

УДК 579.8.06

Поступила в редакцию 16.11.2019
Received 16.11.2019**А. В. Савчик, А. В. Кантерова, С. И. Леонович, Е. И. Ладутько, Г. И. Новик***Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь***МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДРОЖЖЕВЫХ ГРИБОВ ИЗ ФОНДА БЕЛОРУССКОЙ КОЛЛЕКЦИИ НЕПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ**

Аннотация. Из природных источников выделены 10 изолятов дрожжевых грибов, выполнен анализ таксономически значимых морфологических и физиологических признаков культур. Для установления точного таксономического диагноза проведена молекулярно-генетическая идентификация дрожжей с использованием метода сравнения нуклеотидных последовательностей, кодирующих ген 18S рРНК. По результатам исследований определена видовая принадлежность новых культур дрожжевых грибов, которые отнесены к родам: *Rhodospordiobolus*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Dothiora*, *Holtermannia*, *Cryptococcus*, *Metschnikowia* и *Candida*.

Ключевые слова: дрожжевые грибы, идентификация, 18S рРНК

A. V. Savchik, A. V. Kanterova, S. I. Leonovich, E. I. Ladutko, G. I. Novik*The Institute of Microbiology of National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus***MOLECULAR GENETIC IDENTIFICATION OF YEAST FROM THE FUND OF THE BELARUSIAN COLLECTION OF NON-PATHOGENIC MICROORGANISMS**

Abstract. Ten cultures of yeast-like fungi were isolated from natural sources and taxonomically significant morphological and physiological characteristics of isolates were analyzed. For precise taxonomic diagnosing molecular-genetic identification of yeast was performed by comparison of nucleotide sequences encoding 18S rRNA gene. As a result species affiliation was defined for new cultures of yeast-like fungi referred to genera: *Rhodospordiobolus*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Dothiora*, *Holtermannia*, *Cryptococcus*, *Metschnikowia* and *Candida*.

Keywords: yeast-like fungi, identification, 18S rRNA

Введение. Дрожжевые грибы — группа высших одноклеточных грибов, размножающаяся делением или почкованием [1]. Дрожжи широко распространены в природе и наиболее часто встречаются в богатых источниками углерода субстратах: на плодах, в нектаре цветов, в сокотечениях деревьев, на разлагающихся остатках растений, в почве, в воде и т.д. Первая классификация дрожжей была предложена в XIX веке, с присвоением дрожжевым грибам родового названия *Saccharomyces* [2]. В настоящее время описано около 1,5 тыс. видов дрожжей, относящихся к отделам *Ascomycota* и *Basidiomycota*. Типичным представителем отдела *Ascomycota* являются дрожжи вида *Saccharomyces cerevisiae*, представляющие собой клетки округлой или овальной формы, образующие аскоспоры в одиночных клетках. Аскомицетными дрожжевыми грибами являются дрожжи родов *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Lipomices*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Dothiora* и др. К отделу *Basidiomycota* относятся дрожжевые грибы родов *Rhodotorula*, *Rhodospordium*, *Rhodospordiobolus*, *Filobasidiella*, *Xanthophyllomyces*, *Holtermannia*, *Cryptococcus*, *Sporobolomyces* др. Для дрожжей отдела *Basidiomycota* характерен базидиомицетный жизненный цикл с образованием базидиоспор [3].

Ключевые критерии классификации дрожжей в настоящее время включают описание морфологии клеток, характеристику особенностей строения клеток и клеточных структур, типа вегетативного размножения, наличия полового процесса, способности утилизировать источники углерода и азота, способности к продукции внеклеточных метаболитов, ферментов и других соединений, а также

молекулярно-генетический анализ структуры ДНК и РНК [3–5]. Поскольку дрожжевые грибы разных видов в некоторых случаях характеризуются схожестью морфологических и физиолого-биохимических признаков, наиболее достоверным в идентификации дрожжей является молекулярно-генетический анализ [6]. Использование методов секвенирования генов позволяет точно определить видовую принадлежность дрожжевых грибов и установить филогенетические связи между изучаемыми организмами.

Дрожжевые грибы нашли широкое применение в различных областях промышленности:

- ♦ в пищевой промышленности дрожжи применяются для получения пищевых добавок, пищевых красителей, пленочного покрытия, в сыроварении;
- ♦ в химической промышленности используются в производстве моющих средств, этанола и др.;
- ♦ в фармацевтической промышленности для изготовления лекарственных препаратов и в косметологии;
- ♦ в сельском хозяйстве дрожжи применяются для получения кормовых добавок [7].

В связи с этим, активное использование дрожжей в инновационных биотехнологиях обуславливает целесообразность поиска новых промышленно-ценных штаммов-продуцентов дрожжевых грибов, их молекулярно-генетической идентификации, а также длительного гарантированного сохранения коллекционного фонда дрожжевых грибов.

