

**ECOLOGY AND FUNGAL BIOTECHNOLOGY**  
**Kalko E.I. (Republic of Belarus) Email: Kalko544@scientifictext.ru**

*Kalko Elena Ivanovna – Postgraduate Student,  
BIOTECHNOLOGICAL FACULTY,  
POLESSKY STATE UNIVERSITY, PINSK, REPUBLIC OF BELARUS*

**Abstract:** *there is a large variety of basidiomycetes which pharmacological properties are scarcely studied. So they are a promising research object for biotechnology. This work considers the ways to cultivation and increasing efficiency in cultivation on wood-destroying fungi, having antioxidant activity. The research results of the *Pleurotus ostreatus*, *Stereum hirsutum* biological peculiarities and the prospect assessment of its subsurface cultivation for the biotechnological purposes are presented in the article.*

**Keywords:** *mushrooms, basidiomycetes, mycelium, nutrient solution, vitrification of fung, subsurface cultivation.*

**ЭКОЛОГИЯ И ГРИБНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ**  
**Калько Е.И. (Республика Беларусь)**

*Калько Елена Ивановна – аспирант,  
кафедра биотехнологии,  
Полесский государственный университет,  
г. Пинск, Республика Беларусь*

**Аннотация:** *в мире насчитывается большое разнообразие базидиальных грибов, которые являются малоизученными в отношении их фармакологических свойств, и в результате они являются перспективным объектом исследования для биотехнологии. В данной работе рассматриваются способы культивирования и повышения эффективности в культивировании дереворазрушающих грибов, обладающих антиоксидантной активностью. В статье представлены результаты изучения биологических особенностей *Pleurotus ostreatus*, *Stereum hirsutum* и оценки перспективы их глубинного культивирования в биотехнологических целях.*

**Ключевые слова:** *грибы, базидиомицеты, мицелий, питательные среды, витрификация грибов, глубинное культивирование.*

УДК: 60:582.284

Современный этап развития мирового сообщества сопровождается глобальным кризисом ресурсов. Проблема экологической безопасности заключается в сохранении биосферы – основы обеспечения устойчивого развития мирового сообщества. Сбор грибов в природе лимитируется уроном, нанесенным экосистеме процедурой изъятия плодовых тел, в связи с этим грибная биотехнология удобна благодаря берегающему отношению к окружающей среде.

Отдел *Basidiomycota* – составляют около трети биологического разнообразия грибных организмов земли и определяют во многом такие процессы, как разложение лигноцеллюлозного детрита, почвообразование, повышение жизненности растений и целых сообществ через образование микориз [1, 2]. Среди множества групп базидиомицетов наиболее перспективными для культивирования считаются дереворазрушающие грибы, которые характеризуются быстрым накоплением биомассы и не требуют сложных питательных сред. Дереворазрушающие грибы в природе сопутствуют древесине, вызывая ее декомпозицию. Своими гифами грибы прорастают в древесину и разлагают ее на целлюлозные компоненты и/или лигнин [2, с. 14] (табл. 1).

*Таблица 1. Характеристика вызываемых грибами поражений*

<b>Вид грибов</b>	<b>Поражаемая им порода</b>	<b>Характер поражения</b>	<b>Способ питания гриба и его экологические особенности</b>
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Лиственные, изредка хвойные	Белая гниль заболонной древесины	Лигнинразрушающие грибы. Сапрофит, поражающий также ослабленные деревья.

<i>Stereum hirsutum</i>	Лиственные, изредка хвойные	Белая гниль заболонной древесины; в начале разложения древесина буроватая или розоватая	Лигнинразрушающие грибы Сапрофит, поражающий также ослабленные деревья и разрушитель валежа лиственных пород. Поражая пни, губит поросль. Может быть паразитом, на поврежденных деревьях.
-------------------------	-----------------------------	---	---

Медиаторные механизмы биодegradации, обнаруженные у дереворазрушающих базидиомицетов, опосредованные липидными радикалами, отличаются низкой субстратной специфичностью, что, позволяет им расщеплять не только такой устойчивый биополимер, как лигнин, но также и разнообразные стойкие органические соединения практически любого химического строения, включая полициклические ароматические углеводороды и другие ксенобиотики [2]. Водно-растворимые полисахариды выступают одним из ключевых классов лекарственных веществ в базидиомицетах, растущих на древесине [3]. Базидиомицеты классифицируются как грибы, обладающие хорошей антиоксидантной, антимикробной, противоопухолевой и иммуномодулирующей активностью [4-6].

