

**На правах рукописи**

**Лыков Юрий Сергеевич**

**Влияние модификации лигноцеллюлозного субстрата  
на рост и развитие ксилотрофных базидиомицетов**

**Специальность 03.02.12 – микология**

**Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Москва – 2011**

Диссертационная работа выполнена в лаборатории биохимии кафедры биологии животных и ветеринарии ФГОУ ВПО «Пензенская ГСХА» и в Региональном Центре государственного экологического контроля и мониторинга по Пензенской области ФГУ «ГосНИИЭНП», г. Пенза

**Научный руководитель:** кандидат биологических наук, доцент  
Ильина Галина Викторовна

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор  
Громовых Татьяна Ильинична  
кандидат биологических наук  
Сафрай Алла Иосифовна

**Ведущая организация:** Учреждение Российской академии наук «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН» (г. Саратов)

Защита состоится 11 февраля 2011 г. в 15.30 на заседании диссертационного совета Д 501.001.46 при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова по адресу:

119991, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы, МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, ауд. М-1, тел./факс: (495) 939-39-70

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Автореферат диссертации размещен на сайте [www.bio.msu.ru](http://www.bio.msu.ru)

Автореферат разослан «\_\_» января 2011 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



М.А. Гусаковская

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

**Актуальность темы.** Традиционно в культуре выращивается множество видов ксилотрофных базидиомицетов. В последние десятилетия все больше внимания обращает на себя группа грибов-ксилотрофов, обладающих лечебно-профилактическими свойствами. Исследования, проводящиеся в этом направлении, позволили установить наличие лечебных свойств у значительного числа видов. Перечень медицинских грибов постоянно растет, поскольку те или иные ценные свойства выявляются у новых видов. Кроме того, большое внимание уделяется изучению возможностей использования ферментных комплексов ксилотрофных базидиомицетов. Высокий окислительный потенциал и неспецифический характер ферментов лигнолитического действия позволяют использовать их для разрушения органических ксенобиотиков, очистки сточных вод, получения модифицированной древесины (Кадималиев и др., 2006; Горбатова и др., 2007; Королева, 2007). Естественные местообитания в своем разнообразии представляют собой богатый природный резерват штаммов и видов, способных обладать уникальными индивидуальными особенностями. Это свидетельствует о необходимости мониторинга видового разнообразия ксилотрофных базидиомицетов в различных регионах и изучения их экологии. Большой интерес представляет влияние на ход развития гриба со стороны его природного субстрата. По мнению ряда авторов, лигнин, как компонент этого субстрата, может влиять на морфогенез культуры в естественных условиях (Фенгел, 1988). Довольно сложно создать условия, приближенные к природным, при выращивании видов и штаммов в культуре. В то же время одной из проблем практического грибоводства является поиск оптимальных субстратов для культивирования, способных обеспечить максимальную реализацию природного потенциала вида в условиях культуры. Использование доступных древесных субстратов (опилок) не всегда обеспечивает нормальное развитие культуры и ее высокую продуктивность. Кроме того, известно, что ксилотрофные базидиомицеты различаются по отношению к степени деструкции древесины, которую колонизируют (облигатные и факультативные паразиты, сапротрофы). В связи с этим актуальным представляется поиск путей подготовки субстрата для культивирования, с тем, чтобы оптимизировать развитие культур не только традиционных, но и вновь вводимых в искусственную культуру видов.

**Цель и задачи исследований.** Целью работы было изучение влияния модификаций лигноцеллюлозного субстрата на процессы роста и развития видов ксилотрофных базидиомицетов в чистой культуре.

Для достижения цели предполагалось решение следующих задач:

1. создать коллекцию видов ксилотрофных базидиомицетов, распространенных в районе исследований и отличающихся субстратной специализацией;
2. изучить культурально-морфологические особенности развития видов на традиционных питательных средах;
3. изучить возможности культивирования и особенности развития видов ксилотрофных базидиомицетов с различной субстратной специализацией в природе, а также вызывающих разные типы гнилей древесины, на экстрагированных опилках и их метоксилированных дериватах;
4. изучить влияние внесения в различные питательные среды различных по структуре источников целлюлозы и лигнина (нативных экстрагированных опилок и их метоксилированных дериватов) на процессы роста и развития культур;

5. определить роль нативного и дериватизированного лигнина, как компонентов субстратов, в регуляции плодоношения у перспективных в биотехнологии видов.

**Научная новизна.** Определено, что субстратная приуроченность ксилотрофных базидиомицетов к древесине разной степени разложения определяет особенности их развития в чистой культуре. Впервые обнаружены возможности культивирования видов, независимо от их субстратной специфичности в природе, на субстратах, содержащих экстрагированные метоксилированные лигноцеллюлозные компоненты. Установлено стимулирующее влияние метоксильных групп лигнина на процесс синтеза эргостерина и плодоношение в культуре у грибов белой гнили.

**Практическая значимость.** Установлена целесообразность использования метанолизных (обогащенных метоксильными группами) лигноцеллюлозных источников в качестве компонентов питательных сред для культивирования ксилотрофных базидиомицетов. Предложены рецептуры питательных сред для выращивания биомассы мицелия, а также твердых органических субстратов для получения плодовых тел *Ganoderma lucidum*.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Процессы экстрагирования и метанолиза материала дубовых опилок обеспечивают получение лигноцеллюлозного субстрата, пригодного для культивирования *ex situ* видов ксилотрофных базидиомицетов независимо от их субстратной специфичности в природе.
2. Введение нативных и метоксилированных лигноцеллюлозных источников в рецептуру питательных сред интенсифицирует обменные процессы и стимулирует развитие культур ксилотрофных базидиомицетов.
3. Метоксильные группы лигнина стимулируют накопление биомассы мицелия большинства видов ксилотрофных базидиомицетов, а также интенсифицируют процесс синтеза эргостерина у грибов белой гнили.
4. Включение в состав субстратов метоксилированных лигноцеллюлозных компонентов стимулирует процессы образования примордиев (зачатков плодовых тел) у грибов белой гнили, а также способствует плодоношению при реализации интенсивной технологии культивирования.

**Апробация работы.** Результаты исследований были доложены на конференциях: Всероссийской научно-практической конференции «Мониторинг природных экосистем» (Пенза, 2008); Научно-практической конференции «Образование, наука, практика: инновационный аспект» (Пенза, 2008); Научно-практической конференции молодых ученых «Инновационные идеи молодых исследователей для агропромышленного комплекса России» (Пенза, 2009); II Междисциплинарном Микологическом форуме (Москва, 2010).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 8 работ, из них 4 – в печатных изданиях перечня ВАК РФ, 1 работа находится в Центральной печати.

**Личный вклад автора.** Автором самостоятельно спланированы и осуществлены полевые и лабораторные исследования, проведены статистическая обработка и интерпретация данных, полученных в ходе выполнения работы.

**Объем и структура работы.** Диссертационная работа состоит из введения, шести глав, заключения, выводов, списка литературы, включающего 152 источника, и приложений, содержащих материалы статистической обработки. Текст изложен на 157 страницах. Основная часть работы содержит 12 таблиц и 52 иллюстрации (диаграммы, рисунки, фотографии).

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Глава состоит из трех разделов. В первом разделе анализируются существующие взгляды относительно экологического статуса ксилотрофных базидиомицетов (Бондарцев, 1953; Степанова, Мухин, 1979; Мухин, 1985; Бурова, 1986; Стороженко и др., 1992; Мухин, 1993; Бондарцева, 2000). Рассматривается роль организмов этой группы в природных экосистемах, факторы, определяющие трофическую структуру ксилотрофного микоценоза (Мухин, 1993; Сафонов, 2003). Обсуждаются проблемы субстратной приуроченности к древесине различных пород и сукцессионной динамики видов на разных стадиях разложения древесины (Гордиенко, 1979; Стороженко, 2002). Рассматриваются дискуссионные вопросы, связанные с трофическими стратегиями отдельных видов (Синадский, 1977; Гарибова, 2005). Во втором разделе описана структура и свойства древесных субстратов, используемых грибами в природе, рассматривается структура, свойства и специфические особенности молекул лигнина (Фенгел, 1988; Дудкин, 1991; Азаров, 1999). Приводится описание хода биodeградации лигнина ксилотрофными базидиомицетами (Umezawa, Higuchi, 1988; Akamatzu, 1990; Leonowicz et al., 1991; Gold, Alic, 1993), указывается на приоритетную утилизацию метоксильных групп в ходе этого процесса (Фенгел, 1988). Описаны процессы деструкции древесины грибами различных типов гнилей, с учетом особенностей их ферментативных комплексов (Kirk et al., 1986; Rayner, Boddy, 1988; Boominathan, Reddy, 1992; Blanchette, 1995; Решетникова, 1997; Королёва, 2006; Ребриков, 2006; Айзенштадт, 2009). Третий раздел посвящен анализу трофических потребностей ксилотрофных базидиомицетов в чистой культуре. Описаны традиционные и оригинальные подходы к выбору субстрата в зависимости от цели культивирования (Беккер, 1988; Бухало, 1988; Краснополянская, 2001; Горшина, 2008; Ковалёва, 2007; Древаль, Бойко, 2009; Антоненко и др., 2009; Обрезкова и др., 2010; Шахсеванимуджарад и др., 2010).

