были начаты работы по изучению таксономического состава дрожжей виноградников в свете современных представлений об этой группе грибов и их систематике.

Цель работы – выявить таксономический состав и численность дрожжевых грибов, обитающих на виноградниках Дагестана; дать оценку их потенциала как ресурса для биотехнологии.

Объект и методы исследования

Объект исследования – дрожжевые грибы, изолированные с различных типов субстратов виноградников: виноградное растение (ягоды, листья, другие части растения) опад, почва.

Виноградники расположены в 10 хозяйствах на территории 5 районов Центрального, Южного и Северного Дагестана. Дрожжи изолировали с трех сортов – Бианка, Ркацители, Молдова, произрастающих как в условиях крупных посадок (промышленные виноградники), так и в виде небольших участков (фермерские хозяйства). Пробы отбирали в 6–9 точках участка в период зрелости гроздей и в годовой динамике, применяя вертикально-ярусный подход, предусматривающий одновременный анализ образцов – живое растение, опад, почва,

позволяющий с большой достоверностью проводить изучение дрожжевых грибов в синэкологическом и биогеографическом аспектах.

При изоляции дрожжей с различных субстратов растения и почвы использовали метод накопительных культур и прямой способ посева с предварительной десорбцией дрожжевых клеток, принятые в микробиологии. Дрожжи рассеивали на виноградное сусло-агар и глюкозо-пептонную дрожжевую среду (GPY agar) в чашки Петри, инкубировали при комнатной температуре. На 5-6-е сутки проводили дифференцированный подсчет выросших колоний с учетом их макроморфологических признаков, по 2-3 колонии каждого типа выделяли в чистую культуру.

Видовую идентификацию дрожжевых грибов проводили на основе анализа нуклеотидных последовательностей ITS1-5.8S-ITS2 региона и D1/D2 доменов региона 26S (LSU) рДНК. Выделение ДНК и проведение ПЦР осуществляли по предлагаемой в литературе методике [7]. Для амплификации использовали праймеры ITS1f (5'CTTGGTCATTTAGAGGAAGTA) и NL4 (5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG). Секвенирование амплифицированного региона производили в Научно-производственной компании «Синтол» (Москва). Видовую идентификацию осуществляли сравнением полученных нуклеотидных последовательностей с данными, размещенными в генбанке NCBI (ncbi.nlm.nih.gov) и базе данных CBS (cbs.knaw.nl).

Результаты и их обсуждение

В ходе проведения многолетнего исследования таксономического состава дрожжевых грибов виноградников Дагестана выявлено 42 вида, принадлежащих 21 роду (см. таблицу). Наиболее разнообразны в представленном списке аскомицеты (19 родов), большинство из которых относятся к 3 родам: *Candida* (9 видов), *Pichia* (6 видов) и *Metschnikowia* (4 вида).

Видовой состав дрожжевых грибов на растительных субстратах виноградников Дагестана

Виды дрожжей		
Субстрат выделения		
виноградное растение		почва
ягоды	другие части растения	
<i>Aureobasidium pullulans</i> **	<i>Aureobasidium pullulans</i> **	<i>Aureobasidium pullulans</i> **
<i>Candida albicans</i>	<i>Candida glabrata</i> **	<i>Candida glabrata</i> **
<i>Candida apicola</i>	<i>Candida pimensis</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i> **
<i>Candida diversa</i>	<i>Cryptococcus magnus</i> **	<i>Cryptococcus carnescens</i>
<i>Candida glabrata</i> **	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Cryptococcus magnus</i> **
<i>Candida lactis-condensi</i>	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	<i>Cryptococcus terrestris</i>
<i>Candida membranifaciens</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i> **	<i>Kodamaea ohmeri</i> *
<i>Candida sake</i>	<i>Kodamaea ohmeri</i> *	<i>Kregervanrija fluxuum</i>
<i>Candida zemplinina</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> **	<i>Lachancea thermotolerans</i> *
<i>Cryptococcus magnus</i> **	<i>Metschnikowia viticola</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> **
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	<i>Metschnikowia sinensis</i> **	<i>Metschnikowia sinensis</i> **
<i>Hanseniaspora uvarum</i> **	<i>Pichia fermentans</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> *
<i>Lachancea thermotolerans</i> *	<i>Pichia occidentalis</i>	<i>Pichia manshurica</i>
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> **	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> **	<i>Pichia terricola</i>
<i>Metschnikowia viticola</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i> *
		<i>Saccharomycopsis schoenii</i>

<i>Metschnikowia sinensis</i> ** <i>Metschnikowia zizyphicola</i> <i>Meyerozyma guilliermondii</i> * <i>Pichia burtonii</i> <i>Pichia kudriavzevii</i> <i>Pichia sp.</i> <i>Pichia terricola</i> <i>Rhodotorula glutinis</i> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> ** <i>Saccharomyces cerevisiae</i> * <i>Saccharomycopsis vini</i> <i>Sporisorium penniseti</i> <i>Starmerella bacillaris</i> <i>Torulaspora pretoriensis</i> <i>Wickerhamomyces anomalus</i>	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	<i>Schwanniomyces occidentalis</i> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> ** <i>Torulaspora delbrueckii</i> <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
---	---------------------------------	---

Примечание: – * вид обнаружен на отдельных частях виноградного растения и в почве; – ** вид обнаружен на всех субстратах.