Базидиальные грибы-ксилотрофы легко изолируются из природы и легко культивируются различными способами [7, 8]. Лабораторные культуры *P. ostreatus* и *S. hirsutum* известны с середины XX века [9, 10]. Для массового получения препаратов или очищенных биологически активных веществ из грибов может применяться как сбор плодовых тел в природе, так и биотехнологические приемы культивирования *ex situ*.

Целью данной работы является изучение морфологических особенностей штаммов *S. hirsutum*, *P. ostreatus* при разных способах культивирования и оценка перспективы культивирования в биотехнологических целях.

**Материалы и методы исследования.** Для исследований было взято два штамма базидиальных грибов *P. ostreatus* и *S. hirsutum*. Чистые культуры выделены из плодовых тел грибов, собранных в различных областях Беларуси (*P. ostreatus* в 2014 г. с лиственных деревьев в г. Минске, *S. hirsutum* в 2017 г. в г. Пинске). Для изучения особенностей роста в различных биотехнологических системах и определения морфологических признаков *S. hirsutum*, *P. ostreatus* проводили культивирование штаммов в поверхностных и глубинных условиях.

Для культивирования *S. hirsutum* оптимизировали питательную среду [7, с. 97]. Самым оптимальным источником углеводного питания для грибов является крахмал и сахароза, поэтому для поверхностного культивирования, приготовили картофельно-сахарозную среду. Очищенные, нарезанные клубни картофеля отварили до готовности, отвар фильтровали, объем фильтрата доводили до 1 л, добавляли сахарозу, агар-агар (100 г/л картофельного отвара, 10 г/л сахарозы, 1.5% агар-агара), pH 5,0-6,0. Для среды использовали картофель сорта Скарб, пищевая сахароза ГОСТ 21-94, экспериментальные исследования требуют высокого качества воды, поэтому использовали дистиллированную воду. Среду нагревали до полного растворения агар-агара. Приготовленную среду по 200-300 мл разливали в стерильные колбы (колбы заполняли на 2/3). Среду в колбах с ватно-марлевыми пробками стерилизовали, в автоклаве 112°C, 40 мин.

Выделение чистой мицелиарной культуры гриба проводили из плодовых тел [7, 8, 11] в ламинарном боксе, на чашках Петри с агаризированной питательной средой. На каждый изолят готовили стерильные чашки Петри № 1 и № 2, со средой в количестве 12 мл. Чашка Петри № 2 служила для промежуточной пересадки гриба, в качестве посредника между чашкой Петри №1 с кусочками плодовых тел и пробиркой для закладки изолята на хранение, так как при выделении из плодовых тел велик риск инфицирования. Для предотвращения загрязненности инокулюма бактериями, в питательную среду добавляли антибиотик из расчета: тетрациклин 30 мкг – на 1 мл среды. Каждый кусочек плодового тела накалывали одноразовой стерильной иглой и опускали в 3% раствор H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, затем прокаленным над спиртовкой пинцетом переносили инокулюм на поверхность питательной среды в чашке Петри № 1, в центр. Чашки Петри заклеили пленкой, что предохраняло кусочек плодового тела от высыхания и помещали в термостат при 27±1°C на 14 дней до полного обрастания культурой субстрата.

Через 2 дня после засева на стерильную питательную среду кусочки плодового тела начинали опухать растущим мицелием, в процессе роста проводили микробиологический контроль. Готовили микроскопический препарат воздушного мицелия изучаемых штаммов, чтобы убедиться, что растет целевой объект. Диагностическим признаком *S. hirsutum* являются редкие пряжки, расположенные в мутовках и коричневато-желтоватая пигментация мицелия. Диагностические признаки мицелия *S. hirsutum in vitro* широкие гифы с редкими пряжками в мутовках по 2-3; гифы среднего диаметра с редкими одиночными пряжками; слабо разветвленные тонкие гифы. Диагностические признаки *P.*

*ostreatus* – на культуральном мицелии образуются многочисленные, одиночные, парные множественные пружки.

Для получения коллекции ствольных маточных культур *S. hirsutum* и *P. ostreatus* через 14 дней из чашки Петри агаровый фрагмент с мицелием гриба пересаживали в стерильную пробирку с ватно-марлевой пробкой, на короткий агаровый косяк для культивирования в термостате  $27\pm 1^\circ\text{C}$ , 14 дней и дальнейшего хранения. На пробирке записывали дату инокуляции, штамм. Маточные культуры хранятся в пробирках на агаризованных питательных средах при температуре  $4\pm 1^\circ\text{C}$ .