### 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводились в течение 4-х лет (2006-2010 гг.) на базе биохимической лаборатории Пензенской государственной сельскохозяйственной академии и Центральной экоаналитической лаборатории Регионального центра государственного экологического контроля и мониторинга по Пензенской области. Исследования включали несколько этапов, в том числе полевые (сбор, определение, наблюдения в природе) и лабораторные: выделение чистых культур и весь комплекс исследований для решения поставленных задач.

Объектами исследования послужили 10 видов дереворазрушающих грибов, из числа широко распространенных на территории Пензенской области: *Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.) Pilát (трутовик скошенный), *Phellinus tremulae* (Bondartsev) Bondartsev & P.N. Borisov (ложнотрутовик осиновый), *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst. (трутовик окаймленный), *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill (трутовик серно-желтый), *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. (трутовик плоский), *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. (трутовик лакированный), *Fomes fomentarius* (L.) J.J. Kickx (трутовик настоящий), *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. (корневая губка) *Pycnoporus cinnabarinus* (Jacq.) P. Karst. (трутовик киноварно-красный), *Fistulina hepatica* (Schaeff.) Sibt (трутовик печёночный). В эксперименте включено по три штамма каждого вида. Определение базидиом проводили с помощью определителей (Бондарцева, Пармаца, 1986), сбор и последующее выделение чистых культур проводили по общепринятым методикам (Бухало, 1988). При определении трофической специализации изученных видов грибов ис-

пользовали взгляды ряда учёных (Бондарцев, 1953; Бондарцева, 1986; Стороженко, 2002, 2007), а также личные наблюдения автора в районе исследований. При определении степени разложения древесных субстратов использовали пятибалльную шкалу (Гордиенко, 1979). Описание колоний проводили при культивировании на сусл-агаре при температуре +26°C (Stalpers, 1978), определяли средние скорости роста линейным методом (Билай, 1982) и ростовой коэффициент (Бухало, 1988). Культуры грибов, культивируемые в чашках Петри, инкубировали в термостате при +24 -+26°C. Культивирование в глубинных условиях осуществлялось в колбах Эрленмейера на эксцентриковой качалке при скорости вращения 225 об./мин с эксцентриситетом 2,5 см, и температуре +24 - +26°C.

Дубовые опилки, используемые в опыте, были подвергнуты экстракции в аппарате Сокслета спирто-толуольной смесью и диэтиловым эфиром в течение 8 часов (Оболенская, 1991), затем высушивались до постоянной массы на водяной бане с прямым холодильником. В дальнейшем половина этого материала была подвергнута процессу метанолиза, то есть обработке 0,3 % раствором HCl в метаноле при нормальных условиях в течение 4 суток. Эта процедура позволяет увеличить число доступных метоксильных (-OCH<sub>3</sub>) групп в молекуле лигнина, а также повысить содержание всевозможных мономерных, димерных и олигомерных производных фенолов, которые могут образоваться посредством разрыва эфирных связей в молекуле лигнина (Закис, 1987). Определение содержания метоксильных групп в субстратах осуществлялось методом Цейзеля в модификации с применением газо-жидкостной хроматографии (Закис, 1987). Использован газовый хроматограф «Varian CP 3800» с пламенно-ионизационным детектором, оснащённый капиллярной колонкой CP-Wax 52 CB (полиэтиленгликоль). В части исследований в условиях глубинного культивирования использовали экстракты (перколяты) модельных соединений лигнина, полученных из нативных (не подвергнутых метанолизу) и метанолизных опилок (Грушников, 1973; Фенгел, 1988; Оболенская, 1991; Боголицин, 1994).

Общую оксидазную и общую пероксидазную активность определяли спектрофотометрически. О целлюлазной активности судили косвенно по осахариванию экстрагированных нативных и метанолизных опилок, определяя концентрацию глюкозы глюкозооксидазным методом и по убыли холоцеллюлозы (сумма целлюлозы и гемицеллюлозы) в субстратах в конце периода культивирования.

Определение содержания целлобиозы в культуральной жидкости и эргостерина в мицелии грибов осуществлялось методом газо-жидкостной хроматографии (Гёрёг, 1985) на хроматографе «Кристалл-2000 М» с пламенно-ионизационным детектором, оснащённым набивной колонкой с насадкой – 5% SE-30 на инертоне с использованием соответствующих стандартов фирмы «Merck».

Активность дегидрогеназ определяли с помощью гистохимической методики, основанной на индикаторных свойствах нитросинего тетразолия (Барыкина и др., 2000). Выгонка плодовых тел проводилась по общепринятым методикам при интенсивном способе культивирования на твердых органических субстратах.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью компьютерной программы для обработки и анализа статистических данных «Statistica 6.0». Для оценки достоверности влияния структуры и состава субстратов на определяемые параметры проводился дисперсионный анализ полученного массива данных (ANOVA), использовался t-критерий Стьюдента при уровне значимости 0,95 (Халафян, 2007). В ходе работы велась фотодокументация.

## 3 ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ ВИДОВ КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ В УСЛОВИЯХ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ

### 3.1 Культурально-морфологические особенности исследованных видов

Были изучены морфолого-культуральные особенности видов и штаммов. Установлено высокое разнообразие этих показателей, причем выявлена тенденция связи между шириной субстратной приуроченности вида в природе и разнообразием культурально-морфологических характеристик в условиях чистой культуры.

Виды-эвритрофы, встречающиеся в природе на древесине разных пород и разной степени разложения, имеют внутривидовые отличия в скоростях роста, макро- и микроскопических особенностях мицелия. Виды-стенотрофы более однообразны в культуре. Однако для установления более четких закономерностей потребуются исследование значительно большего числа штаммов в пределах каждого вида.

### 3.2 Особенности развития штаммов с различными трофическими стратегиями на традиционных питательных средах

Проведенное сравнение средних скоростей роста и ростовых коэффициентов видов с различными трофическими стратегиями в природе на разных средах (КГА, сусло-агар) выявило отличия между облигатными паразитами, факультативными паразитами и факультативными сапротрофами (рис. 1). Так, средние скорости роста видов факультативных паразитов на сусло-агаре выше, чем облигатных, почти в 3,5 раза ( $P=0,0001$ ), а факультативных сапротрофов – в 2,5 раза ( $P=0,001$ ). Следует отметить, что визуально заметное сравнительно более интенсивное развитие факультативных паразитов по сравнению с факультативными сапротрофами может объясняться большей долей аминного азота, наличием доступных сахаров (мальтозы) и присутствием витаминов группы В в сусло-агаре. Выявлены отличия в динамике развития мицелия разных видов на указанных средах (рис. 2). Установлено, что более растянутая во времени фаза адаптации характерна для видов с паразитической стратегией в природе на картофельно-глюкозном агаре.

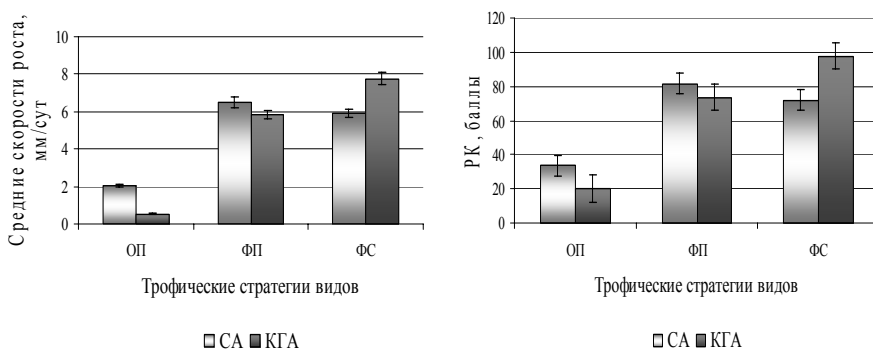


Рис. 1 – Средние значения скоростей роста (слева) и ростовых коэффициентов (РК, справа) у видов ксилотрофных базидиомицетов разных трофических стратегий на разных агаризованных средах. Условные обозначения: ОП – облигатные паразиты; ФП – факультативные паразиты; ФС – факультативные сапротрофы

