

**ХРАНЕНИЕ ДРОЖЖЕЙ РОДА CANDIDA В
ДИСТИЛЛИРОВАННОЙ ВОДЕ****С.М.АБДУЛГАМИДОВА***Бакинский Государственный Университет*

Было изучено хранение в дистиллированной воде ряда штаммов дрожжевых грибов из коллекции культур микроорганизмов кафедры микробиологии БГУ. После 12 месяцев хранения выживаемость дрожжей была высокой в отличии от физиологической активности, которая после 24 месяцев хранения привела к исчезновению некоторых важных признаков. Установлено, что данный метод хранения не практичен для дрожжевых культур, которые имеют важное промышленное значение.

Для стабильного роста и развития дрожжей при хранении необходимы оптимальные условия. Одним из них является питательная среда, в качестве которой берут дистиллированную воду. По имеющимся литературным данным, дистиллированная вода является неблагоприятной для хранения и дает крайне малую выживаемость. Как известно, в зависимости от вида воды ее свойства изменяются, так дистиллированная вода обладает как положительные, так и отрицательные стороны. Положительная сторона заключается в ее стерильности и низкой концентрации, растворенных в такой воде веществ или же вовсе их отсутствие, что способствует сохранению культуры в чистом виде. Отрицательная сторона дистиллированной воды – это процессы, приводящие к гибели клетки при хранении в коллекции на длительные сроки. В результате низкого осмотического давления гипотонического раствора, вода из окружающего раствора диффундируется внутрь клетки, оболочка которой может лопнуть. При этом наблюдается явление плазмолиза (3,4).

Хранение в дистиллированной воде или в физиологическом растворе являются самыми простыми и доступными методами для небольших лабораторий. Этим методом сохраняют жизнеспособность микроорганизмы различных физиологических групп в течение 1-7 лет. Предполагается, что в этих условиях бактерии существуют за счет медленного окисления запасных полимеров (полиглицанов, липидов) и продуктов разложения мертвых клеток (7,9,10).

В наших предыдущих работах изучена выживаемость дрожжевых грибов, дана их микробиологическая характеристика и описаны физиолого-биохимические свойства после хранения на твердой питательной среде в течение 3 и 6 месяцев, а также под вазелиновым маслом в течение 6 и 12 месяцев (1,2).

Целью настоящей работы является изучение спонтанных изменений в жизнеспособности и некоторых физиологических свойств дрожжей рода *Candida* после хранения в дистиллированной воде при температуре 4-6⁰С.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования служили 11 штаммов дрожжей из коллекции культур кафедры микробиологии БГУ: *Candida pseudotropicalis* штаммы АК9, АК4, МА88, ГА16, КД19 и КН12, *C.кефир* штаммы DA13 и BD2, *C.macedoniensis* штамм МІ44, *C.tropicalis* штамм LK30 и *C.pelliculosa* штамм КТ55.

Дрожжевые культуры смывали с поверхности скошенной питательной среды стерильной дистиллированной водой. Взвесь разливали по 3 мл в стерильные флаконы по 5 мл, закрывали резиновыми пробками и хранили в течение 12 и 24 месяцев при температуре 4-6⁰С. В качестве контрольного варианта служили штаммы, взятые из коллекции в возрасте не более 30 суток.

Для определения жизнеспособности культур использовали простой и быстрый способ определения живых и мертвых клеток. Результаты были вычислены по формулу Луста (5).

Способность дрожжей сбраживать углеводы (лактозу) наблюдали в трубках Дунбара. Как показатель бродильной активности дрожжей (способности к накоплению органических кислот) определяли общую титруемую кислотность при росте их в жидкой среде – сусло, источником углерода была глюкоза. Общую титруемую кислотность выражали в градусах Тернера, как количество мл. в 0,1N NaOH, необходимое для нейтрализации образовавшейся в процессе роста кислоты (6).

Все опыты проводили 4-5 кратной повторности и статистически обработаны (8).