Пересев делается 1 раз в год, чаще пересевать культуру не рекомендуется, чем реже происходит пересев коллекции, тем меньше клеточных делений претерпевает культура и тем ближе она по своим свойствам к исходному изоляту. Соответственно, чтобы избежать частых пересевов, количество единиц хранения должно быть таким, чтобы не пришлось делать дополнительных пассажей в течение срока, на который культура заложена на хранение.

Культуры, выращенные поверхностным способом, в дальнейшем использовали в качестве посевного материала для глубинного культивирования. Для получения биомассы в погружной культуре готовили картофельно-сахарозную среду [7, с. 97], очищенные, нарезанные клубни картофеля отваривали до готовности, отвар фильтровали, объем фильтрата доводили до 1л, добавляли сахарозу, агар-агар (400 г/л картофельного отвара, 30 г/л сахарозы), рН 5,0-6,0. Для среды использовали картофель сорта Скарб, пищевая сахароза ГОСТ 21-94, дистиллированная вода. Приготовленную среду по 200 мл разливали в стерильные колбы объемом 500 мл. Среда в колбах с ватно-марлевыми пробками стерилизовали, в автоклаве  $112^\circ\text{C}$ , 40 мин.

Благоприятные условия глубинного культивирования *S. hirsutum*, *P. ostreatus* в термостате при температуре  $27\pm 1^\circ\text{C}$ , с использованием механического перемешивания, на качалке при 70 об./мин, в течение 21 дня.

**Результаты и их обсуждение.** В процессе роста инокулюма наблюдали за морфолого-культуральными особенностями мицелиальной культуры: вид колонии, цвет, зону роста, край колонии, цвет реверзума (обратной стороны колонии), зараженность колонии, посторонней микрофлорой и т.д. (табл. 2).

Таблица 2. Культурально-морфологические особенности поверхностного культивирования *S. hirsutum* и *P. Ostreatus*

Вид грибов	На чало роста	Зарастан не чашки	Мицелий	Реверс колонии	Микро-морфологические признаки
<i>Pleurotus ostreatus</i>	7 день	10–14 дней	Молочно-белый, в центре войлочный.	Белый с молочным оттенком. Пигмент в среду не проникает. Мицелий легко отделяется от субстрата.	Септированные мицелий с анастомозами и пружками базидий.
<i>Stereum hirsutum</i>	8 день	12–14 дней	Бело-желтый, в центре войлочный.	Белый с желтоватым оттенком. Пигмент в среду не проникает. Мицелий легко отделяется от субстрата.	Желтая пигментация мицелия, широкие гифы с редкими пружками базидий.

Повторность экспериментов 4 кратная. Каждые 2-3 суток в течение 14 дней измеряли диаметр колонии в 3-х направлениях, а также высоту колонии (мм). Отмечалась плотность колонии по трехбалльной системе (1 балл – редкая, 2 балла – средняя, 3 балла – плотная). Исследовалась скорость роста колонии на 3,5,7,9,14 сутки и вычисляется ростовой коэффициент (РК) по формуле (1):

$$PK = d \times h \times g \div t \quad (1)$$

Где d – диаметр колонии, мм; h – высота колонии, мм; g – плотность колонии, балл; t – возраст колонии, сутки.

РК позволяет сравнивать рост культур разного возраста и колоний с различной текстурой. Его определяли, когда колония достигала максимального размера. 3 группы: быстрорастущие  $PK > 100$ , растущие со средней скоростью  $PK = 50-100$ , медленно растущие  $PK < 100$  [11, с. 17].

Эксперименты показали, что по скорости роста на картофельно-сахарозной среде, в течении 14 дней, при температуре  $27\pm 1^\circ\text{C}$ , разделены: на быстрорастущие (*P. ostreatus*  $PK = 70-100$ ); среднерастущие (*S.*

*hirsutum* РК = 50–100). Отмечено, что мицелий *S. hirsutum*, в сравнении с *P. ostreatus* растет в поверхностной культуре гораздо медленнее.

Поверхностное культивирование имеет отрицательные стороны, так как мицелий находится в неблагоприятных и неодинаковых условиях. Воздушный мицелий удален от питательных веществ, но лучше снабжается кислородом, а субстратный мицелий находится в анаэробных условиях, но при этом в тесном контакте с питательной средой.