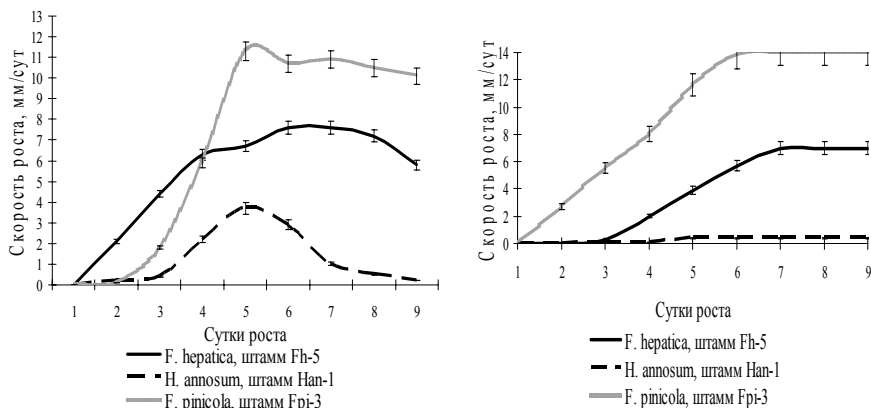


Рис. 2 – Динамика скоростей роста мицелия видов ксилотрофных базидиомицетов – представителей разных трофических стратегий на разных средах (слева – сусло-агар, справа – картофельно-глюкозный агар, 26°C)

На основании полученных данных можно прийти к выводу о нецелесообразности использования крахмалистых питательных сред для культур паразитических видов, и, напротив, сапротрофы лучше развиваются на средах, содержащих «пролонгированные» источники сахаров.

#### 4 ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСНЫХ ИСТОЧНИКОВ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ И ЛИГНИНА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ШТАММОВ КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

##### 4.1 Влияние различных по структуре комплексных источников целлюлозы и лигнина на рост и развитие мицелия ксилотрофных базидиомицетов

В ходе исследований проведено изучение особенностей развития мицелиальных культур изученных видов на субстратах из экстрагированных дубовых опилок, содержащих одинаковое количество целлюлозы, но формы лигнина с разной степенью конденсации молекулы (нативные и метанолизные опилки). Содержание метоксильных групп в нативных опилках составляло 18,9 мг/г материала или 0,61 мМ/г; содержание метоксильных групп в опилках, подвергшихся метанолизу, было более, чем вдвое выше и составляло 41,6 мг/г (1,32 мМ/г). Содержание холоцеллюлозы в образцах опилок было приблизительно на одном уровне и составляло от 78,7 до 81,6%.

Культуры всех изученных видов, независимо от субстратной специфичности и типа гнили развивались на опилочных субстратах. Даже виды, никогда не встречающиеся в природе на древесине дуба, росли и развивались на материале опилок. Этот факт мы объясняем результатом глубокого экстрагирования, которое позволило «обезличить» материал. Рост культур по сравнению с развитием на агаризованных средах был замедлен.

Мицелий, растущий на метанолизных опилках, характеризовался большей плотностью и лучше развитым воздушным мицелием, хотя темпы роста чаще были ниже, чем в альтернативном варианте (табл. 1).



Таблица 1 – Средние скорости роста мицелия штаммов изученных видов на стерильных дубовых опилках (мм/сут, 26°C, повторность трехкратная)

| Вид, штамм            | Штаммы | Особенности субстрата |                     |
|-----------------------|--------|-----------------------|---------------------|
|                       |        | Нативные опилки       | Метанолизные опилки |
| <i>I. obliquus</i>    | IO-1   | <b>3,7±0,3*</b>       | <b>1,5±0,1</b>      |
|                       | IO-2   | <b>3,6±0,4</b>        | <b>1,5±0,2</b>      |
|                       | IO-3   | <b>3,5±0,3</b>        | <b>1,7±0,1</b>      |
| <i>Ph. tremulae</i>   | Pht-1  | <b>3,5±0,5</b>        | <b>0,8±0,2</b>      |
|                       | Pht-2  | <b>3,5±0,6</b>        | <b>1,1±0,3</b>      |
|                       | Pht-3  | <b>3,1±0,6</b>        | <b>1,9±0,2</b>      |
| <i>F. pinicola</i>    | Fpi-1  | <b>1,5±0,3</b>        | <b>2,5±0,5</b>      |
|                       | Fpi-2  | <b>1,2±0,3</b>        | <b>2,3±0,5</b>      |
|                       | Fpi-3  | 1,8±0,4               | 2,1±0,4             |
| <i>L. sulphureus</i>  | PD-99  | 2,6±0,3               | 2,8±0,4             |
|                       | PD-01  | 2,7±0,3               | 2,5±0,4             |
|                       | Ah-02  | 2,5±0,4               | 2,6±0,3             |
| <i>G. applanatum</i>  | G-1    | <b>1,8±0,3</b>        | <b>5,2±0,8</b>      |
|                       | G-2    | <b>1,7±0,5</b>        | <b>3,4±0,7</b>      |
|                       | G-3    | <b>1,5±0,3</b>        | <b>6,6±0,9</b>      |
| <i>G.lucidum</i>      | Gl-1   | <b>0,6±0,2</b>        | <b>2,8±0,6</b>      |
|                       | Gl-3   | <b>0,7±0,2</b>        | <b>2,6±0,5</b>      |
|                       | Gl-6   | <b>0,4±0,1</b>        | <b>3,0±0,6</b>      |
| <i>F.fomentarius</i>  | AH-96  | 5,2±0,5               | 5,0±1,3             |
|                       | Nic-02 | 5,7±0,6               | 5,3±0,5             |
|                       | Lp-05  | 5,3±0,5               | 4,9±0,7             |
| <i>P.cinnabarinus</i> | PyC-1  | 3,9±0,4               | 3,7±0,5             |
|                       | PyC-2  | 4,0±0,4               | 3,8±0,6             |
|                       | PyC-4  | 4,1±0,4               | 3,5±0,4             |
| <i>H. annosum</i>     | Han-1  | <b>2,6±0,3</b>        | <b>1,9±0,3</b>      |
|                       | Han-2  | 2,5±0,4               | 2,1±0,3             |
|                       | Han-3  | <b>2,8±0,4</b>        | <b>1,9±0,3</b>      |
| <i>F. hepatica</i>    | Fh-1   | <b>5,2±0,7</b>        | <b>3,6±0,6</b>      |
|                       | Fh-1a  | <b>4,8±1,1</b>        | <b>2,9±0,3</b>      |
|                       | Fh-5   | <b>4,3±0,7</b>        | <b>3,1±0,4</b>      |

\*жирным показаны достоверные отличия, P<0,05.

Исключение составили два изученных вида: *L. sulphureus* и *P.cinnabarinus*. У них, напротив, формировался более густой мицелий на нативных опилках и более тонкий – на метанолизных. Низкие скорости роста на метанолизном субстрате можно объяснить относительно более высоким содержанием фенольных соединений.

Установлено, что активнее осваивают метанолизный субстрат представители видов, чаще встречающихся в природе на древесине высокой степени разложения, причем вне зависимости от типа вызываемой гнили (рис.3).

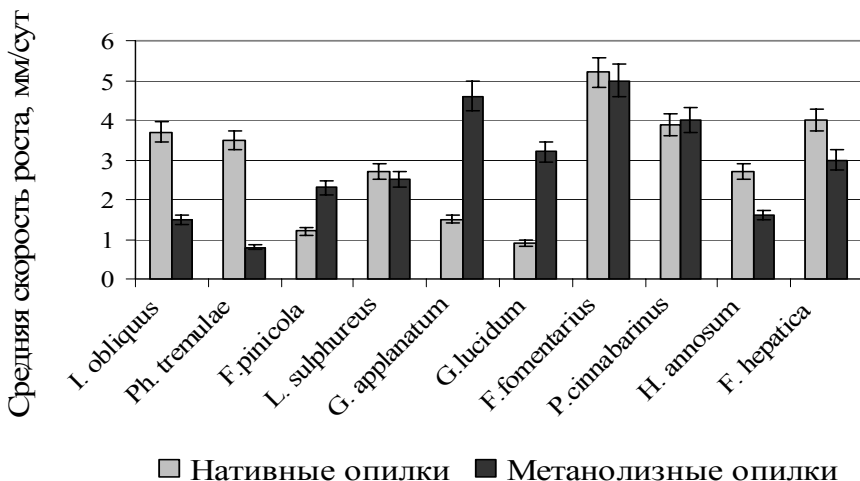


Рис. 3 – Средние скорости роста видов ксилотрофных базидиомицетов на различных субстратах (среднее по трем штаммам каждого вида)

Это достоверно отмечено для *F. pinicola*, *G. applanatum*, *G. lucidum*. Вероятно, эти виды эволюционно адаптированы к эффективному использованию обилия метоксильных групп в значительной степени разрушенной древесины. *L. sulphureus*, *F. fomentarius*, *F. hepatica*, *I. obliquus*, чаще встречающиеся на живых деревьях, *Ph. tremulae*, *H. annosum* – только на живых, древесина которых содержит относительно низкие концентрации метоксильных групп, лучше развиваются на нативных опилках.