Отмечены принципиальные различия в распределении дрожжевых грибов по типам субстратов виноградников. Максимальное количество видов, из которых 30 ассоциированы с ягодами, обнаружили на виноградном растении. К наиболее часто выделяемым с ягод отнесены виды – *Aureobasidium pullulans*, *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia spp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia spp.* и *Candida spp.* С других частей растения изолировали 15 видов, среди которых чаще встречались *A. pullulans* и *Metschnikowia sinensis*. Полученные результаты показывают, что именно высокосахаристые локусы – грозди винограда – содержат наибольшее видовое богатство дрожжей. В почве под виноградниками, которая выполняет особую роль резервуара микробного разнообразия, отвечая за сохранение и распространение микроорганизмов [8], обнаружили 20 видов с доминированием *A. pullulans*. Здесь, как и на виноградном растении, в основном представлены аскомицеты, в том числе вид *S. cerevisiae*, типичный обитатель высокосахаристых субстратов, редко осваивающий другие природные локусы. Автохтонным для почвы является вид *Schwanniomyces occidentalis*, все известные штаммы которого изолированы из почвы [9].

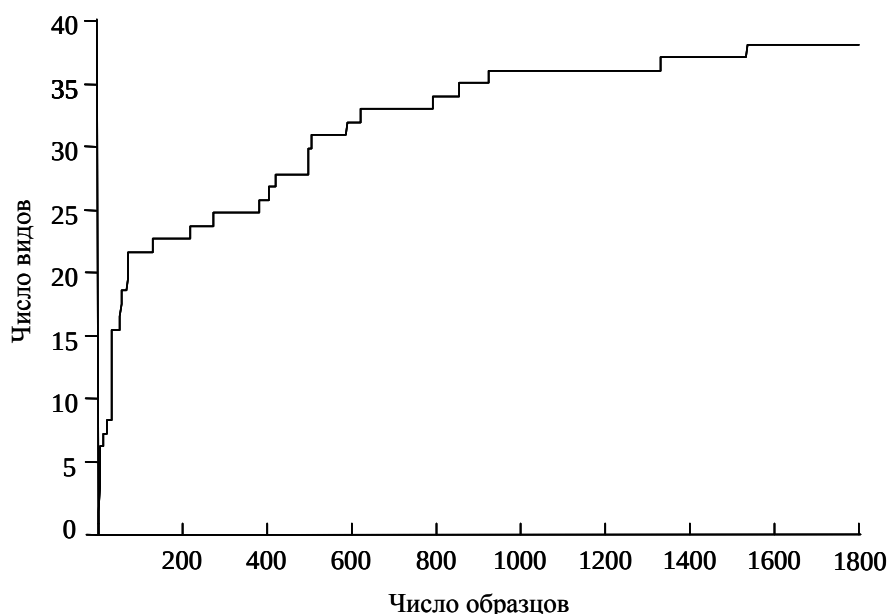
Исследование состава дрожжевых сообществ виноградников в сезонной динамике (летне-осенний период, когда наблюдается максимальное разнообразие дрожжевых грибов) позволило выявить его изменение в зависимости от типа субстрата. Для ягод большее количество видов приходится на август – октябрь, для листьев на сентябрь – октябрь, для почвы на октябрь – ноябрь. Характер сезонной динамики дрожжевых грибов ягод позволил обнаружить общий тренд с другими сочными плодами, содержащими легкодоступные сахара, такими как плоды шиповника и сливы, даже если эти растения происходят из других географических зон [10].

Исследование численности дрожжевых грибов, обитающих в условиях виноградников, показало, что она также значительно меняется в зависимости от субстрата и времени года. Так, например, в летне-осенний период максимальные значения численности дрожжей на листьях и ягодах винограда приходятся на конец вегетационного периода, минимальные – на начало, при этом

характер ее изменчивости для этих типов субстратов в динамике достаточно близок. Наибольшее количество дрожжевых грибов среди всех проанализированных субстратов приходилось на опад, наименьшее – на почву под виноградным растением; средние значения составляли lg (КОЕ/г) – 3,43 и 2,59 соответственно.

Данные по структуре дрожжевых грибов, ассоциированных с субстратами виноградников Дагестана, полученные с использованием различных методов выделения дрожжей в течение нескольких лет, дают достаточно полную характеристику их таксономического состава, что демонстрирует кумулятивная кривая, показывающая зависимость между числом обнаруженных видов и количеством исследованных образцов (см. рисунок). Очевидно, что продолжение исследований, при заметном снижении скорости выделения новых видов для данного региона, позволяет спрогнозировать возможность незначительного их прироста в дальнейшем.