Преимущества глубинного культивирования: механическое перемешивание и непрерывная аэрация создают благоприятные условия для доступа питательных веществ и кислорода ко всем клеткам мицелия гриба. Обеспечивая одинаково благоприятные условия роста и накопления продуктов метаболизма. Глубинный процесс более экономичен, так как при этом сокращается срок ферментации и увеличивается количество получаемого продукта. Биомасса, полученная методом глубинного культивирования, может быть в дальнейшем использована в качестве посевного материала для получения плодовых тел на растительном субстрате.

При глубинном культивировании картофельно-сахарозная среда существенного влияния на рост колоний и их особенностей не оказала, *S. hirsutum* и *P. ostreatus* успешно развивались на исследуемой среде. Опущение мицелия было отмечено на 2 день во всех колбах. Рост мицелия был отмечен на 7-8 день во всех колбах. При глубинном культивировании *S. hirsutum* образует пеллеты плотные, студенистые, у *P. ostreatus* шарообразные скопления мицелия – рыхлые, ворсисто-лучистые, и кроме того наблюдается нарастание мицелия на стенки сосуда над уровнем питательной среды, у *P. ostreatus* тонкие тяжи, а у *S. hirsutum* более плотные.

Вследствие высокой степени обводнения и сравнительно хрупких клеточных стенок культивируемые клетки грибов чувствительны к перемешиванию и снабжению кислородом, рекомендуется при промышленном получении использовать специальные ферментеры.

Анализируемыми признаками в эксперименте являлись морфологические особенности культуры (количество, размеры, форма мицелия, биомасса). По окончании культивирования производили визуальную оценку морфологических особенностей мицелия *S. hirsutum*, *P. ostreatus* отделив его биомассу из каждой повторности от культуральной жидкости, замеряли и подсчитывали мицелиальные клубочки и тяжи [8, с. 230].

Закономерности влияния глубинного культивирования на количество и размер образовавшихся клубочков и тяжелой мицелия *S. hirsutum*, *P. ostreatus* можно проследить в табл. 3, 4.

Таблица 3. Характер роста *S. hirsutum* (n=4) в погружной культуре

№ опыта	Количество клубочков и тяжелой мицелия <i>S. hirsutum</i> по классам диаметра (см)							
	0,3-0,5		0,6-2,0		2,1-3,0		3,1-7,5	
	клубоч ки	тяж	клубоч ки	тяж	клубоч ки	т яж	клубоч ки	т яж
Вариант 1	0	0	10,0	0	0	0	2,0	0
Вариант 2	0	0	1,0	3,0	0	0	1,0	0
Вариант 3	6,0	0	0	3,0	1,0	0	2,0	0
Вариант 4	50,0	3,0	0	0	0	0	1,0	0
Среднее значение	14,0±12,0	0,25±0,25	2,75±2,4	0,5±0,28	0,25±0,25	0	1,5±0,25	0

Таблица 4. Характер роста *P. ostreatus* (n=4) в погружной культуре

№ опыта	Количество клубочков и тяжелой мицелия <i>P. ostreatus</i> по классам диаметра (см)							
	0,3-0,5		0,6-2,0		2,1-3,0		3,1-7,5	
	клубоч ки	тяж	клубоч ки	тяж	клубоч ки	т яж	клубоч ки	т яж
Вариант 1	24,0	0	3,0	1	0	0	0	0
Вариант 2	30,0	0	8,0	0	2,0	0	0	0
Вариант 3	20,0	0	5	1,2	0	0	1,0	0
Вариант 4	88,0	0	8,0	0	0	0	1,0	0
Среднее значение	40,5±15,9	0	6,0±1,2	0,55±0,32	0,5±0,5	0	0,5±0,28	0

значение								
----------	--	--	--	--	--	--	--	--

Оценку морфологических особенностей культуры *S.hirsutum* и *P.ostreatus* проводили для каждой повторности, замеряли объем культуральной жидкости и взвешивали влажный мицелий, удаляя излишки при помощи промокательной бумаги, табл. 5.