#### 4.2 Активность некоторых ферментов ксилотрофных базидиомицетов при твердофазном культивировании

Интерес представляло сравнение ферментативной активности культур при их развитии на экстрагированных опилках и их метанолизных дериватах, для чего на 13-16 сутки роста проведено ее определение.

У *F. pinicola*, *G. applanatum*, *G. lucidum*, т.е. видов с широкой трофической специализацией, общая оксидазная активность выше на метанолизном субстрате, чем на нативном (табл. 2). Однако на метанолизных опилках снижается общая оксидазная активность у *Ph. tremulae*, *H. annosum* и *F. hepatica*. Это, вероятно, определяется воздействием фенольных компонентов субстрата и может быть связано с приуроченностью видов к живым деревьям, древесина которых на начальных этапах колонизации имеет, небольшое, по сравнению с фаутной, содержание мономерных фенольных структур.

Пероксидазная активность, как выяснилось, является индивидуальной особенностью видов, поскольку ее уровни на изученных субстратах у разных культур не поддаются систематизации. На метанолизном субстрате у изученных грибов белой гнили отмечают более высокие показатели, чем на нативных. Все возбудители бурой гнили, а также некоторые представители белой при культивировании как на нативных, так и на метанолизных опилках показали относительно низкую активность пероксидаз.

О целлюлазной активности судили по утилизации холоцеллюлозы в материале опилок и по концентрации глюкозы в вытяжке из субстрата. Практически

для всех культур, независимо от типа гнили и субстратной специфичности в природе, характерна более высокая целлюлазная активность на метанолизном материале. Согласно литературным данным, отдельные фенольные компоненты лигнина способны индуцировать выработку целлюлазных ферментов некоторых грибов (Muller, 1988). Наши результаты подтверждают это положение.

Таблица 2 – Общая оксидазная, проксидазная и целлюлазная активность мицелия изученных видов на нативных (Н) и метанолизных (М) опилках

| Вид, штамм                     | Ферментативная активность                |                  |                                                 |                  |                              |                  |
|--------------------------------|------------------------------------------|------------------|-------------------------------------------------|------------------|------------------------------|------------------|
|                                | Общая оксидазная,<br>ед.оп.пл.*100/г*сек |                  | Общая<br>пероксидазная,<br>ед.оп.пл. *100/г*сек |                  | Убыль<br>холоцеллюлозы,<br>% |                  |
|                                | Н                                        | М                | Н                                               | М                | Н                            | М                |
| <i>I. obliquus</i> , IO-3      | 0,65±0,13                                | 0,61±0,12        | <b>0,53±0,11</b>                                | <b>5,8±1,16</b>  | <b>8,3±1,66</b>              | <b>18,3±3,66</b> |
| <i>Ph. tremulae</i> , Ph-3     | <b>0,24±0,05*</b>                        | <b>0,11±0,02</b> | <b>2,64±0,53</b>                                | <b>1,12±0,22</b> | <b>1,7±0,34</b>              | <b>3,6±0,72</b>  |
| <i>F. pinicola</i> , Fpi-3     | <b>0,09±0,02</b>                         | <b>0,33±0,07</b> | <b>0,26±0,05</b>                                | <b>0,00</b>      | 14,1±2,82                    | 20,3±4,06        |
| <i>L. sulphureus</i> , Ah-02   | <b>0,11±0,02</b>                         | <b>0,00</b>      | <b>0,13±0,03</b>                                | <b>0,00</b>      | 13,7±2,74                    | 17,6±3,52        |
| <i>G. applanatum</i> , G-3     | <b>0,09±0,02</b>                         | <b>0,19±0,04</b> | <b>1,75±0,35</b>                                | <b>4±0,80</b>    | <b>7,8±1,56</b>              | <b>18,2±3,64</b> |
| <i>G. lucidum</i> , Gl-6       | <b>0,38±0,08</b>                         | <b>0,58±0,12</b> | <b>2,06±0,41</b>                                | <b>5,9±1,18</b>  | <b>8,1±1,62</b>              | <b>19,6±3,92</b> |
| <i>F. fomentarius</i> , Lp-05  | <b>0,15±0,03</b>                         | <b>0,27±0,05</b> | <b>1,8±0,36</b>                                 | <b>2,9±0,58</b>  | <b>5,9±1,18</b>              | <b>9,6±1,92</b>  |
| <i>P. cinnabarinus</i> , PyC-4 | 0,62±0,12                                | 0,51±0,10        | <b>0,53±0,11</b>                                | <b>0,00</b>      | <b>6,9±1,38</b>              | <b>14,6±2,92</b> |
| <i>H. annosum</i> , Han-3      | <b>0,31±0,06</b>                         | <b>0,13±0,03</b> | <b>0,45±0,09</b>                                | <b>0,00</b>      | <b>10,3±2,06</b>             | <b>17,5±3,5</b>  |
| <i>F. hepatica</i> , Fh-5      | <b>0,32±0,06</b>                         | <b>0,19±0,04</b> | <b>0,47±0,09</b>                                | <b>0,00</b>      | 15,9±3,18                    | 16,5±3,3         |

\*жирным отмечены достоверные отличия (p<0,05)

#### 4.3 Влияние внесения источников целлюлозы и лигнина в агаризованные среды на рост и развитие культур ксилотрофных базидиомицетов

Интерес представляло изучение влияния добавления лигноцеллюлозных материалов в состав традиционных сред. При этом создается «эффект разбавления», элиминирующий токсическое действие избытка метоксильных групп и олигомерных соединений лигнина, устраняются такие лимитирующие развитие факторы как дефицит легкодоступных сахаров и влаги. Для оценки влияния изученных факторов на развитие того или иного вида был произведен расчет коэффициентов отзывчивости, то есть отношений средних по штаммам показателей скоростей роста на экспериментальных средах к средним скоростям роста в контроле. Обнаружено, что лигноцеллюлозные источники, добавленные в низких концентрациях (2% от массы) к агаризованным средам, стимулируют развитие большинства изученных видов (рис. 4).

На видовом уровне прослеживается разная степень стимуляции развития мицелия путем добавления к питательному субстрату источников целлюлозы и лигнина. Причем заметно, что в целях интенсификации роста культур целесообразно использование именно метанолизных опилок. Несомненен факт включения составляющих компонентов добавок в метаболизм культур, а «рыхлое» состояние молекул в метанолизном источнике целлюлозы и лигнина делает его более доступным для ферментативных систем гриба. Отдельного внимания заслуживает факт оптимизации роста видов-паразитов, обычно слабо развивающихся в культуре, посредством обогащения питательной среды лигноцеллюлозными компонентами в низких концентрациях.

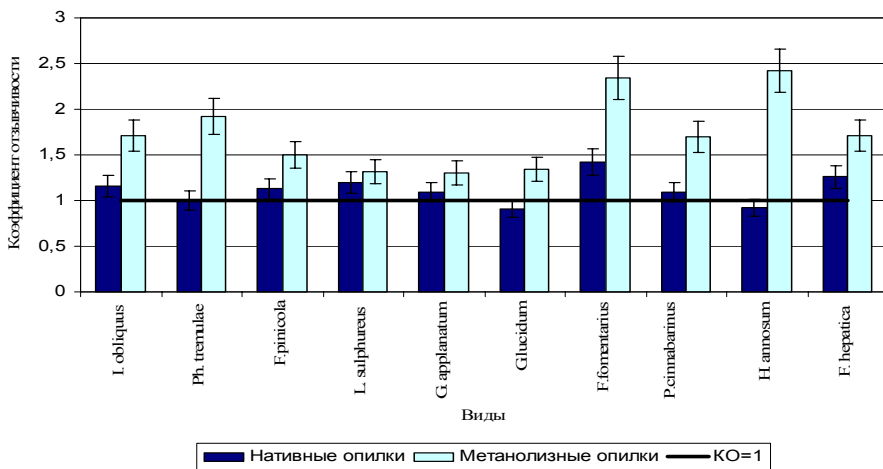


Рис. 4 – Сравнение значений коэффициентов отзывчивости на внесение в агаризованную питательную среду опилок, подготовленных различным образом (культивирование в течение 7 суток, КГА, три повторности, 26°C)

#### 4.3.1 Влияние внесения источников целлюлозы и лигнина в агаризованные среды на дегидрогеназную активность культур

Одним из показателей интенсивности энергетических процессов у культур может служить уровень активности ферментов дегидрогеназ. Для получения иллюстрации дегидрогеназной активности мицелия использовали гистохимическую методику качественной оценки с использованием нитросинего тетразолия. Индикатор акцептирует отщепленные дегидрогеназами электроны, и, восстанавливаясь, превращается в ярко окрашенный формазан. Интенсивность окраски оценивали с использованием пятибалльной шкалы, описанной в методике.