Цель настоящей работы — молекулярно-генетическая идентификация изолятов дрожжевых грибов, выделенных из природных растительных источников и пополнение фонда Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов.

Объекты и методы исследований. Объектами исследований служили изоляты дрожжей, выделенные из природных растительных источников (СЛ-2, ВШ-4, ПР-3, ЭХ-3, СЖ-2, ХС-2, ЧЕ-1, КЛ-2, КК-2, ПАП-3). Дрожжевые грибы выращивали в агаризованной среде на основе пивного сусла (6°Б) при температуре 25–26°С. Морфологию изолированных колоний исследовали с помощью микроскопа МБС-10. Морфологию живых клеток изучали методом световой микроскопии, используя микроскоп Nikon Eclipse E200.

Для проверки способности дрожжей сбраживать сахара применяли метод с использованием трубок Дунбара. В качестве питательной среды использовали 0,5 % раствор дрожжевого экстракта с добавлением исследуемых сахаров в 2 % концентрации: глюкозы, сахарозы, галактозы, мальтозы, инулина, целлобиозы, трегалозы, лактозы, крахмала, а также раффинозы с конечной концентрацией 6 %. Тесты на способность дрожжей сбраживать сахара проводили в трех повторах. Учет результатов производили через 24 ч.

Для проверки способности дрожжей ассимилировать источники углерода проводили посев исследуемых дрожжевых грибов в жидкие питательные среды на основе пивного сусла и инкубировали на качалке в течение трех суток. После этого производили посев культур дрожжей на агаризованные среды, содержащие источник углерода (сахарозу, галактозу, мальтозу, инулин, целлобиозу, трегалозу, лактозу, крахмал — с конечной концентрацией сахаров 0,5 %, раффинозу — 1 %). Положительным контролем служила агаризованная среда, содержащая глюкозу концентрацией 0,5 %, отрицательным контролем являлась агаризованная среда, не содержащая сахаров. Оценку способности дрожжей к росту и ассимиляции различных источников углерода проводили в трех повторах. Учет результатов осуществляли на третьи и седьмые сутки после посева [8].

Выделение геномной ДНК дрожжевых грибов проводили с использованием ацетата лития для разрушения клеточной стенки дрожжей [9].

ПЦР-амплификацию нуклеотидной последовательности гена 18S рРНК выполняли с использованием праймеров NS1 (5'-gtagcatatgctgtctc-3') и NS4 (5'-cttccgtcaattcctttaag-3') при следующем температурно-временном профиле: денатурация — 5 мин при 98 °С; 34 цикла элонгации — 98 °С — 20 с, 55 °С — 20 с, 72 °С — 2 мин; достройка цепи — 5 мин при 72 °С; охлаждение до 4 °С.

Образцы ДНК и ПЦР-продукты анализировали в однопроцентном агарозном геле с использованием 1X *tris*-ацетатного буфера. Для визуализации ДНК и ПЦР-продуктов агарозный гель окрашивали раствором бромистого этидия в концентрации 0,05 мкг/мл. Для определения размера продуктов ПЦР применяли маркер молекулярной массы фрагментов ДНК GeneRuler DNA Ladder 1 Kb Plus (Thermo Scientific).

Результаты и их обсуждение. Выполнено выделение дрожжей из различных растительных источников: эхинацеи (ЭХ-3), сложноцветных (СЖ-2), примулы (ПР-3), сливы (СЛ-2), вишни (ВШ-4), хризантемы (ХС-2), черничника (ЧЕ-1), календулы (КЛ-2), клевера (КК-2) и папоротника (ПАП-3). При последовательном пересеве выделенных культур дрожжей на сусло-агаре наблюдали колонии разнообразной окраски, размера и формы (табл. 1). Микрофотографии изолированных колоний и клеток представлены на рис. 1 (а, б).