Таблица 5. Сравнительные показатели результатов глубинного культивирования *S.hirsutum* и *P.ostreatus* в питательной среде

№ опыта	Сравнительная характеристика прироста <i>S. hirsutum</i> , <i>P. ostreatus</i> in vitro			
	Влажная масса культурального мицелия <i>P. ostreatus</i> , г	Объем культуральной жидкости <i>P. ostreatus</i> , мл	Влажная масса культурального мицелия <i>S. hirsutum</i> , г	Объем культуральной жидкости <i>S. hirsutum</i> , мл
1	4,65	200	42	150
2	13,1	180	28,77	90
3	10,5	150	30,33	120
4	19	140	12,6	125
Среднее значение	11,8±2,9	167,5±13,7	28,3±6,1	121,2±12,3

Разительны были отличия по наращиванию биомассы – на 21 день in vitro влажная масса мицелия *P. ostreatus* составила 11,8±2,9, а мицелия *S. hirsutum* 28,3±6,1 г, культуральной жидкости *P. ostreatus* составила 167,5±13,7, а мицелия *S. hirsutum* 121,2±12,3. Следовательно, выход мицелия *S. hirsutum* больше мицелия *P. ostreatus* в 2,4 раза, выход культуральной жидкости *S. hirsutum* меньше *P. ostreatus* в 1,3 раза.

В процессе отбора показано, что для *S. hirsutum* характерны быстрый рост и значительная продукция биомассы в погружной культуре, способность использовать субстраты, пригодные для промышленного производства мицелия, установлена неприхотливость в отношении источников питания. Способность усваивать дешевые субстраты обеспечивает экономическую эффективность культивирования *S. hirsutum*, *P. ostreatus*. Важным признаком, который так же необходимо учитывать при отборе для культивирования, является способность продуцента противостоять контаминации посторонней микрофлорой. Культивирование грибов ведется на питательных средах при pH в пределах 5–7, создает благоприятные условия для загрязнения посторонней микрофлорой и выдвигает жесткие требования к стерильности процесса ферментации. Поэтому устойчивость *S. hirsutum* к посторонней микрофлоре, способность конкурировать с другими микроорганизмами является очень ценным качеством продуцента, которому так же надо придавать большое значение при отборе.

**Вывод.** Таким образом, были исследованы морфологические особенности штаммов *S. hirsutum* и *P. ostreatus* в различных биотехнологических системах. Показано, что благодаря легкости выделения в культуру, хорошему росту в лабораторных условиях *S. hirsutum* и *P. ostreatus* будет использован для промышленного получения биомассы, как штамм быстрорастущий и накапливающий значительную биомассу в различных условиях культивирования. Биотехнологические методы культивирования грибов – сохраняют биологическое разнообразие грибных организмов земли, не нанося вреда экосистеме.

#### Список литературы / References

1. Watkinson M. An investigation into the synthesis of azido-functionalised coumarins for application in 1, 3-dipolar “click” cycloaddition reactions // Dyes and Pigments, 2016. Vol. 135. P. 36–40.
2. Рупачек В. Биология дереворазрушающих грибов. М.: Лесная промышленность, 1967. 276 с.
3. Бабицкая В.Г., Пучкова Т.А., Щерба В.В., Осадчая О.В. Ксилотрофный базидиомицет *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. – продуцент биологически активных веществ // Вестник Фонда фундаментальных исследований (Минск), 2005. № 4 (34). С. 40–49.
4. Qin H. et al. Cell factories of higher fungi for useful metabolite production // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol, 2016. Vol. 155. P. 199–235.
5. Yun B.S. et al. Sterins A and B new antioxidative compounds from *Stereum hirsutum* // J. Antibiot, 2002. Vol. 55. P. 208–210.

6. *Калько Е.И. под ред. Вальцева С.В. и др.* Тестирование антиоксидантной активности культуральной жидкости *Pleurotus ostreatus*, с использованием липосомной модели // Научные исследования, 2017. № 9 (20). С. 5–9.
7. *Бухало А.С.* Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. Киев: Наукова думка, 1988. 144 с.
8. *Бисько Н.А., Бухало А.С., Вассер С.П. и др.* под ред. Дудки И.А. Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубинной культуре. Киев: Наукова думка, 1983. 312 с.
9. *Falck R.* Über die Waldkultur des Austernpilzes (*Agaricusostreatus*) auf frischenLaubholzstubben // ZeitschriftfürForst- und Jagdwesen, 1917. Bd. 19. P. 159–165.
10. *Sziuecs J.* Method of growing mushroom mycelium and the resulting products. Patent US2850841. Patented Sept. 9, 1958. Application April 19, 1948.
11. *Бисько И.А., Дудка И.А.* Биология и культивирование съедобных грибов рода вешенка: монография // Киев: Наукова думка, 1987. 148 с.