На примере *F. fomentarius* показано, что дегидрогеназная активность мицелия выше в присутствии лигноцеллюлозных компонентов (рис.5).



Рис. 5 – Иллюстрация дегидрогеназной активности мицелия *F. fomentarius*, штамм Nic-02 при помощи индикаторных свойств нитросинего тетразолия: вариант 1 – добавление нативных опилок, вариант 2 – добавление метанолизных опилок, вариант 3 – контроль

В варианте с добавлением в агаризованную среду метанолизных опилок отмечено наиболее интенсивное окрашивание, оцененное на 4 балла. В варианте с нативными опилками интенсивность окрашивания оценена на 3 балла, в контроле на 1 балл. Такие результаты косвенно подтверждают факт интенсификации обменных процессов мицелия на обогащенных опилками агаризованных субстратах.

#### **4.3.2 Использование парааминобензойной кислоты в качестве фактора, оптимизирующего развитие мицелия ксилотрофных базидиомицетов на субстратах, содержащих лигноцеллюлозные компоненты**

Нами изучено воздействие парааминобензойной кислоты на рост и развитие культур, в результате чего была установлена концентрация, позитивно влияющая на рост большинства культур – 0,005 г/л. Установлено, что ПАБК оказывает позитивное влияние на темпы и характер развития мицелия большинства штаммов изученных видов, что особенно заметно на лигноцеллюлозных субстратах (табл. 3).

Таблица 3 – Средние скорости роста мицелия ксилотрофных базидиомицетов на КГА и КГА, обогащенном метанолизными опилками (МО, 2% от массы) и ПАБК (0,005 г/л) (мм/сут, 26°C, повторность трехкратная)

| Вид, штамм                     | Особенности субстрата |                 |                  |                  |
|--------------------------------|-----------------------|-----------------|------------------|------------------|
|                                | КГА<br>(контроль)     | КГА+МО          | КГА+ПАБК         | КГА+ПАБК+МО      |
| <i>I. obliquus</i> , IO-1      | 3,1±0,2               | <b>3,9±0,4</b>  | <b>4,2±0,4</b>   | <b>5,0±0,4</b>   |
| <i>Ph. tremulae</i> , Pht-1    | 0,2±0,01              | 0,25±0,03       | <b>0,31±0,03</b> | <b>0,49±0,06</b> |
| <i>F. pinicola</i> , Fpi-2     | 8,5±0,9               | <b>12,2±0,8</b> | 9,2±1,7          | <b>11,0±1,0</b>  |
| <i>L. sulphureus</i> , PD-01   | 8,2±1,2               | <b>11,5±1,4</b> | 8,6±2,4          | <b>10,4±1,1</b>  |
| <i>G. applanatum</i> , G-3     | 9,8±0,7               | <b>12,7±0,5</b> | <b>11,2±2,3</b>  | <b>12,7±1,5</b>  |
| <i>G. lucidum</i> , Gl-6       | 6,4±1,5               | <b>9,9±1,3</b>  | 7,7±0,7          | <b>11,5±1,4</b>  |
| <i>F. fomentarius</i> , AH-96  | 5,1±1,3               | <b>12,3±0,3</b> | <b>8,0±1,1</b>   | <b>14,2±1,3</b>  |
| <i>P. cinnabarinus</i> , PyC-1 | 5,1±0,9               | <b>11,2±0,9</b> | <b>7,4±0,4</b>   | <b>12,6±0,9</b>  |
| <i>H. annosum</i> , Han-3      | 0,2±0,04              | <b>0,5±0,01</b> | <b>0,4±0,01</b>  | <b>0,6±0,01</b>  |
| <i>F. hepatica</i> , Fh-5      | 4,2±0,8               | <b>8,3±1,0</b>  | 4,8±0,6          | <b>9,8±0,6</b>   |

\*жирным показаны достоверные отличия от контроля,  $P < 0,05$ .

Полученные данные свидетельствуют о целесообразности включения ПАБК в рецептуру сред для культивирования ксилотрофных базидиомицетов, особенно в состав субстратов, содержащих лигноцеллюлозные компоненты.

## **5 ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОДЕЛЬНОГО ЛИГНИНА И ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ МАТЕРИАЛОВ ПРИ ГЛУБИННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ**

### **5.1 Влияние продуктов перколяции лигнина Классона на накопление биомассы мицелия ксилотрофных базидиомицетов в условиях глубинной культуры**

На следующем этапе экспериментов нами было изучено влияние лигноцеллюлозных компонентов на процесс накопления биомассы мицелия в глубинных условиях. Опилки, как нерастворимый материал, при добавлении в жидкую питательную среду будут помехой для отделения биомассы мицелия, поэтому внесе-

ние их в обычном состоянии нецелесообразно. Решением проблемы может быть предварительная перколяция лигноцеллюлозных субстратов для получения экстрактов. Однако, используя субстрат, подготовленный таким образом, невозможно судить о влиянии на развитие мицелия целлюлозы, а также гемицеллюлоз, которые в процессе перколяции разрушаются до олигомерных и мономерных компонентов (в основном, целлобиозы, глюкозы, ксилозы и т.д.). Таким образом, можно судить только о влиянии со стороны метоксильных групп лигнанов, перешедших в раствор. Влияние же олигомерных и мономерных компонентов углеводов учесть сложно, но и исключить нельзя, поскольку их спектр (как качественный, так и количественный) чрезвычайно широк. В этой связи логично полное удаление углеводной составляющей из лигноцеллюлозного субстрата, то есть получение модельного лигнина (лигнина Классона).

Два варианта лигнинов были получены удалением углеводов из исследованных лигноцеллюлозных материалов. Затем лигнины подвергнуты перколяции. Проведенный методом газовой хроматографии анализ содержания метоксильных групп в составе перколятов показал, что их значение, полученное для метанолизного лигнина (7,4 мМ/г) почти втрое выше, чем для нативного (2,5 мМ/г). Перколяты в количестве 2% от массы среды вносили в среду Чапека, до стерилизации.

Как в опытных, так и в контрольных вариантах на видовом уровне сохраняются особенности морфологии глубинного мицелия. Некоторые виды характеризовались филаментным, а другие – пеллетным ростом. Различия не связаны ни с трофическими стратегиями видов, ни с типами вызываемых грибами гнилей. Возможно, это своеобразная иллюстрация отношения культуры к концентрации кислорода в среде. Однако для установления каких-либо зависимостей потребуются дополнительные исследования. Установлено стимулирующее влияние обоих вариантов перколятов лигнина на процесс накопления биомассы мицелия у большинства штаммов изученных видов: *F. pinicola*, *G. applanatum*, *G. lucidum*, *F. fomentarius*, *F. hepatica*, *P. cinnabarinus* (табл. 4).

Таблица 4 – Накопление биомассы мицелия культурами ксилотрофных базидиомицетов на различных средах (26°C, 7 сут. развития, повторность трехкратная, сухой мицелий, г), в пересчете на 1л питательной среды

| Вид                  | Штамм | Варианты опыта                       |                                          |                                          |
|----------------------|-------|--------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
|                      |       | Экстракт лигнина из нативных опилок* | Экстракт лигнина из метанолизных опилок* | Среда Чапека модифицированная (контроль) |
| <i>I. obliquus</i>   | Ю-1   | 2,57±0,10                            | <b>2,72±0,02**</b>                       | 2,18±0,04                                |
|                      | Ю-2   | 3,11±0,13                            | 3,02±0,10                                | 2,98±0,18                                |
|                      | Ю-3   | 2,38±0,14                            | 2,46±0,02                                | 2,20±0,07                                |
| <i>Ph. tremulae</i>  | Pht-1 | 2,05±0,15                            | <b>1,34±0,07</b>                         | 1,91±0,13                                |
|                      | Pht-2 | 1,80±0,04                            | <b>1,19±0,01</b>                         | 1,75±0,01                                |
|                      | Pht-3 | 1,02±0,07                            | 1,10±0,11                                | 1,48±0,11                                |
| <i>F. pinicola</i>   | Fpi-1 | <b>7,53±0,51</b>                     | <b>8,5±0,15</b>                          | 5,69±0,08                                |
|                      | Fpi-2 | 5,24±0,09                            | <b>6,2±0,20</b>                          | 4,82±0,22                                |
|                      | Fpi-3 | <b>5,36±0,35</b>                     | 3,90±0,12                                | 3,47±0,11                                |
| <i>L. sulphureus</i> | PD-99 | 6,11±0,28                            | <b>6,83±0,23</b>                         | 5,78±0,08                                |
|                      | PD-01 | 4,12±0,05                            | <b>5,69±0,11</b>                         | 4,34±0,35                                |