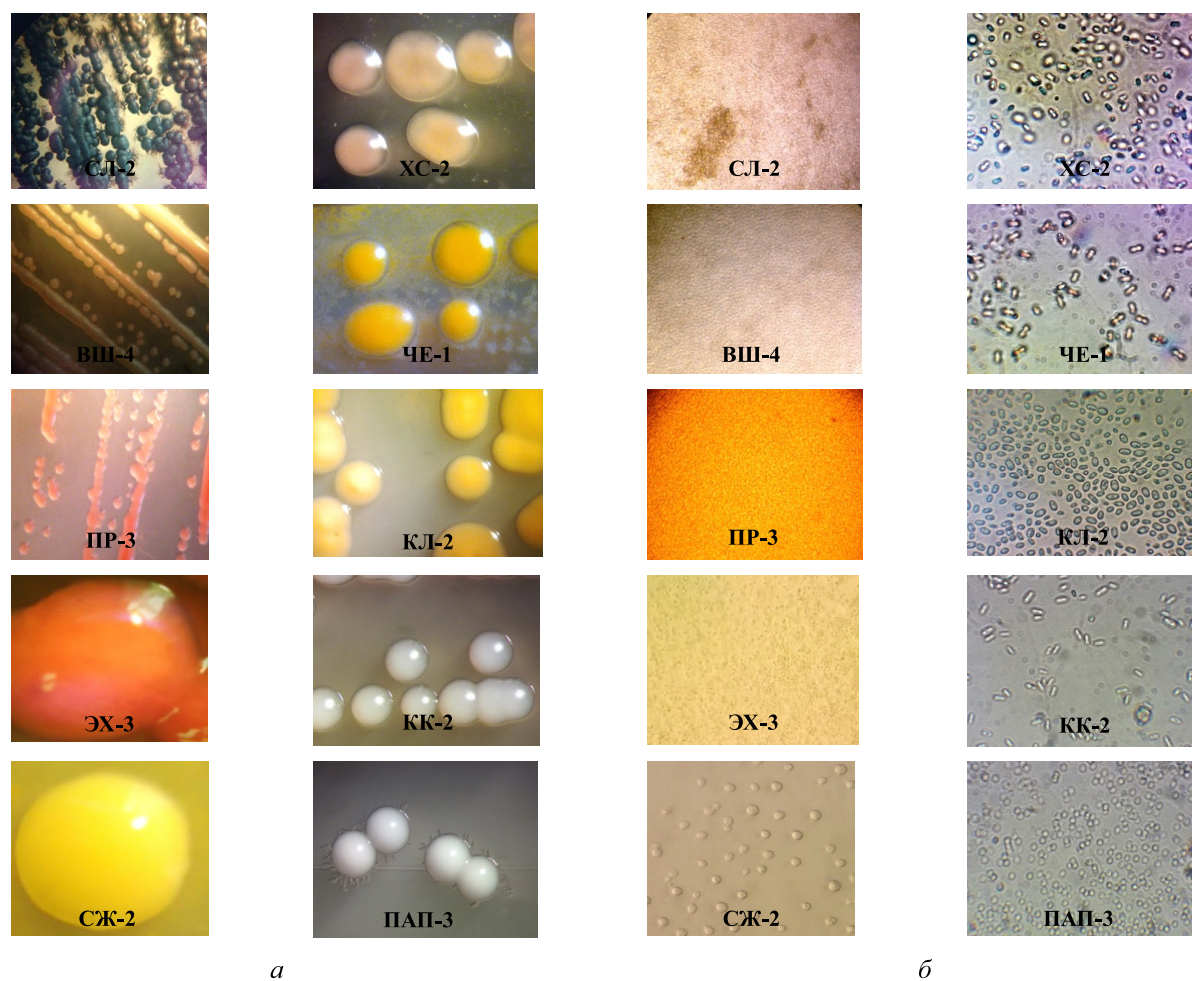


Рис. 1. Морфология изолированных колоний и клеток дрожжей, выделенных из растительных источников: а — морфология колоний; б — морфология клеток. Условные обозначения: СЛ-2 — культура дрожжей, выделенная из сливы; ВШ-4 — вишни; ПР-3 — примулы; ЭХ-3 — эхинацеи; СЖ-2 — сложноцветных; ХС-2 — хризантемы; ЧЕ-1 — черники; КЛ-2 — календулы; КК-2 — клевера; ПАП-3 — папоротника

Fig. 1. Morphology of isolated colonies and yeast cells isolated from plant sources: a — colony morphology; b — cell morphology. Legend: СЛ-2 — yeast culture isolated from plums; ВШ-4 — cherries; ПР-3 — primrose; ЭХ-3 — echinacea; СЖ-2 — compositae; ХС-2 — chrysanthemums; ЧЕ-1 — blueberries; КЛ-2 — calendula; КК-2 — clover; ПАП-3 — fern

Таблица 1. Морфологические признаки исследуемых дрожжей
Table 1. Morphological characteristics of the studied yeast

Изоляты дрожжей	Морфология колоний	Морфология клеток
СЛ-2	Колонии диаметром 2–3 мм, плотные, сухие, круглой формы, край колоний мицелиального типа, поверхность блестящая. Цвет молодых колоний в возрасте 3 сут розовато-бежевый, с возрастом (4 сут) колонии становятся коричнево-черными	Клетки крупные, округлой и овальной формы, располагаются одиночно, наблюдается почкование клеток
ВШ-4	Колонии диаметром 2–3 мм, слизистые, круглой формы, край колоний ровный, поверхность блестящая, консистенция мажущаяся. Цвет колоний розово-бежевый	Клетки крупные, округлой и овальной формы, располагаются одиночно, наблюдается почкование клеток

Окончание табл. 1

Изоляты дрожжей	Морфология колоний	Морфология клеток
ПР-3	Колонии диаметром 2–3 мм, слизистые, круглой формы, край колоний ровный, поверхность блестящая, консистенция мажущаяся. Цвет колоний розово-красный	Клетки округлой и овальной формы, располагаются одиночно, наблюдается почкование клеток
ЭХ-3	Колонии диаметром 3–4 мм, слизистые, круглой формы, край колоний ровный, поверхность блестящая, консистенция мажущаяся. Цвет колоний розово-красный	Клетки крупные, округлой формы, наблюдается почкование клеток
СЖ-2	Колонии диаметром 3–4 мм, слизистые, круглой формы, край колоний ровный, поверхность блестящая, консистенция мажущаяся. Цвет колоний бежевый	Клетки крупные, округлой формы, располагаются одиночно
ХС-2	Колонии до 2 мм в диаметре, блестящие, слизистые, край гладкий. Цвет колоний розовый	Клетки дрожжей округлой и овальной формы, располагаются одиночно, наблюдается почкование
ЧЕ-1	Колонии диаметром 1–3 мм, блестящие, слизистые, с ровным краем. Цвет колоний оранжевый	Клетки дрожжей овальной и удлиненной формы, наблюдается активное почкование клеток
КЛ-2	Колонии диаметром до 4 мм, слизистые, край ровный. Цвет колоний красный	Клетки дрожжей округлой формы, располагаются одиночно, наблюдается почкование клеток
КК-2	Колонии диаметром 1–2 мм, круглой формы, край колоний ровный, поверхность матовая. Цвет колоний светло-бежевый	Клетки крупные, овальной формы, наблюдается почкование клеток
ПАП-3	Колонии диаметром 2–3 мм, круглой формы, край колоний мицелиального типа, поверхность матовая. Цвет колоний белый	Клетки крупные, круглой формы, наблюдается почкование клеток

На следующем этапе исследований проведен анализ таксономически значимых физиологических признаков исследуемых дрожжевых культур: способность дрожжей сбраживать сахара и ассимилировать источники углерода.

Характеристика способности исследуемых дрожжей сбраживать сахара приведена в табл. 2. Как видно из табл. 2, только дрожжевые изоляты КК-2 и ПАП-3 способны к сбраживанию отдельных сахаров, в то время как остальные изоляты — не способны сбраживать данные сахара. Согласно сведениям литературных источников, красные дрожжи, пигментация которых обусловлена наличием каротиноидных пигментов (изоляты ПР-3, ЭХ-3, ХС-2, ЧЕ-1, КЛ-2), черные дрожжи, продуцирующие меланин (СЛ-2), а также дрожжи, образующие крахмалоподобные соединения (изоляты ВШ-4, СЖ-2), как правило, не способны сбраживать исследуемые сахара [8], что является подтверждением их таксономической принадлежности.

Таблица 2. Характеристика способности изучаемых дрожжей сбраживать сахара*
Table 2. Characterization of the ability of the studied yeast to ferment sugar*

Источник угле- рода	Изоляты дрожжей									
	СЛ-2	ВШ-4	ПР-3	ЭХ-3	СЖ-2	ХС-2	ЧЕ-1	КЛ-2	КК-2	ПАП-3
Глюкоза	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Галактоза	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Сахароза	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Мальтоза	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Раффиноза	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Инулин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Целлобиоза	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Трегалоза	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Лактоза	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Крахмал	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание. Условные обозначения : «+» — наличие роста дрожжей; «-» — отсутствие роста дрожжей; * — культивирование в течение 7 сут при температуре 25 °С.

Характеристика способности исследуемых дрожжей к росту и ассимиляции различных источников углерода приведена в табл. 3. Согласно приведенным данным, у некоторых дрожжей наблюдался слабый рост в исследуемых средах, что объясняется возможной медленной адаптацией культур дрожжей к некоторым источникам углерода [8].

Таблица 3. Характеристика способности изучаемых дрожжей к росту и ассимиляции источников углерода*

Table 3. Characterization of the ability of the studied yeast to grow and assimilate carbon sources*

Источник угле- рода	Изоляты дрожжей									
	СЛ-2	ВШ-4	ПР-3	ЭХ-3	СЖ-2	ХС-2	ЧЕ-1	КЛ-2	КК-2	ПАП-3
Глюкоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Галактоза	+	-	+/-	+	+	+	+	+	+	+
Сахароза	+	-	+/-	-	+	+	+	+	+/-	+
Мальтоза	+	-	+/-	-	+	-	+	+	+	+/-
Раффиноза	+	+/-	+	+	+	+	+/-	+	-	-
Инулин	+	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-
Целлобиоза	+	+	+	+	+/-	-	+	+/-	+	-
Трегалоза	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+/-	+
Лактоза	+	+/-	-	-	+/-	-	-	-	-	-
Крахмал	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-

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

Изученные в ходе работы морфологические и физиологические признаки дрожжей позволяют сделать предположение о видовой принадлежности дрожжевых культур. Однако для установления точного таксономического диагноза проведена молекулярно-генетическая идентификация дрожжевых культур с использованием метода сравнения нуклеотидных последовательностей, кодирующих ген 18SpPHK. В ходе выделения геномной ДНК дрожжей и ПЦР-амплификации с использованием универсальных праймеров NS1 и NS4 получены ПЦР-продукты размером ~1200 п.н. Размер ПЦР-продукта исследуемых дрожжей соответствует ожидаемому размеру целевого продукта – полной последовательности гена 18SpPHK. Электрофореграмма продуктов ПЦР исследуемых дрожжей представлена на рис. 2.

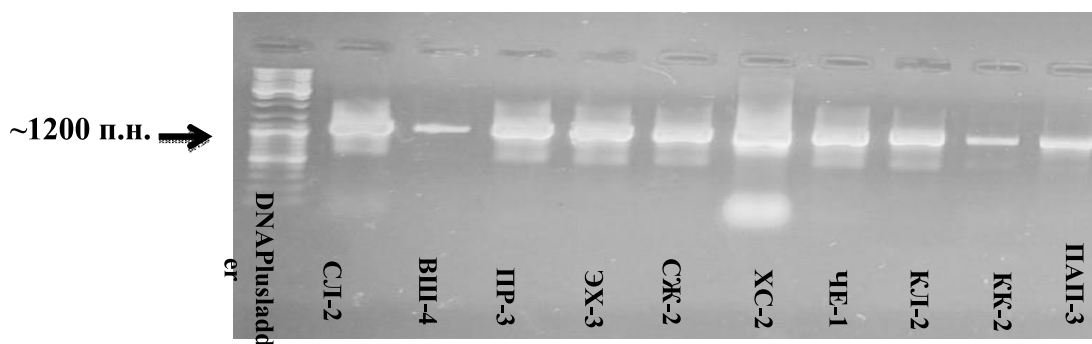


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК гена 18SpPHK исследуемых дрожжей с использованием праймеров NS1 и NS4

Fig. 2. Electrophoregram of amplification products of the 18SrRNA gene DNA of the studied yeast using primers NS1 and NS4

В ходе последующего секвенирования с использованием NS1 праймера определена нуклеотидная последовательность амплифицированных фрагментов гена 18SpPHK. Сравнительный анализ секвенированной нуклеотидной последовательности гена 18SpPHK исследуемых штаммов дрожжей с референтными нуклеотидными последовательностями осуществляли с использованием информационных ресурсов международной базы данных GenBank. Критерием отнесения микроорганизма к тому

или иному виду считается гомология с референтными последовательностями не менее 97 %. Результаты молекулярно-генетической идентификации исследуемых дрожжей представлены в табл. 4.

Таблица 4. Результаты молекулярно-генетической идентификации исследуемых дрожжей
Table 4. The results of molecular genetic identification of the studied yeast

Изоляты дрожжей	Степень сходства с референтными последовательностями (по GenBank)	Видовая принадлежность
СЛ-2	99 %	<i>Dothioracannabinae</i>
ВШ-4	99 %	<i>Holtermanniacorniformis</i>
ПР-3	99 %	<i>Rhodospordioboluscostris</i>
ЭХ-3	99 %	<i>Rhodotorulaglutinis</i>
СЖ-2	99,87 %	<i>Cryptococcus</i> sp.
ХС-2	99,73 %	<i>Rhodotorulasp.</i>
ЧЕ-1	99,77 %	<i>Sporobolomycesroseus</i>
КЛ-2	99,99 %	<i>Sporobolomycesroseus</i>
КК-2	99,74 %	<i>Metschnikowiareukaufii</i>
ПАП-3	99,77 %	<i>Candidasp.</i>

В результате изоляции из природных источников и молекулярно-генетической идентификации получены 10 штаммов дрожжей, относящихся к 8 родам:

Род *Dothiora*. Колонии дрожжей округлой формы, черные, подушковидные. Аски дрожжей булавовидные. Не сбраживают сахара, синтезируют меланин. Дрожжи рода *Dothiora* являются сапрофитами — обитают на отмерших частях растений [3, 8].

Меланинпродуцирующие дрожжевые грибы рода *Dothiora* используются в фармацевтической, пищевой и косметической промышленности для производства биологически активных меланинсодержащих лечебно-профилактических и пищевых добавок для диетотерапии и функционального питания, а также биодобавок для косметических средств в качестве высокоактивных компонентов защитного или лечебно-восстановительного назначения [10].