В связи с этим было допустимо проведение сравнительного анализа таксономического состава дрожжей виноградников Дагестана с данными по встречаемости дрожжей на виноградниках европейских, азиатских и южноамериканских стран. Сопоставление результатов по 18 странам выявило достаточно высокий уровень схожести видового состава, что, на наш взгляд, указывает на сильное влияние схожих климатических параметров мест произрастания винограда, а также особенностей самого растения. Согласно полученным сведениям, к наиболее часто выделяемым видам дрожжей относятся (в порядке убывания данных по выделениям): *Hanseniaspora uvarum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida zemplinina*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia terricola*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Candida stellata*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Cryptococcus magnus*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Pichia membranifaciens*, *Torulaspora delbrueckii* и *Sporidiobolus metaroseus*. При учете того, что в среднем с виноградника выделяется по 9–15 видов дрожжей [11], обозначенные выше виды представляются наиболее типичным сообществом дрожжевых грибов, характерным для данного местообитания [12].



Зависимость числа обнаруженных видов дрожжей на различных субстратах

виноградников Дагестана от количества проанализированных образцов

Следует отметить наличие в комплексе изолятов представителей родов *Candida*, *Meyerozyma*, *Aureobasidium*, *Schwanniomyces*, *Rhodotorula*, используемых в микробиологическом синтезе для производства кормового белка, ксилита, витамина рибофлавина, пигментов, полисахаридов. Особо примечательно наличие среди дрожжевого населения, ассоциированного с растением и почвой, редко встречающихся в природе дрожжей *S. cerevisiae*, являющихся модельным объектом для изучения фундаментальных биологических процессов. Традиционный интерес к биотехнологическим аспектам изучения сахаромицетов, потенциал которых исчерпан далеко не полностью, обусловлен их прикладной значимостью.

Таким образом, исследование дрожжей, обитающих в условиях виноградников Дагестана, впервые проведенное с применением новых подходов, позволило получить сведения об их численности и видовом разнообразии, что способствует выявлению принципов организации микроорганизмов в природе.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 12-04-01222.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Президиума РАН 1.21. «Биологическое разнообразие природных систем. Биологические ресурсы России: оценка состояния и фундаментальные основы мониторинга».

ЛИТЕРАТУРА

1. Чернов И.Ю. Дрожжи в природе. М.: Тов-во науч. изд. КМК. 2013. 336 с.
2. Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia / P. Raspor, D.M. Milek, J. Polanc, S.S. Mozina, N. Cadez // Int J Food Microbiol. 2006. Vol. 109(1-2). P. 97-102.
3. Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries / G. Cordero-Bueso, T. Arroyo, A. Serrano, J. Tello, I. Aporta, M.D. Velez, E. Valero // Int J Food Microbiol. 2011. Vol. 145(1). P. 132-139.
4. Barata A., Malfeito-Ferreira M., Loureiro V. Changes in sour rotten grape berry microbiota during ripening and wine fermentation // Int J Food Microbiol. 2012. Vol. 154(3). P. 152-161.
5. Yeast species associated with wine grapes in China / S.S. Li, C. Cheng, Z. Li, J.Y. Chen, B. Yan, B.Z. Han, M. Reeves // Int J Food Microbiol. 2010. Vol. 138(1-2). P. 85-90.
6. Yeast ecology of vineyards within Marsala wine area (western Sicily) in two consecutive vintages and selection of autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains / L. Settanni, C. Sannino, N. Francesca, R. Guarcello, G. Moschetti // J Biosci Bioeng. 2012. Vol. 114(6). P. 606-614.
7. Качалкин А.В. Новые данные о распространении некоторых психрофильных дрожжевых грибов в Московской области // Микробиология. 2010. Т. 79, № 6. С. 843-847.
8. Саенко Н.Ф. К вопросу о круговороте дрожжей. Тифлис: Изд-во. Всесоюз. ин-та виноделия и виноградарства, 1932. 68 с.
9. Suzuki M., Kurtzman C.P. *Schwanniomyces* Klocker emend. M. Suzuki et Kurtzman (2010) // The yeasts a taxonomic study. Vol. 2 / eds C.P. Kurtzman et al. 5th ed. N.Y.: Elsevier, 2011. P. 785-794.

10. Структура сообществ дрожжевых грибов виноградника в Дагестане / Д.А. Абдуллабекова, Е.С. Магомедова, А.В. Качалкин, Г.Г. Магомедов, И.Ю. Чернов // Микология и фитопатология. 2014. Т. 48, № 2. С. 78–83.

11. Jolly N.P., Augustyn O.P.H., Pretorius I.S. The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production // S. Afr. J. Enol. Vitic. 2006. Vol. 27(1). P.15–39.

12. Дрожжевые грибы виноградников Дагестана и других регионов / А.В. Качалкин, Д.А. Абдуллабекова, Е.С. Магомедова, Г.Г. Магомедов, И.Ю. Чернов // Микробиология. 2015. Т. 84, № 3. С. 360–368. (Yeasts of the vineyards in Dagestan and other regions / A.V. Kachalkin, D.A. Abdullabekova, E.S. Magomedova, G.G. Magomedov, I.Yu. Chernov // Microbiology. 2015. Vol. 84 (3). P. 425–432).

Поступила в редакцию 26.04.2017 г.

Принята к печати 30.06.2017 г.