| Вид                    | Штамм  | Варианты опыта                       |                                          |                                          |
|------------------------|--------|--------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
|                        |        | Экстракт лигнина из нативных опилок* | Экстракт лигнина из метанолизных опилок* | Среда Чапека модифицированная (контроль) |
|                        | Ah-02  | 4,91±0,17                            | <b>6,72±0,30</b>                         | 4,57±0,09                                |
| <i>G. applanatum</i>   | G-1    | <b>3,60±0,39</b>                     | <b>5,28±0,13</b>                         | 3,10±0,15                                |
|                        | G-2    | <b>4,32±0,22</b>                     | <b>4,75±0,24</b>                         | 3,18±0,10                                |
|                        | G-3    | <b>4,26±0,10</b>                     | <b>5,13±0,12</b>                         | 3,77±0,22                                |
| <i>G. lucidum</i>      | Gl-1   | <b>3,21±0,13</b>                     | <b>3,75±0,21</b>                         | 2,59±0,19                                |
|                        | Gl-3   | <b>4,29±0,10</b>                     | <b>5,30±0,14</b>                         | 3,64±0,27                                |
|                        | Gl-6   | <b>3,10±0,12</b>                     | <b>6,22±0,25</b>                         | 3,04±0,24                                |
| <i>F. fomentarius</i>  | AH-96  | <b>4,51±0,32</b>                     | <b>4,67±0,28</b>                         | 2,28±0,02                                |
|                        | Nic-02 | <b>5,83±0,16</b>                     | <b>4,10±0,11</b>                         | 3,08±0,08                                |
|                        | Lp-05  | <b>5,76±0,40</b>                     | <b>5,61±0,32</b>                         | 3,33±0,06                                |
| <i>P. cinnabarinus</i> | PyC-1  | <b>5,06±0,24</b>                     | <b>3,62±0,17</b>                         | 3,29±0,09                                |
|                        | PyC-2  | <b>4,43±0,19</b>                     | <b>4,60±0,01</b>                         | 3,77±0,09                                |
|                        | PyC-4  | <b>4,60±0,09</b>                     | <b>4,96±0,04</b>                         | 3,65±0,05                                |
| <i>H. annosum</i>      | Han-1  | 2,63±0,19                            | 2,01±0,19                                | 2,09±0,07                                |
|                        | Han-2  | 2,77±0,10                            | <b>1,65±0,02</b>                         | 2,89±0,11                                |
|                        | Han-3  | 3,06±0,01                            | 2,66±0,09                                | 2,63±0,02                                |
| <i>F. hepatica</i>     | Fh-1   | <b>4,18±0,12</b>                     | <b>4,61±0,20</b>                         | 2,89±0,01                                |
|                        | Fh-1a  | <b>4,06±0,26</b>                     | <b>5,01±0,42</b>                         | 2,58±0,13                                |
|                        | Fh-5   | <b>3,58±0,13</b>                     | <b>4,64±0,18</b>                         | 2,09±0,04                                |

\* Экстракты адаптированы к среде Чапека экзогенными сахарами

\*\* Достоверные ( $P < 0,05$ ) отличия показаны жирным шрифтом

Однако для штаммов таких видов как *I. obliquus*, *Ph. tremulae* и *H. annosum* не установлено фактов стимуляции развития. Мы связываем это с особенностями трофики выраженных биотрофов, для которых порог ингибирования роста фенольными соединениями, содержащимися в древесине, ниже, чем у сапротрофных видов. Тот факт, что торможение роста обнаружено у паразитных видов (*Ph. tremulae* и *H. annosum*) в вариантах с экстрактами лигнина из метанолизных опилок, косвенно свидетельствует в пользу этого предположения.

Таким образом, можно рекомендовать подобные приемы для выращивания биомассы мицелия этих видов в глубинных условиях. Стимуляция развития мицелия, более заметная в вариантах с перколятами лигнина метанолизных опилок может объясняться структурой лигнинового компонента последних. Она более рыхлая и доля метоксильных групп, доступных для утилизации мицелием, выше, чем у нативных опилок, где лигнин находится в конденсированном состоянии.

## 5.2 Влияние экстракта перколированного лигнина на процесс синтеза эргостерина штаммами изученных видов ксилотрофных базидиомицетов

Важным показателем метаболизма культуры может служить синтез эргостерина, участвующего в формировании структуры мембран. Эргостерин также представляет собой исходное вещество для синтеза многих продуктов стероидной природы, многие из которых рассматриваются как вторичные метаболиты. Содержание эргостерина выше в образцах мицелия, выращенного на средах с

добавлением перколятов лигнина, причем это достоверно отмечено для видов – представителей белой гнили, и, как исключение – для представителя бурой гнили *L. sulphureus* (табл. 5).

Таблица 5 – Показатели содержания эргостерина в образцах мицелия штаммов исследованных видов ксилотрофных базидиомицетов (26°C, 7 сут. развития, повторность трехкратная)

| Вид, штамм                     | Среда Чапека модифицированная (контроль) |                | Среда с перколятом из метанолизного лигнина (опыт) |                    |
|--------------------------------|------------------------------------------|----------------|----------------------------------------------------|--------------------|
|                                | Масса навески, (мг)                      | Эргостерин, %* | Масса навески, (мг)                                | Эргостерин, %      |
| <i>I. obliquus</i> , IO-2      | 2983,7±182,1                             | 0,74±0,04      | 3023,0±104,3                                       | <b>1,31±0,02**</b> |
| <i>Ph. tremulae</i> , Pht-1    | 1911,2±131,0                             | 0,41±0,01      | <b>1339,7±71,3</b>                                 | <b>0,69±0,02</b>   |
| <i>F. pinicola</i> , Fpi-1     | 5694,0±82,4                              | 0,38±0,03      | <b>8506,1±153,8</b>                                | 0,39±0,01          |
| <i>L. sulphureus</i> , PD-99   | 5782,1±80,7                              | 0,37±0,01      | <b>6832,3±232,1</b>                                | <b>0,49±0,01</b>   |
| <i>G. applanatum</i> , G-2     | 3179,3±102,2                             | 0,70±0,09      | <b>4751,1±244,4</b>                                | <b>1,03±0,09</b>   |
| <i>G. lucidum</i> , Gl-3       | 3638,2±274,2                             | 0,87±0,01      | <b>5303,2±139,1</b>                                | <b>1,49±0,02</b>   |
| <i>F. fomentarius</i> , Nic-02 | 3081,7±83,7                              | 1,06±0,04      | 4107,2±112,6                                       | <b>1,42±0,05</b>   |
| <i>P. cinnabarinus</i> , PyC-1 | 3292,2±90,3                              | 1,08±0,03      | <b>3619,5±172,9</b>                                | <b>1,50±0,03</b>   |
| <i>H. annosum</i> , Han-2      | 2894,3±10,2                              | 0,61±0,01      | <b>1652,3±23,9</b>                                 | 0,76±0,04          |
| <i>F. hepatica</i> , Fh-5      | 2093,3±389,6                             | 1,60±0,04      | <b>4643,4±184,8</b>                                | 1,56±0,06          |

\*% эргостерина от воздушно-сухой массы мицелия

Отсутствие зависимости между накоплением биомассы и содержанием эргостерина означает, что помимо затрат на пластический обмен, культуры накапливают материал для синтеза веществ и образования структур на последующих стадиях развития. Возможно, это резерв для репродуктивных процессов.

### 5.3 Утилизация мицелием ксилотрофных базидиомицетов различных компонентов питательной среды в условиях глубинного культивирования

Настоящий эксперимент был организован с целью изучения темпов утилизации мицелием разных видов компонентов среды в глубинных условиях. Для этого в среду Чапека добавляли непосредственно метанолизные опилки. Анализ накопления биомассы в этом случае не предполагался. Темпы утилизации глюкозы из питательной среды различались у разных видов. Максимальными они были у культур-представителей видов с выраженной паразитической стратегией питания в природе, у сапротрофных видов снижение концентрации глюкозы происходило медленнее (рис.6). Однако, начиная с 6-7 суток культивирования, у представителей грибов бурой гнили была отмечена своеобразная «пульсация» концентраций глюкозы в культуральной жидкости, что мы объясняем процессом гидролиза углеводов из материала опилок. В связи с этим, нам представилось вероятным обнаружение в культуральной жидкости целлобиозы, как промежуточного продукта гидролиза.