Род *Rhodospordiobolus*. Клетки округлой и овальной формы. Колонии розово-красного цвета. Размножаются почкованием. Не сбраживают сахара, синтезируют каротиноиды. Обитают на поверхности растений.

Род *Rhodotorula*. Клетки дрожжей круглые, овальные, удлинённые. Колонии красного, оранжевого или розового цвета. Размножение многосторонним почкованием. Баллистоспор не образуют. Могут формировать псевдомицелий или истинный мицелий. Не сбраживают сахара. Представители этого рода широко распространены в природе, многие ассоциированы с растениями и обитают на поверхности листьев, также обитают в пресных и морских водоемах. Дрожжи рода *Rhodotorula* синтезируют каротиноиды и перспективны как источники получения витамина А.

Род *Sporobolomyces*. Клетки дрожжей овальные, веретеновидные или удлинённые. Колонии розовые, оранжево-красные, кремовые или желтовато-коричневые. Размножаются полярным, реже многосторонним почкованием. Образуют двусторонне симметричные, аллантоидные, фасолевидные, миндалевидные, серповидные баллистоспоры. Могут формировать псевдомицелий или истинный мицелий. Не сбраживают сахара, синтезируют каротиноиды. Обитают в основном на поверхности листьев растений, на зерне [3, 8].

Каротиноидсинтезирующие дрожжевые грибы родов *Rhodospordiobolus*, *Rhodotorula* и *Sporobolomyces* нашли широкое применение в пищевой промышленности в качестве красителей для вареных колбас, безалкогольных напитков, выпечки и других продуктов, а также как пищевая добавка при производстве хлеба, масла, маргарина и др. Известно, что чрезмерное потребление синтетических красителей может вызвать аллергические реакции, астму, рак, повреждение почек, печени и желудочно-кишечного тракта из-за их токсичности. В связи с этим, актуально использование натуральных пищевых красителей на основе каротиноидсинтезирующих дрожжей [11].

Род *Holtermannia*. Клетки дрожжей круглые или овальные. Колонии бежевого или розово-бежевого цвета. Размножаются почкованием. Не способны к сбраживанию сахаров. Могут синтезировать крахмалоподобные соединения. Представители этого рода развиваются в основном на мертвой древесине, могут паразитировать на других грибах.

Род *Cryptococcus*. Клетки дрожжей круглой, овальной или удлинённой формы, обычно капсулированные. Колонии белые или кремовые, некоторые красные или оранжевые. Размножаются многосторонним или полярным почкованием. Могут формировать псевдомицелий или истинный мицелий. Большинство видов синтезируют крахмалоподобные соединения, полисахариды и не

сбраживают сахара. Представители рода *Cryptococcus* встречаются в почве и на растениях во всех природных зонах. Род *Cryptococcus* классифицируется на анаморфы родов *Filobasidium*, *Filobasidiella*, *Cystofilobasium*, а также телеоморфы родов из порядков *Tremellales* и *Filobasidiales*.

Род *Candida*. Самый крупный род среди дрожжевых грибов, включающий около 200 видов. Клетки дрожжей круглые, овальные или удлинённые. Размножаются почкованием. Псевдомицелий есть у всех видов дрожжей, некоторые виды могут формировать истинный мицелий. Многие виды — составная часть кишечной флоры у животных и человека [3, 8].

Внеклеточные полисахариды дрожжей родов *Holtermannia*, *Cryptococcus* и *Candida* используются в качестве стабилизаторов мороженого, фруктовых соков, загустителей сиропов, джемов, подливок, желе. Кроме того, добавление полисахаридов дрожжей рода *Cryptococcus* в муку повышает газоудерживающую способность теста, а хлеб, выпеченный из такого теста, медленнее черствеет и отличается хорошей пористостью. Получение липолитических ферментов из дрожжевых грибов родов *Cryptococcus*, *Rhodotorula* и *Candida* играет особую роль в биотехнологии, поскольку липазы представляют интерес для многих отраслей промышленности: косметической, химической, в частности, используются в производстве моющих средств, пищевой — применяются в сыроварении и других производственных процессах [12].

Род *Metschnikowia*. Представители этого рода имеют клетки округлой, овальной, серповидной, цилиндрической формы. Аски дрожжей булавовидные или клиновидные, образующиеся из хламидоспор. В аске 1-2 игловидные аскоспоры. Виды из морских источников — паразиты водных беспозвоночных, виды из наземных экосистем — обитатели нектаров цветов [3, 8].

Интересно отметить, что дрожжевые грибы рода *Metschnikowia* при совместном культивировании с дрожжами *Saccharomycesuvarum* используются при производстве широко известных брендовых марок вин «Chardonnay» и «Syrah», а также в пивоварении [13].

Таким образом, фонд Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов пополнен 10 новыми биотехнологически перспективными штаммами дрожжевых грибов (табл. 5). Представители видов дрожжей *Dothioracannabinae*, *Holtermanniacorniformis* и *Rhodospordioboluscolostris* впервые изолированы и описаны авторами, идентифицированы и введены в фонд Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов, что подчеркивает научную значимость выполненных исследований.

Таблица 5. Таксономическая принадлежность выделенных из природных источников штаммов дрожжевых грибов

Table 5. Taxonomic affiliation of yeast strains isolated from natural sources

Изоляты дрожжей	Видовое название	Коллекционный номер штамма (№ БИМ)
СЛ-2	<i>Dothioracannabinae</i>	Y-308Г
ВШ-4	<i>Holtermanniacorniformis</i>	Y-311Г
ПР-3	<i>Rhodospordioboluscolostris</i>	Y-318Г
ЭХ-3	<i>Rhodotorulaglutinis</i>	Y-319Г
СЖ-2	<i>Cryptococcus</i> sp.	Y-320Г
ХС-2	<i>Rhodotorulasp.</i>	Y-321Г
ЧЕ-1	<i>Sporobolomycesroseus</i>	Y-322Г
КЛ-2	<i>Sporobolomycesroseus</i>	Y-323Г
КК-2	<i>Metschnikowiareukaufii</i>	Y-328Г
ПАП-3	<i>Candidasp.</i>	Y-329Г

Идентифицированные культуры дрожжевых грибов помещены на длительное стационарное хранение в лиофилизированном и криоконсервированном состоянии в хранилище Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов.

Заключение. Из различных растительных источников выделено 10 новых штаммов дрожжевых грибов. Изучены морфологические и физиологические признаки выделенных культур дрожжей, а также выполнен молекулярно-генетический анализ дрожжей с целью установления точной таксономической принадлежности. Идентифицированные дрожжи принадлежат к 8 родам: *Rhodospordiobolus*, *Rhodotorula* и *Sporobolomyces* — красные дрожжи, синтезирующие каротиноидные пигменты, *Dothiora* — черные дрожжи, способные к синтезу меланина, *Holtermannia* и *Cryptococcus* — синтезируют крахмалоподобные соединения. Культуры родов *Metschnikowia* и *Candida* перспективны в качестве тест-объектов при оценке биотехнологической ценности новых штаммов дрожжей. Кроме того, виды дрожжей *Dothioracannabinae*, *Holtermanniacorniformis* и *Rhodospordioboluscolostris* были впервые описаны, идентифицированы и введены в фонд Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Jamali, S. Identification of yeast species from uncultivated soils by sequence analysis of the hypervariable D1/D2 domain of LSU-rDNA gene in Kermanshah province / S. Jamali, M. Gharaei, S. Abbasi // *Mycologia Iranica*. — 2016. — Vol. 3 (2). — P. 87-98.
2. Montes de Oca, R. Yeast: description and structure / Montes de Oca, R. [et al.] // *Universidad Autonomadel Estado de Мiхico*. — 2016. — P. 4-13.
3. Бабьева, И.П. Биология дрожжей / И.П. Бабьева, И.Ю. Чернов // *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова*. — 2004. — С. 134-223.
4. 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.
5. El-Sharoud, W.M. Molecular identification of yeasts associated with traditional egyptian dairy products / W.M El-Sharoud [et al.] // *Journal of food science*. — 2009. — P. 1-6.
6. Lodder, J. The yeast. A taxonomic study. Second and enlarged edition / J. Lodder // *Amsterdam: North-Holland Publishing Company*. — 1970. — P. 1385.
7. Ferrao, M. Studies on effect of media components on growth and β -carotene production by *Rhodotorulagraminis* RC04 / M. Ferrao, S. Garg. — *Journal of cell and tissue research*. — 2011. — Vol. 11(1) — P. 2551-2556.
8. Бабьева, И.П. Методы выделения и идентификации дрожжей / И.П. Бабьева, В.И. Голубев // *Москва: Пищевая промышленность*. — 1979. — С. 41-49.
9. Looke, M. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications / M. Looke, K. Kristjuhan, A. Kristjuhan // *Biotechniques*. — 2011. — Vol. 50, №5. — P. 325-328.
10. Продуцент меланинодержашей биологически активной добавки “астромеланин” [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://findpatent.ru/patent/211/2116037.html>. — Дата доступа: 25.03.2013.
11. High-level production of astaxanthin by fed-batch culture of mutana strain Phaffiarhodozyma AJ-6-1 / Su-Jin Kim [et al.] // *J. Microbiol. Biotechnol.* — 2003. — № 13(2) — P. 175-181.
12. Дрожжи в современной биотехнологии / Т.Е. Банницына [и др.] // *Вестник МАХ*. — 2016. — № 1 — С. 24-29.
13. *Metschnikowia pulcherrima* [Электронный ресурс]. — Режим доступа: https://ru.qwertyu.wiki/wiki/Metschnikowia_pulcherrima. — Дата доступа: 2016.