Результаты и обсуждение

Сравнивая показатель жизнеспособности клеток дрожжей с контрольным, можно судить о степени выживаемости культур. По имеющимся литературным данным, дистиллированная вода является неблагоприятной для хранения и дает крайне малую выживаемость. Из таблицы 1 видно, что после 12 месяцев хранения у 3 штаммов дрожжей наблюдалось уменьшение показателя жизнеспособности, а именно у *C.pseudotropicalis* АК9, ГА16 и *C.кефир* BD2 в 2,6; 1,2 и 1,1 раз, соответственно. У остальных культур наблюдалось увеличение показателя жизнеспособности в различной степени. Наиболее сильное увеличение наблюдается у *C.pseudotropicalis* МА88 и КД12 в 2,8 и 2,4 раза, *C.pelliculosa* КТ55 в 2,4 раз.

После 24 месяцев хранения в дистиллированной воде у всех исследуемых культур показатель жизнеспособности сильно уменьшился, за исключением штамма *C.macedoniensis* МІ44, у которого наблюдается незначительное понижение по сравнению с контрольным. Резкое падение выживаемости у культур после 24 месяцев хранения вызвано скорее всего истощением запасных веществ внутри дрожжевой клетки.

Следовательно, при хранении в дистиллированной воде почти у всех дрожжевых организмов наблюдалось увеличение показателя жизнеспособности в течение 12 месяцев, что говорит о высокой выживаемости культур в первый период хранения. А при хранении в течение 24 месяцев наблюдалось сильное падение выживаемости дрожжей, причем штамм *C.macedoniensis* МІ44 в от-

личие от других исследуемых культур старался сохранить или же незначительно изменить значение показателя жизнеспособности по сравнению с контрольным.

Таблица 1

Показатель жизнеспособности дрожжевых грибов после хранения в дистиллированной воде ($M \pm m$)

Виды и штаммы дрожжей		Показатель жизнеспособности дрожжей		
		Исходный	12 месяцев хранения	24 месяцев хранения
Candida pseudo-tropicalis:	AK 9	0,45 ± 0,02	0,17 ± 0,03	0,004 ± 0,0001
	AK 4	0,2 ± 0,005	0,35 ± 0,02	0,003 ± 0,0001
	MA 88	0,13 ± 0,002	0,37 ± 0,05	0,008 ± 0,0002
	GA 16	0,48 ± 0,03	0,39 ± 0,01	0,03 ± 0,001
	KD 19	0,29 ± 0,01	0,4 ± 0,04	0,005 ± 0,0001
	KH 12	0,17 ± 0,005	0,41 ± 0,02	0,002 ± 0,0001
C.kefir:	DA13	0,18 ± 0,01	0,38 ± 0,025	0,05 ± 0,002
	BD 2	0,2 ± 0,01	0,18 ± 0,05	0,003 ± 0,0001
C.macedoniensis MI44		0,3 ± 0,02	0,42 ± 0,06	0,2 ± 0,01
C.tropicalis LK30		0,27 ± 0,003	0,38 ± 0,01	0,03 ± 0,001
C.pelliculosa KT55		0,3 ± 0,02	0,72 ± 0,02	0,003 ± 0,0001

Согласно литературным данным, в дистиллированной воде и физиологическом растворе сохраняли жизнеспособность *Pseudomonas aeruginosa*, *P.fluorescens*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* – 1 год, *Bacillus subtilis*, *Gluconobacter oxtdans*, *Rhodococcus sp.* - 2 года, *Serratia marcescens* – 7 лет. Предполагается, что в этих условиях бактерии существуют за счет медленного окисления запасных полимеров (полигликанов, липидов) и продуктов разложения мертвых клеток (3,4).

У дрожжей, хранившихся в дистиллированной воде, проверяли энергию размножения, результаты которых представлены в таблице 2. При хранении в течение 12 месяцев большинство дрожжей сохраняли способность к размножению и при этом титры клеток исследуемых культур при культивировании на солодовом сусле на промежутке от 5 до 30 суток увеличились по сравнению с контрольным. Иная картина рассматривается при подсчете титров клеток дрожжей, хранившихся 24 месяцев в дистиллированной воде. Почти у все исследуемых культур понизилась энергия размножения. Анализируя полученные данные можно сгруппировать штаммы дрожжевых грибов по мере повышения или понижения энергии размножения, которая подвергается равномерному, либо скачкообразному изменению титра клеток культур.