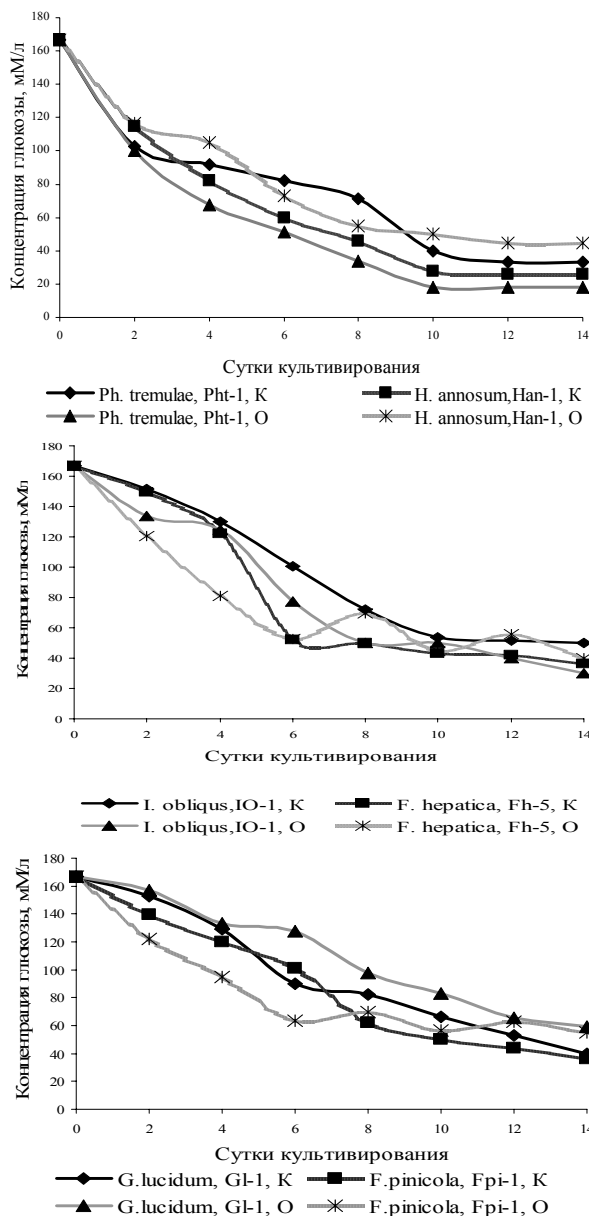


Рис. 6 – Динамика утилизации глюкозы из питательной среды культурами разных видов при глубинном культивировании (К – контроль, среда без добавления метоксильных опилок, О – опыт, среда с добавлением метанолизных опилок)

Действительно, значительные концентрации целлобиозы обнаружены в культуральной жидкости грибов белой гнили *I. obliquus* и *G. lucidum* на средах, содержащих источники целлюлозы и лигнина по истечении 7 суток культивиро-

вания. Максимумы концентраций целлюлозы в культуральной жидкости составили соответственно 3,6 мМ/л – на десятые и 3,9 мМ/л – на двенадцатые сутки культивирования. В культуральной жидкости некоторых прочих видов в опытных вариантах были обнаружены следовые количества целлюлозы, а в контрольных вариантах этот углевод отсутствовал полностью. Появление в культуральной жидкости грибов белой гнили целлюлозы может объясняться только процессом гидролиза целлюлозы опилок. Этот факт, особенно с учетом относительно слабой утилизации грибами этой группы глюкозы питательной среды, может свидетельствовать об особой трофической стратегии их в культуре в присутствии лигноцеллюлозных компонентов.

Затем отделенные от среды опилки были высушены до постоянной массы и проанализированы на остаточное содержание холоцеллюлозы и метоксильных групп. Содержание холоцеллюлозы изменилось незначительно у обоих видов с паразитической стратегией питания в природе. Выявлены достоверные отличия в плане более интенсивной утилизации холоцеллюлозы грибами бурой гнили, что вполне согласуется с особенностями этой группы (табл. 6).

Таблица 6 – Содержание целлюлозы и метоксильных групп в материале метанолизных опилок, извлеченных из среды после глубинного культивирования мицелия разных видов ксилотрофных базидиомицетов

| Вид, штамм                  | Трофическая стратегия видов в районе исследований | Тип гнили | Содержание целлюлозы, % от исходного содержания | Содержание метоксильных групп, % от исходного содержания |
|-----------------------------|---------------------------------------------------|-----------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| <i>Ph. tremulae</i> , Pht-1 | Облигатные паразиты                               | белая     | 97,5                                            | 81,8                                                     |
| <i>H. annosum</i> , Han-1   |                                                   | смешанная | 86,5                                            | 80,6                                                     |
| <i>I. obliquus</i> , IO-1   | Факультативные паразиты                           | белая     | 69,8                                            | 66,7                                                     |
| <i>F. hepatica</i> , Fh-5   |                                                   | бурая     | 55,5                                            | 71,9                                                     |
| <i>G. lucidum</i> , Gl-1    | Факультативные сапротрофы                         | белая     | 62,1                                            | 57,8                                                     |
| <i>F. pinicola</i> , Fpi-1  |                                                   | бурая     | 48,9                                            | 55,3                                                     |

Концентрация метоксильных групп почти не изменилась у видов – паразитов. У прочих видов содержание метоксильных групп уменьшилось почти по сравнению с исходным, причем у типичных сапротрофных видов – почти вдвое. Вопреки ожиданиям, утилизация метоксильных групп, как выяснилось, происходит с примерно одинаковой интенсивностью у грибов белой и бурой гнили. Такая парадоксальная ситуация может объясняться тем, что грибы белой гнили утилизируют метоксилы для деградации лигнина, а бурой – для его вторичной модификации.

## 6 ВЛИЯНИЕ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ КОМПОНЕНТОВ СУБСТРАТА НА ПРОЦЕССЫ ПЛОДООБРАЗОВАНИЯ У КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ В УСЛОВИЯХ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ

### 6.1 Влияние внесения метанолизных опилок в агаризованные среды на образование зачатков плодовых тел у некоторых видов ксилотрофных базидиомицетов

Отдельным блоком исследований было изучение влияния лигноцеллюлозных компонентов субстратов на процессы формирования зачатков плодовых тел в

стерильных условиях. Была проведена 5-суточная холодовая стимуляция плодo-образования, после чего культуры выдерживали при комнатной температуре. У ряда культур, причем только у грибов – представителей белой гнили через 12-15 суток было отмечено формирование примордиев. Появившиеся узелки на мицелии *Ph. tremulae* в вариантах с добавлением как нативных, так и метанолизных опилок, дальнейшее развитие прекратили. На 20-25 сутки у прочих представителей белой гнили (*I. obliquus*, *F.fomentarius*, *G. applanatum*, *G. lucidum*, *P. cinnabarinus*) сформировались типичные Примордии (рис.7). В вариантах с метанолизными опилками, и, реже, в вариантах с нативными у примордиев появилась тенденция к дифференциации.

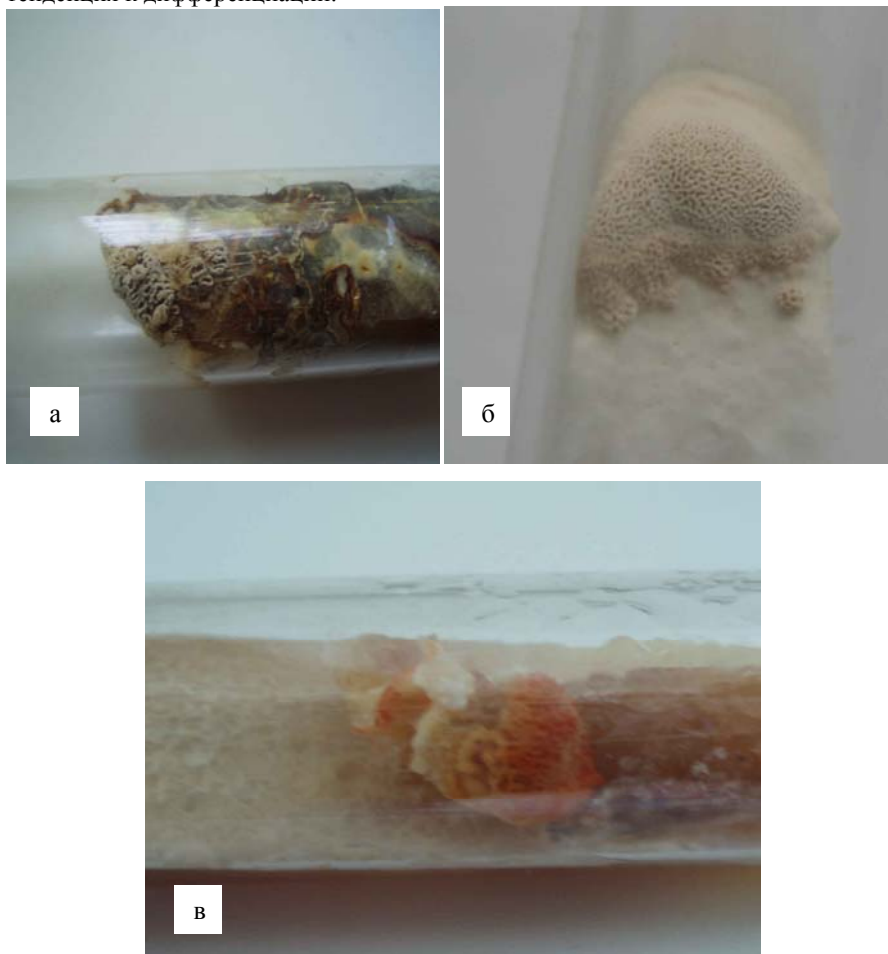


Рис. 7 – Образование примордиев у некоторых видов: а) *I. obliquus*, штамм IO-1; б) *F. fomentarius*, штамм Nic-02; в) *P. cinnabarinus* штамм PyC-1

Образование примордиев *G.lucidum* наблюдали и в контрольных вариантах, но в опыте заметна выраженная дифференциация (рис. 8).



