

*Биология*

УДК 582:001.4:582

С.М. БАДАЛЯН, ДЖ.Г. МЕЛИК-ХАЧАТРЯН

**ИССЛЕДОВАНИЕ КУЛЬТУР СЪЕДОБНЫХ ШЛЯПОЧНЫХ ГРИБОВ  
НА НЕСТАНДАРТНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ (ВОДОРΟΣЛЕВЫЙ  
АГАР И ВОДОРΟΣЛЕВО-ГРАВИЙНЫЙ СУБСТРАТ)**

В статье обсуждается вопрос о применении автолизата зеленых водорослей (*Chlorella* sp., *Chlamidomonas* sp.) в качестве дополнительного источника органического питания для грибов.

В результате отмеченная стимулирующая способность зеленых водорослей на рост съедобных грибов в культуре позволяет рассматривать их автолизат в качестве дополнительного источника органических веществ при искусственном выращивании грибов.

Шляпочные грибы (пор. Agaricales s.l.) являются перспективными объектами биотехнологии и биофармакологии как источник ценного кормового, пищевого белка и многих биологически активных веществ (антибиотики, ферменты, витамины и др.). Поиск новых питательных субстратов для их промышленного культивирования является актуальной задачей современной экспериментальной микологии.

На кафедре экологии и охраны природы Ереванского университета исследуется гидропоническая модель выращивания грибов, которая имеет ряд преимуществ по отношению к широко распространенному методу глубинного культивирования стерильного мицелия [1-3]. Применяя в качестве органики раствор или автолизат различных видов зеленых водорослей, можно выращивать съедобные грибы на водорослево - гравийном субстрате до стадии образования нормальных плодовых тел [4,5].

Перед нами были поставлены следующие задачи: - выяснение питательной ценности раствора автолизата различных видов зеленых водорослей (*Chlorella*, *Chlamidomonas* и др.); - выявление оптимальной концентрации водорослей для нормального роста и плодообразования съедобных грибов в культуре; - исследование морфологических особенностей культур съедобных грибов, выращенных на водорослевом агаре и на водорослево - гравийном субстрате.

**Материал и методы.** Материалом для опытов послужили штаммы съедобных грибов из различных эколого-трофических групп, выделенных нами в

культуру (*Pleurotus eryngii*: VII-ш, V-ш; *Agaricus bisporus*, 19-Армения) или полученных из различных коллекций чистых культур Москвы (*Pleurotus ostreatus* -004) и Праги (*P.eryngii*, MS-27).

Для водорослей были взяты виды *Chlorella* sp. и *Chlamidomonas* sp., выращенные в питательной среде Тамия (г/л:  $KNO_3$ —5,0;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ —2,50;  $KH_2PO_4$ —1,25;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ —0,003; раствор микроэлементов— 1мл, ЭДТА - 0,037).

Культуры грибов выращивали на агаризованных средах СА\* и ВА. В качестве контроля брали ГА.

Раствор водорослей брали так, чтобы вес сухой массы (10 мл раствора автолизата) соответствовал весу сухой массы такого же количества неохмеленного пивного сусла, который использовали для приготовления стандартного 2% СА. Были апробированы две концентрации АВ (15 и 5 мг/мл).

Во второй серии опыта концентрацию водорослей измеряли по оптической плотности АВ с помощью ФЭК-а. Длина волны фильтра — 610нм. Брали следующие разведения - 1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5. ОП соответственно равнялась 1,4; 0,62; 0,59; 0,54; 0,45; 0,36: После разведения раствора АВ добавляли агар из расчета 20 г на 1л и стерилизовали в автоклаве в течение 30 мин при 1 атм. Посев культур проводили в чашках Петри, затем инкубировали в темноте при 24°C. Повторность опыта каждой концентрации трехкратная.

Автолизат водорослей получали после трехдневной термической обработки центрифугата живых водорослей при 80°C.