Таблица 2

Энергия размножения дрожжевых грибов после хранения
в дистиллированной воде

Виды и штаммы дрожжей		Срок хранения в месяцах	Титр клеток в млн./мл. среды по суткам					
			Исходные	5	10	15	20	30
Candida pseudotropicalis:	AK 9	Контроль	2440	1750	2350	3100	2680	8350
		12	5120	4547	6200	7020	7460	7500
		24	790	400	650	1040	870	456
	AK 4	Контроль	1336,6	617,5	1497,5	385,7	1260	4200
		12	4613,3	2933	4600	6600	8700	9600
		24	293	380	300	270	210	112
	MA 88	Контроль	716,6	440	765	707,5	434,6	1050
		12	1810	4200	6900	7010	7866	2200
		24	1000	500	890	1080	760	630
	GA 16	Контроль	434,6	292,5	370	297,3	297,5	505
		12	5010	8200	9140	6600	7200	800
		24	360	500	570	640	600	500
	KD 19	Контроль	2093,3	1287,5	835	435,5	1700	2100
		12	3430	6067	9150	2800	920	521
		24	780	478	520	900	760	-
	KH 12	Контроль	1086,6	485	597,5	825	1570	3100
		12	1720	2040	3346,6	2210	5333	6436
		24	466	430	640	920	370	138
Candida kefir	DA13	Контроль	2026,6	632,5	780	840	1580	2100
		12	5120	1746	3550	5100	6150	7467
		24	640	420	450	540	500	210
	BD 2	Контроль	1580	360	550	680	720	1600
		12	1085,6	4300	3800	2600	700	229
		24	440	310	430	540	320	-
C.macedoniensis MI44	Контроль	866,6	447,5	1302,5	1950	1040	3130	
	12	1670	4200	8880	5600	930	270	
	24	180	510	780	1120	560	-	
C.tropicalis LK30	Контроль	1773,3	4325	665	1330	880	1810	
	12	2450	1693	2500	4105	4200	4510	
	24	190	490	340	450	270	196	
C.pelliculosa KT 55	Контроль	3613,3	1040	1592,5	792,5	2750	3706	
	12	8820	6320	4227	6200	7600	8200	
	24	840	330	750	1240	960	300	

Анализируя полученные данные можно сгруппировать штаммы дрожжевых грибов по мере повышения или понижения энергии размножения, которая подвергается, либо скачкообразному изменению титра клеток культур. После 12 месяцев хранения в первую группу объединили штаммы дрожжей с повышенной энергией размножения, титры клеток которых подвергнуты равномерному увеличению: *C.pseudotropicalis* AK9, AK4, MA88, GA16 и KH12, *C.kefir* DA13, *C.tropicalis* LK30 и *C.pelliculosa* KT55. Во вторую группу объединили штаммы *C.pseudotropicalis* KD19, *C.kefir* BD2 и *C.macedoniensis* MI44, которые имели также повышенную энергию размножения, но титры клеток после 20 и 30 суток культивирования уменьшились по сравнению с контрольным. После 24 месяцев хранения в дистиллированной воде у всех исследуемых культур произошли уменьшения энергии размножения, которые отображаются на титрах клеток по сравнению с контрольным.

Таким образом, при хранении дрожжевых культур в дистиллированной воде в течение 12 месяцев сохраняется способность размножаться и причем

энергия размножения повысилась. А вот после 24 месяцев хранения энергия размножения понизилась, вследствие истощения запасных веществ в клетке и увеличения количества погибших клеток.

Дальнейшими исследованиями необходимо установить изменения физиологических признаков дрожжевых грибов после хранения в течение 12 и 24 месяцев в дистиллированной воде. Из физиологических свойств проверяли бродильную и лактозосбраживающую активности. По способности сбраживать лактозу исследуемые культуры можно сгруппировать на лактозосбраживающие и лактозонесбраживающие дрожжевые организмы (табл.3). К первой группе относятся штаммы: *C.pseudotropicalis* АК9, АК4, МА88, GA16, KD19 и КН12, *C.kefir* BD2 и DA13. Ко второй группе относятся штаммы: *C.macedoniensis* MI44, *C.tropicalis* LK30, *C.pelliculosa* КТ55. После 12 месяцев хранения в дистиллированной воде, дрожжевые организмы сохранили способность сбраживать лактозу при культивировании на жидкой среде, содержащей дрожжевой экстракт и 2% лактозу. По умеренному образованию пузырьков газа на обратном колене трубки Дунбара судили о слабой способности сбраживания исследуемых дрожжей. А после 24 месяцев хранения тех же культур этот признак вовсе не проявился.

У дрожжевых грибов, хранившихся в дистиллированной воде, определяли бродильную активность, которая отражается на значениях титруемой кислотности (табл.4). Из таблицы 4. видно, что после хранения в дистиллированной воде у всех исследуемых культур титруемая кислотность уменьшилась в разной степени. После 12 месяцев хранения в воде наиболее сильное падение бродильной активности наблюдается у следующих штаммов: *C.pseudotropicalis* KD19 в 50 раз, *C.kefir* BD в 70 раз, *C.tropicalis* LK30 в 20 раз, *C.pelliculosa* КТ55 в 25 раз. У 7 штаммов дрожжей *C.pseudotropicalis* АК9, АК4, МА88, GA16, КН12, *C.kefir* DA13 и *C.macedoniensis* MI44 титруемая кислотность уменьшилась в 23,3;1,6;9;15;17,5;16,7 и 14,3 раза, соответственно. После 24 месяцев хранения дрожжей способность образованию органических кислот при культивировании на солодовом сусле резко снизилась и фактически бродильная активность вообще не проявлялась.

Таблица 3

Сбраживание лактозы дрожжевыми грибами после хранения в дистиллированной воде

Виды и штаммы дрожжей	Исходный	12 месяцев хранения	24 месяцев хранения	
<i>Candida pseudotropicalis</i> :	АК 9	++	+	–
	АК 4	++	+	–
	МА 88	++	+	–
	GA 16	++	+	–
	KD 19	++	+	–
	КН 12	++	+	–
	С.kefir:	DA 13	++	+
	BD 2	++	+	–
<i>C.macedoniensis</i>	MI 44	–	–	–
<i>C.tropicalis</i>	LK 30	–	–	–
<i>C.pelliculosa</i>	КТ 55	–	–	–

++ сильная степень, + слабая степень, – отсутствует

**Бродильная активность дрожжей после хранения
в дистиллированной воде (в градусах Тернера, М ± м)**

Виды и штаммы дрожжей		Исходный	12 месяцев хранения	24 месяцев хранения
Candida Pseudotropicalis:	AK 9	0,7 ± 0,03	0,03 ± 0,001	0,02 ± 0,01
	AK 4	1,0 ± 0,1	0,6 ± 0,03	0,5 ± 0,03
	MA 88	0,9 ± 0,05	0,1 ± 0,02	0,02 ± 0,001
	GA 16	0,6 ± 0,02	0,04 ± 0,001	0,02 ± 0,002
	KD 19	1,0 ± 0,1	0,02 ± 0,002	0,02 ± 0,001
	KN 12	0,7 ± 0,03	0,04 ± 0,001	0,02 ± 0,001
C.kefir:	BD 2	0,5 ± 0,02	0,03 ± 0,001	0,02 ± 0,001
	DA 13	1,4 ± 0,4	0,02 ± 0,001	0,02 ± 0,001
C.macedoniensis MI 44		1,0 ± 0,1	0,07 ± 0,001	0,02 ± 0,001
C.tropicalis LK 30		0,6 ± 0,2	0,03 ± 0,002	0,02 ± 0,001
C.pelliculosa KT 55		0,5 ± 0,2	0,02 ± 0,002	0,02 ± 0,001

Таким образом, проверка бродильных свойств дрожжей после хранения в дистиллированной воде еще раз доказывает неблагоприятное воздействие воды, которая вследствие низкой концентрации диффундируется во внутрь клетки и способствует накоплению продуктов обмена внутри нее и понижению жизнеспособности культур.