Рис. 8 – Дифференцированный примордий на мицелии *G.lucidum* (штамм Gl-1), сформированный на среде с добавлением метанолизных опилок, 20 сутки

Формирование дифференцированных примордиев в варианте с метанолизными опилками, обогащенными метоксильными группами, свидетельствует о том, что эти компоненты лигнина (концентрация которых заметно выше в древесине, уже подвергшейся процессам деструкции в природе) (Фенгел, 1988), могут служить факторами плодоношения не только в искусственных, но и в естественных условиях.

## **6.2 Возможности включения метанолизных источников целлюлозы и лигнина в состав твердофазных органических субстратов для получения плодовых тел *Ganoderma lucidum***

На основании полученных данных по стимуляции плодообразования культур ксилотрофных базидиомицетов на стерильных субстратах внесением в среду метанолизных опилок было организовано исследование их влияния на процесс плодоношения *G.lucidum* при культивировании по интенсивной технологии.

В качестве контрольного субстрата использована ржаная солома, в опытах к ней добавлены нативные и метанолизные опилки в количестве 10 % от массы субстрата. В контроле на 20-25 сутки развития мицелия отмечены кожистые уплотнения, которые со временем приобретали бурую окраску. Мицелиальная корка высыхала и отторгалась от субстрата. В опытных вариантах на 38-45 сутки были отмечены тенденции к формированию плодовых тел. В вариантах с использованием метанолизных опилок процессы морфогенеза протекали более интенсивно, на 55-е сутки сформированная на таком субстрате типичная базидиома приступила к спороношению (рис.9). Это подтверждает наше предположение о том, что метоксильные группы могут служить фактором, стимулирующим переход культуры к вторичному метаболизму, поскольку одной из иллюстраций этой фазы развития служит плодоношение.



Рис. 9 – Базидиома *G. lucidum* на твердом органическом субстрате, содержащем метанолизные дубовые опилки в момент начала спороношения

Безусловно, на процесс плодотворения в искусственной культуре влияет целый ряд внешних факторов, прежде всего микроклимат, однако определение оптимального субстрата представляется нам существенным моментом. На основании полученных данных была разработана рецептура субстрата, который используется нами для получения плодовых тел *G. lucidum*.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключении подводятся и обсуждаются итоги проделанной работы, дается обоснование целесообразности использования экстрагированных метанолизных источников целлюлозы и лигнина в практике культивирования видов ксилотрофных базидиомицетов.

### ВЫВОДЫ

1. Субстратная приуроченность ксилотрофных базидиомицетов к древесине разной степени разложения определяет особенности их развития в чистой культуре.

2. Изученные виды ксилотрофных базидиомицетов, несмотря на различную субстратную специализацию в природе (по отношению к древесным породам и степени разложения древесины) с разной интенсивностью развиваются на экстрагированном системой полярных и неполярных растворителей нативном и метанолизном (обогащенном метоксильными группами) материале дубовых опилок в условиях чистой культуры.

3. Структура лигноцеллюлозного субстрата влияет на ферментативную активность мицелия изученных видов. Метанолизный субстрат ингибирует оксидазную активность большинства видов с паразитной специализацией в природе и стимулирует таковую у большинства сапротрофных видов; он стимулирует пероксидазную активность у некоторых видов – представителей белой гнили; виды – представители бурой гнили на нативном субстрате в культуре интенсивнее разрушают целлюлозу, чем представители белой; на метанолизном субстрате эта

закономерность сохраняется. Метанолизный лигноцеллюлозный субстрат обеспечивает увеличение целлюлазной активности большинства изученных видов.

4. Метанолизный лигноцеллюлозный субстрат в количестве 2% от массы агаризованной питательной среды является фактором, стимулирующим развитие большинства изученных видов ксилотрофных базидиомицетов. Интенсификация обменных процессов косвенно подтверждается повышением активности дегидрогеназ у мицелия, развивающегося на агаре, обогащенном метанолизным лигноцеллюлозным материалом.

5. Установлена стимуляция накопления биомассы глубинного мицелия большинства изученных видов при внесении в среду перколятов метанолизного лигнина.

6. У видов – представителей белой гнили, и, как исключение у представителя бурой гнили *L. sulphureus* обогащение глубинной среды метоксильными группами стимулирует процесс синтеза эргостерина.

7. Установлено позитивное влияние метанолизных лигноцеллюлозных источников на формирование зачатков плодовых тел у видов – представителей белой гнили в условиях чистой культуры. Обнаружена стимуляция морфогенетических процессов при развитии базидиом *G. lucidum* на твердых органических субстратах с добавлением метанолизных компонентов. Можно рекомендовать включение метанолизных лигноцеллюлозных материалов в субстрат для получения плодовых тел *G. lucidum*.

#### СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Лыков, Ю.С. Особенности роста штаммов ксилотрофных базидиомицетов на плотных питательных средах различного состава / Г.В. Ильина, Ю.С. Лыков // Тезисы докладов II съезда микологов России «Современная микология в России». – Национальная Академия Микологии, Москва, 2008. – С. 509-510.
2. Лыков, Ю.С. Специфика питательных сред для культивирования ксилотрофных базидиомицетов в лабораторных условиях / Ю.С. Лыков // Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной памяти профессора А.Ф. Блинохвотова «Образование, наука, практика: инновационный аспект». – Пенза, 2008. – С. 64.
3. Лыков, Ю.С. Роль специфики лигнинсодержащих субстратов при культивировании ксилотрофных грибов *in vitro* / Г.В. Ильина, Д.Ю. Ильин, Ю.С. Лыков // Микология и Фитопатология, Том 43, Вып. 2, Санкт-Петербург, «Наука», 2009. – С. 135-141.
4. Лыков, Ю.С. Влияние некоторых микроэлементов на развитие мицелия ксилотрофных базидиомицетов в искусственной культуре / Ю.С. Лыков // Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Вклад молодых ученых в инновационное развитие АПК России». – Пенза, 2009. – С. 188-189.
5. Лыков, Ю.С. Изучение антимикробной активности местных штаммов *Laetiporus sulphureus* (FR.) BOND. ET SING / Г.В. Ильина, Ю.С. Лыков, А.А. Костычев // Международный научно-практический рецензируемый журнал «Иммунопатология, аллергология, инфектология». Труды междисциплинарного микологического форума, № 2. Москва, изд-во «Национальная академия микологии», 2009. – С. 178-179.

6. Лыков, Ю.С. Биологические особенности видов ксилотрофных базидиомицетов лесостепи правобережного Поволжья *in situ* и *ex situ* / Г.В. Ильина, Ю.С. Лыков // Поволжский экологический журнал, № 3, 2010, С. 263-273.
7. Лыков, Ю.С. Особенности развития мицелиальных культур паразитных видов базидиальных макромицетов *EX SITU* / Ю.С. Лыков, Г.В. Ильина // Международный научно-практический рецензируемый журнал «Иммунопатология, аллергология, инфектология» / Труды второго междисциплинарного микологического форума, № 1. Москва, изд-во «Национальная академия микологии», 2010. – С. 115.
8. Лыков, Ю.С. Возможности стимуляции синтеза эргостерина мицелием ксилотрофных базидиомицетов в условиях глубинной культуры / Ю.С. Лыков, Г.В. Ильина // Известия Пензенского государственного педагогического университета имени В.Г. Белинского. Естественные науки. № 21 (25), Пенза, 2011 (в печати).

### БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую признательность научному руководителю, Г.В. Ильиной, за внимательное и чуткое отношение, сотрудникам РЦГЭКиМ по Пензенской области за помощь в организации исследований. Отдельные слова благодарности автор выражает профессору кафедры микологии и альгологии МГУ им. Ломоносова, д.б.н. Л.В. Гарибовой и ведущему научному сотруднику названной кафедры, д.б.н. А.Н. Лихачеву за неоценимую всестороннюю поддержку.