Микро- и макроморфологические признаки чистых культур изучали на 4,6,8,10, и 14 сутки после инокуляции. Исследования проводились с помощью светового микроскопа PZO (Poland) и СЭМ фирмы Tesla (Чехословакия). Препараты для электронного микроскопа готовили по методу Квательбаумена и Карнера [6] и напыляли золотом. В световом микроскопе мицелий изучали по общепринятой методике приготовления препаратов из зоны роста колоний. Кроме микроскопических исследований, проводили описание характера и скорости роста колоний в различные сроки после инокуляции. При этом описывали текстуру колоний [7], пигментацию мицелия и реверзума, линейную скорость роста по диаметру колоний и др. Контролем служили данные, полученные на СА и ГА. Для получения плодовых тел или примордиев на ВА чашки после обильного вегетативного роста мицелия переносили в условия переменного освещения при температуре 12—15°C.

Микроскопическим исследованиям подвергали также водорослево-гравийный мицелий, выращенный в гидропонических условиях. Контролем служил мицелий, полученный на гравийном субстрате, с подачей среды Тамия (без водорослей) в качестве питания.

**Результаты и обсуждение.** Исследуемые штаммы видов *P. ostreatus*, *P.eryngii* и *A.bisporus* на СА имели типичную морфологию.

*P.ostreatus*: колонии быстрорастущие, с хорошо развитым воздушным мицелием. Рост сегментарно-радиальный. Мицелий белый, позднее — местами подушкообразный, ватообразный. Край колонии гладкий. Мицелий обильно плодоносит при переменном свете в условиях культуры. Мицелий, выращенный на СА, состоит из генеративных и скелетных, хорошо разветвленных,

\* Сокращения. СА - 2% сусло - агар, ВА - водорослевый агар, ГА - голодный агар, АВ - автолизат водорослей, ОП - оптическая плотность.

позже вакуолизированных гиф. Встречаются алантоидные и звездчатые гифы. На клеточных перегородках наблюдаются одно-, двусторонние и мутовчатые пряжки (рис. 1). Запах культуры приятный, грибной. Наблюдаются многочисленные анастомозы. В поздние сроки роста наблюдается прорастание пряжки в гифу. Артроспоры и кристаллы оксалата кальция на гифах отсутствуют. С помощью СЭМ были описаны типичные для *P. ostreatus* бластоспоры на ножке (рис. 2) и мицелиальные петли.



Рис. 1. СЭМ. Односторонняя пряжка у *P. ostreatus*, выращенного на среде с автолизатом *Chlamidomonas* sp. (x 13 000).

Морфология штаммов *P. ostreatus*, выращенных на среде ВА с различной концентрацией АВ (1:2, 1:1, 1:0), не отличалась от типичной. В целом наблюдалось утончение гиф мицелия.

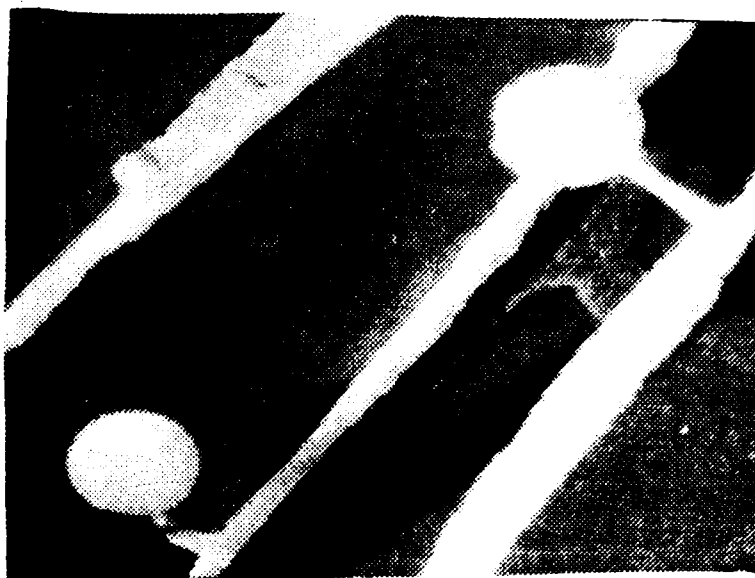


Рис. 2. СЭМ. Бластоспоры у *P. ostreatus*, выращенного на среде с автолизатом *Chlamidomonas* sp. (x 7 000).