Для хранения дрожжевых культур в коллекции в стабильном состоянии необходимо выращивать их при оптимальных условиях. По многим данным наилучшие результаты получаются тогда, когда микроорганизмы берутся в стационарной фазе роста (3).

Таким образом, хранение дрожжей рода *Candida* в дистиллированной воде приводит к образованию спонтанных форм с новыми признаками, причем выживаемость после 12 месяцев хранения была высокой, что говорит о высокой жизнеспособности культур и повышении энергии размножения, хотя в отношении некоторых физиологических особенностей наблюдаемые изменения были в сторону ослабления изученных свойств. Однако же изучение свойств дрожжевых культур после 24 месяцев хранения дали неблагоприятные результаты, которые говорят об исчезновении лактозосбраживающей активности и уменьшение образования органических кислот, которые отражаются низкими значениями титруемой кислотности. Из этого следует, что данный метод хранения не практичен для дрожжевых культур, которые имеют важное промышленное значение. Лишь к некоторым из них можно применить этот метод хранения, хотя он не исключает возможности спонтанной изменчивости.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ганбаров Х.Г., Абдулгамидова С.М. – Изучение внутривидовых морфокультуральных изменений дрожжевых грибов, хранившихся в коллекции культур // Вестник Бакинского Университета, серия естественных наук, №1, 2007, стр.42-48.
2. Абдулгамидова С.М. Хранение коллекционных дрожжевых культур под вазелиновым маслом // Сборник статей Института Микробиологии НАН Азербайджана, 2007, т.V, стр.110-117.

3. Емцев В.Т., Мишустин Е.Н. Микробиология. М.: Дрофа, 2006, 448 с.
4. Ивгатов А.Л., Малов В.И. Химия воды и микробиология. М.: Инфа-М, 2006, 218 с.
5. Луста К.А., Фихте Б.А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов. Пушкино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1990, с.186.
6. Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии. М.: Академия, 2006, 352с.
7. Пенков Н.В., Пищиков Г.Б. Кинетическая модель процесса роста, размножения и гибели дрожжевых клеток // Хранение и переработка сельхозсырья, №7, 1999, с.61-63.
8. Плонский Н.А. Биометрия. М.: МГУ, 1998, 150 с.
9. Стоянова Л.Г., Аркадьева З.А. Сравнение способов хранения молочнокислых бактерий // Микробиология, 2000, т.69, №1, с.98-104.
10. Smith D. Culture collections over the world // International Microbiology, 2003, V.6, №2, p.95-100.

CANDIDA CİNSLİ MAYA GÖBƏLƏKLƏRİNİN DİSTİLLƏ SUDA SAXLANILMASI

S.M.ƏBDÜLHƏMİDOVA

XÜLASƏ

BDU-nun mikrobiologiya kafedrasının kolleksiyasından götürülmüş maya göbələklərinin distillə suyunda əkilmiş ştamların saxlanması tədqiq edilmişdir. 12 ay saxladıqdan sonra maya göbələklərinin həyati davamlılığı, fizioloji fəallığından fərqli olaraq, yüksəlmişdir. 24 ay saxladıqdan sonra onların bəzi vacib fizioloji xüsusiyyətləri yoxa çıxıb. Müəyyən edilmişdir, həmin saxlama metodu bu göbələklər üçün praktik deyil.

THE STORAGE OF COLLECTION OF YEAST CULTURES IN DISTILLATION WATER

S.M.ABDULHAMIDOVA

SUMMARY

It was studied the storage of some yeasts in distillation water. These yeasts were taken from microorganisms' culture collection of chair of microbiology of Baku State University. After 12 months of storage the survival rate yeasts was still high, but the physiological activity lost some important attributes. It is established that this technique of storage is unpractical for yeasts, which have important industrial meaning.