REFERENCES

1. Jamali S., Gharaei M., Abbasi S. Identification of yeast species from uncultivated soils by sequence analysis of the hypervariable D1/D2 domain of LSU — rDNA gene in Kermanshah province, *Mycologia Iranica*, 2016, Vol. 3 (2), P. 87–98.
2. Montes de Oca [et al.] R. Yeast: description and structure, *Universidad Autonomadel Estado de Мiхico*, 2016, P. 4–13.
3. Bab'yeva I.P., Chernov I.YU. *Biologiya drozhzhey [Biology of yeast]*, *Moskovskiy gosudarstvennyy universitet im. M.V. Lomonosova [Moscow State University named after M.V. Lomonosov]*, 2004, S. 134–223 (in Russian).
4. Kurtzman P. [et al.] Advances in yeast systematics and phylogeny and their use as predictors of biotechnologically important metabolic pathways, *FEMS Journals*, 2015, P. 1–17.
5. El-Sharoud W.M. [et al.] Molecular identification of yeasts associated with traditional egyptian dairy products, *Journal of food science*, 2009, P. 1–6.
6. Lodder J. The yeast. A taxonomic study. Second and enlarged edition, *Amsterdam: North-Holland Publishing Company*, 1970, P. 1385.
7. Ferrao M., Garg S. Studies on effect of media components on growth and β -carotene production by *Rhodotorulagraminis* RC04, *Journal of cell and tissue research*, 2011, Vol. 11(1), P. 2551–2556.
8. Bab'yeva I.P., Golubev V.I. *Metody vydeleniya i identifikatsii drozhzhey [Methods of isolation and identification of yeast]*, *Moskva: Pishchevaya promyshlennost' [Moscow: Food Industry]*, 1979, S. 41–49 (in Russian).
9. Looke M., Kristjuhan K., Kristjuhan A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications, *Biotechniques*, 2011, Vol. 50, no. 5, P. 325–328.
10. *Produtsent melaninsoderzhashchey biologicheskii aktivnoy dobavki «astromelanin» [Producer of melanin-containing biologically active additives “astromelanin”]* Elektronnyy resurs [*Electronic resource*] — Access mode: <https://findpatent.ru/patent/211/2116037.html>. — Date of access: 25.03.2013.
11. Kim Su-Jin [et al.] High-level production of astaxanthin by fed-batch culture of mutana strain Phaffiarhodozyma AJ-6-1, *J. Microbiol. Biotechnol*, 2003, no. 13(2), P. 175–181.

12. Bannitsyna T.E. Drozhzhi v sovremennoy biotekhnologii [Yeast in modern biotechnology], Vestnik MAX., 2016, no. 1, S. 24–29 (in Russian).
13. *Metschnikowia pulcherrima* Elektronnyy resurs [Electronic resource] — Access mode: https://ru.qwertyu.wiki/wiki/Metschnikowia_pulcherrima. — Date of access: 2016.

Информация об авторах

Савчик Анастасия Вячеславовна — младший научный сотрудник лаборатории «Коллекция микроорганизмов», Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. им. академика В.Ф. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nastya.savchik@mail.ru.

Кантерова Анна Валерьевна — научный сотрудник лаборатории «Коллекция микроорганизмов», Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. им. академика В.Ф. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: microbiol@tut.by.

Леонович Светлана Игоревна — младший научный сотрудник лаборатории «Коллекция микроорганизмов», Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. им. академика В.Ф. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: mnemozina176@gmail.com.

Ладутько Елена Ивановна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории «Коллекция микроорганизмов», Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. им. академика В.Ф. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ladutko_elena@mail.ru.

Новик Галина Ивановна — кандидат биологических наук, заведующий лабораторией «Коллекция микроорганизмов», Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. им. академика В.Ф. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: galina_novik@mbio.bas-net.by.

Information about authors

Savchik Anastasia V. — The Institute of Microbiology of National Academy of Sciences of Belarus (Kuprevich str. 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nastya.savchik@mail.ru.

Kanterova Anna V. — The Institute of Microbiology of National Academy of Sciences of Belarus (Kuprevich str. 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: microbiol@tut.by.

Leanovich Svetlana I. — The Institute of Microbiology of National Academy of Sciences of Belarus (Kuprevich str. 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mnemozina176@gmail.com.

Ladutskaya Alena I. — Ph.D. (Biological). The Institute of Microbiology of National Academy of Sciences of Belarus (Kuprevich str. 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ladutko_elena@mail.ru.

Novik Galina I. — Ph.D. (Biological). The Institute of Microbiology of National Academy of Sciences of Belarus (Kuprevich str. 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: galina_novik@mbio.bas-net.by.