*P. eryngii*: колонии растут со средней скоростью по сравнению с *P. ostreatus*. Воздушный мицелий менее развитый, белый, край неровный, перистый. Плодообразование изученных штаммов на СА не отмечалось. Гифы *P. eryngii* тонкостенные и толстостенные, гладкие, вакуолизированные. Пряжки с одно- и двусторонним выраженным отверстием. Были описаны также мицелиальные петли (рис.3) и бластоспоры на ножке. Мицелий *P. eryngii* обильно выделяет в среду кристаллы оксалата кальция. На СА были описаны звездчатые гифы (акантоциты) и дендроидные гифы. На среде с хлореллой (1:3) у *P. eryngii* наблюдается дробление гиф на отдельные инкрустированные частицы (артроспоры) с остатками пряжек или без них, с гранулезным содержимым часто в виде простых цепочек.

Таким образом, в целом микроморфология штаммов *P. eryngii*, выращенного на СА и ВА, не отличалась друг от друга.



Рис. 3. СЭМ. Мицелиальная петля у *P. eryngii*, выращенного на среде с автолизатом *Chlamidomonas* sp. (x 10000).

*A. bisporus*: колонии медленно растущие, белые, с ровным краем, с хорошо развитым воздушным ватообразным мицелием. В поздние сроки роста мицелий радиально-зонально сегментируется. В культуре на СА этот штамм редко образует мицелиальные тяжи. Мицелий не снабжен пряжками, гифы гладкие, широкие, слабоветвистые, частично вакуолизированные, септированные с анастомозами. На поверхностях гиф редко наблюдаются пряжкоподобные утолщения.

Двухнедельные наблюдения за характером роста культур исследуемых видов на ВА, СА и ГА позволили выявить следующие закономерности:

- линейная скорость роста мицелия на ВА и СА почти не отличалась;
- наблюдалось различие в линейной скорости роста колоний на ВА и ГА.

На ВА показатели диаметра и плотности колоний больше, чем на ГА (табл.):

- не отмечалось различие микроморфологии мицелия видов *P.eryngii* и *P.ostreatus* от видовой принадлежности водорослей в составе ВА;
- мицелиальная плотность колоний на СА была несравнительно больше, чем на ВА.
- зависимость плотности колоний исследуемых видов на ВА от испытуемых концентраций АВ незначительная;
- на ВА с небольшим разбавлением АВ(1:0,1:1) мицелий растет с трудом, вероятно, из-за плохой усвояемости питательных веществ водорослевого субстрата;
- удалось пронаблюдать образование плодовых тел у ксилотрофов на среде с АВ. Однако примордии отмечены были у *P.eryngii* (1:1, 1:3) и *P.ostreatus* (1:1).

*Средняя линейная скорость роста колоний на различных средах (в м.м)*

Виды, штаммы грибов	Разведения автолизата водорослей								Контроль	
	<i>Chlamidomonas</i> sp.				<i>Chlorella</i> sp.				СА	ГА
	1:1	1:2	1:3	1:4	1:1	1:2	1:3	1:4		
1. <i>Pleurotus eryngii</i> (MS-27)	18	58	60	58	34	30	33	44	58	50
2. "-" Р - 6 - ш	30	32	22	20	-	-	-	-	50	23
3. "-" Р - 5 - ш	35	33	30	29	-	-	-	-	55	30
4. <i>P. ostreatus</i> 004	58	60	60	60	66	60	68	60	100	50
5. <i>A. bisporus</i> 19	22	26	-	42	25	31	30	25	48	20

Опыты по выращиванию грибов на агаризованной среде Тамия (контроль ГА) показали, что эта среда не имеет питательной ценности для изученных видов грибов.

Микроскопирование мицелия *P.ostreatus*, выращенного на водорослево-гравийном субстрате, показало, что последний подвергается некоторым морфологическим изменениям. На 6-10 сутки роста гифы контрольного опыта (среда Тамия) и опыта (Тамия + водоросль) сильно вакуолизируются и утолщаются. Наблюдаются многочисленные пряжки на перегородках и обильное бластическое спороношение - типичные бластоспоры на ножках. Кроме этого, в среде отмечаются кристаллы оксалата кальция различной формы и конфигурации (тетраэдр, треугольные, палочкообразные и др.). В более поздние сроки (на 20 сутки) происходит конденсация протоплазмы, в результате чего в дальнейшем образуются цепочки энтероталлических артрспоров или в результате их распада - отдельные клетки артроконидий. На генеративных гифах были описаны перпендикулярные веточки (конидиеносцы), которые в дальнейшем и распадаются на артрспоры.

Тщательные микроскопические наблюдения мицелия в разные сроки роста на водорослево - гравийном субстрате не выявили какую либо структурную связь между клетками зеленых водорослей и гифами гриба *P.ostreatus*. Видимо, взаимодействие между двумя организмами происходит на дистанционно - метаболическом уровне без образования симбиотических структур.

Подводя итог исследованию ценности АВ как компонента питательного субстрата для культивирования съедобных грибов, можно констатировать, что СА обладает большей питательной ценностью, чем ВА. Однако наблюдаемый невыраженный стимулирующий эффект автолизата зеленых водорослей на

рост грибов позволяет использовать АВ в качестве дополнительного источника органического питания.

Кафедра экологии и охраны природы

Поступила 12.07.1993

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Мелик-Хачатрян Дж.Г., Коджоян А.А. Новый метод культивирования макромицетов. - Биол. ж.Армении, 1987, 8, с. 667-670.
2. Melik-Khachatryan J.H., Kojoyan A.A. Ecologically based use of Agarics in biotechnology. - X Cong. Europ. Mycol., Tallinn, 1989, p. 75.
3. Melik-Khachatryan J.H., Kojoyan A.A. Biotechnology of the complex use of modernized hydroponic unit. - IV Intern. Mycol. Congr., Regensburg, 1990, p. 244.
4. Коджоян А.А., Мелик-Хачатрян Дж.Г. Технология гидропонного производства посевного мицелия съедобных грибов. - В сб.: Тез. Всесоюз. совещ. "Пробл. культивир. съедобн. грибов в СССР", Пушино, 1991, с. 27-28.
5. Мелик-Хачатрян Дж.Г., Коджоян А.А. Новый способ выращивания стерильного посевного материала степной вешенки. - Матер. Регион. научн.- техн. совещ.- сем. "Культив. гр. рода "Вешенка", Львов, 1990.
6. Quattelbaum E.C., Carner G.R. A technique for preparing Beauveria sp. for scanning electron microscopy. - Can. J. Bot., 1980, v. 58, № 15, p. 1700-1703.
7. Stalpers J.A. Identification of wood-inhabiting Aphyllophorales in pure culture. - Stud. Mycol., 1978, № 16, p. 248.

Ս. Մ. ԲԱՂԱՅԱՆ, Զ.Ն. ՄԵԼԻԿ-ԽԱՉԱՏՐՅԱՆ

ԳԼԽԱՐԿԱՎՈՐ ՈՒՏԵԼՈՒ ՄՆԿԵՐԻ  
ՈՒՍՈՒՄՆԱՄԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ՈՉ ՄՏԱՆԴԱՐՏ ՄԻՋԱՎԱՅՐԻ  
ՎՐԱ (ԶՐԻՄՈՒՈՒՅԻՆ ԱԳԱՐ, ԶՐԻՄՈՒՈՒ-ԽԱՐԱՄԱՅԻՆ  
ՍՈՒՐՍՏՐԱՏ)

#### Ա մ փ ո փ ո մ

Հոդվածում քննարկված է ուսելու սնկերի արհեստական աճեցման պրոցեսում կանաչ ջրիմուռների ( *Chlorella* sp., *Chlamidomonas* sp.) ավտոլիզատը որպես օրգանական նյութի լրացուցիչ աղբյուր օգտագործելու հնարավորությունները:

Արդյունքում նշված կանաչ ջրիմուռների որոշ նպաստող ազդեցությունը սնկերի աճի վրա թույլ է տալիս օգտագործել նրանց ավտոլիզատը որպես լրացուցիչ սննդի աղբյուր: