

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
\_\_\_\_\_ Т. Г. Волова

« 18» июня 2018 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 – Биология

Поверхностное жидкофазное культивирование и  
биологическая активность трутовика скошенного *Inonotus obliquus* (Fr.)  
Pilát.

Руководитель	_____	<u>к.б.н., доцент</u>	Афанасова Е.Н.
Консультант	_____	<u>к.б.н., с.н.с.</u>	Пашенова Н.В.
Выпускник	_____		Дывдык Ю.Н.

Красноярск 2018

## Содержание.

Введение.....	3
1. Обзор литературы.....	5
1.1 <i>Inonotus obliquus</i> (трутовик скошенный) – возможный продуцент биотехнологических производств .....	5
1.2 Жидкофазное культивирование дереворазрушающих базидиомицетов....	7
1.3 Сведения о биосинтетической активности вегетативного мицелия <i>I. obliquus</i> .....	12
2. Материалы и методы.....	15
2.1 Общая характеристика объектов исследования.....	15
2.2 Среды и субстраты, используемые в работе.....	15
2.3 Культивирование грибов и бактерий.....	17
2.4 Проверка антибактериальной активности .....	19
2.5. Оценка влияния культуральной жидкости трутовика скошенного на прорастание семян и развитие сеянцев сосны обыкновенной .....	20
2.6. Статистическая обработка данных.....	22
3. Результаты и обсуждение.....	23
3.1 Культивирование мицелия трутовика скошенного на жидких средах в стационарных условиях.....	23
3.1.1. Оценка роста мицелия <i>I. obliquus</i> на жидких средах.....	23
3.1.2. Использование зернового инокулюма для жидкофазного культивирования трутовика скошенного.....	27
3.2 Исследование антибактериальной активности культуральной жидкости трутовика скошенного в отношении условно-патогенных бактерий.....	28
3.3. Влияние культуральной жидкости трутовика скошенного на прорастание семян сосны в лабораторных условиях.....	32
Выводы.....	37
Список используемой литературы.....	38

## ВВЕДЕНИЕ

Трутовик скошенный - *Inonotus obliquus* (Fr.) Pilát - лекарственный гриб, чьи стерильные склероции – темноокрашенные наросты на стволах живых берез - издавна используются в народной медицине. Препараты из этих склероциев, называемых «чагой», помогают преодолеть негативное последствие химиотерапии у онкобольных, снижают содержание сахара и холестерина в крови, оказывают общий иммуномодулирующий эффект, восстанавливают гормональный баланс, улучшают состояние нервной системы [4]. Кроме этого есть сведения о том, что метаболиты трутовика скошенного - «чага», препятствуют размножению бактерий, путем ингибирования их роста или репликации [5].

Фармакологическое значение чаги привлекло внимание биотехнологов, поскольку контролируемое производство позволило бы устранить недостатки природного сырья: ограниченность и медленную воспроизводимость естественных запасов; неоднородность химического состава, связанную с географическим происхождением дикоросов; возможность загрязнения тяжелыми металлами и радионуклидами из-за техногенного воздействия на окружающую среду.

Знания о биологии объектов культивирования лежат в основе эффективных биотехнологий. Но трутовик скошенный охарактеризован в этом отношении недостаточно, поскольку до сих пор его изучение, преимущественно, было направлено на противоопухолевую активность, связанную со склероциями. Однако в последние годы проявляется интерес к биосинтетической активности собственно мицелия трутовика скошенного. Много внимания уделяется биосинтезу меланина в культурах *I. obliquus* [11], есть немногочисленные сведения о способности этого гриба подавлять рост болезнетворных бактерий [4], проявлять противовирусную активность [12]. Нельзя исключать, что, как и многие другие базидиомицеты, мицелий трутовика скошенного может продуцировать витамины, аминокислоты, фитогормоны, антибиотики и др.[7].

Выращивание мицелия на жидких средах дает определенные преимущества для исследования и производства биологически активных метаболитов грибов, однако жидкофазное культивирование мицелия *I. obliquus* развито недостаточно в сравнении с другими грибами-ксилотрофами.

В связи с вышесказанным, целью нашей работы являлось исследование роста культур трутовика скошенного на жидких средах и проверка их биологической активности в отношении условно-патогенных бактерий и семян хвойных. В задачи исследования входило:

1. Оценить рост мицелия трутовика скошенного на жидких средах
2. Исследовать антибактериальную активность культуральной жидкости трутовика скошенного в отношении условно-патогенных бактерий.
3. Изучить влияние культуральной жидкости трутовика скошенного на прорастание семян сосны в лабораторных условиях.

Работа выполнялась в лаборатории микробиологии и экологической биотехнологии института леса им. В.Н.Сукачева СО РАН, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН».

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. *Inonotus obliquus* (трутовик скошенный) – возможный продуцент биотехнологических производств.

Трутовик скошенный – дереворазрушающий базидиальный гриб, который развивается в стволах живых берёз, реже иных лиственных пород, и образует на стволах растения-хозяина стерильные склероции, называемые чагой. Его споры прорастают только в том случае, если попадают на повреждённые участки коры деревьев. Заражение вызывает белую ядровую гниль древесины. Встречается в берёзовых лесах России, восточной Европы, Кореи; в США - на севере и в горах Аппалачах. Ареал его, однако, не выходит за границы ареала берёзы, обрываясь в зоне перехода от тайги к лесостепи.

Плодовое тело трутовика скошенного проходит несколько этапов развития. На первой стадии роста трутовик скошенный представляет собой нарост на стволе дерева, с размерами от 5 до 20 (иногда – до 30) см. форма нароста – неправильная, полушаровидная, имеющая чёрно-бурую или чёрную поверхность, покрытую трещинами, бугорками и шероховатостями. Интересен тот факт, что скошенные трутовики произрастают только на живых, развивающихся деревьях, а вот на отмерших стволах деревьев этот гриб прекращает свой рост. С этого момента начинается вторая стадия развития плодового тела. С противоположной от склероциев стороны отмершего древесного ствола начинает своё развитие расплостёртое плодовое тело, которое изначально имеет вид плёнчатого и лопастного гриба, имеющего ширину не больше 30-40 см, и длину до 3 м. По мере созревания трутовик скошенный разрушает кору отмершего дерева, а после того, как грибные поры расплываются, плодовое тело становится тёмным, и постепенно засыхает. Грибная мякоть у скошенных трутовиков – деревянистая и очень плотная, характеризуется буроватым или тёмно-коричневым цветом. Наросты чаги – это частично измененная грибом древесина (разрушенная или неправильно развивающаяся), а кора склероция состоит из

меланизированных (черно-бурых гиф), которые качественно отличаются от грибницы внутри ствола. [8].

На протяжении всего сезона плодоношения трутовик скошенный паразитирует на древесине берёз, ольхе, иве, рябине, осине. Развивается в углублениях и трещинах деревьев, паразитируя на них 10-20 лет, пока древесина не станет трухлявой, и не рассыплется. Снаружи он неправильной формы, черного цвета с маленькими частыми трещинами. Внутри меняет цвет от коричневого до бурого. Встретить этот гриб можно не часто, а определить его наличие на первых стадиях развития можно по стерильным наростам.

Чага содержит широкий спектр различных биологически активных веществ: водорастворимые пигменты в большом количестве (20%), которые образуют хромогенный полифенолкарбонный комплекс, проявляющий противоопухолевую активность; птерины, наличием которых обуславливается цитостатическое действие чаги (задерживание роста опухолей и развития метастазов, вплоть до их регрессии); полисахариды (6-8%); агарициновая и гуминоподобная чаговые кислоты (до 60%); органические кислоты – щавелевая, уксусная, муравьиная, ванилиновая, сиреневая, п-оксибензойная, инонотовая, обликвиновая (0,5-1,3%); липиды; стероидные вещества; легнин; клетчатку; свободные фенолы; флавоноиды; кумарин паucedанин; целлюлозу; смолы; следы алкалоидов; золу (12,3%), богатую марганцем и оксидами микроэлементов меди, бария, цинка, железа, кремния, алюминия, кальция, магния, калия, натрия [13].

Интерес к искусственному культивированию чаги связан с определенными сложностями ее заготовки в природе, необходимостью контроля собранного сырья на безопасность для человека, истощимостью природных ресурсов [5].

Чага разрешена Фармакологическим комитетом Министерства здравоохранения СССР к использованию в 1955 г. С тех пор препараты из чаги применяют как активные биогенные стимуляторы защитных сил

организма, центральной нервной системы и эстрогенов. Они улучшают обмен веществ, восстанавливают активность заторможенных ферментных систем, регулируют деятельность сердечно-сосудистой и дыхательной систем, повышают уровень лейкоцитов, повышают сопротивляемость организма к инфекционным заболеваниям и воспалительным процессам, нормализуют деятельность желудочно-кишечного тракта и кишечной микрофлоры, обладают спазмолитическими и мочегонными свойствами, снижают уровень сахара в крови на 16-30%. Но самое важное действие препаратов чаги это поддержание защитных механизмов организма, направленных на борьбу со злокачественными опухолями, позволяющее продлить жизнь онкобольным от нескольких месяцев до нескольких лет [14].

Из-за технических сложностей заготовки чаги в природе, необходимости контроля собранного сырья на безопасность для человека, ограниченности и истощаемости природных ресурсов встал вопрос об искусственном выращивании трутовика скошенного [28] и, в частности, биотехнологическом производстве склероциев этого гриба [5]. Работы в этой области свидетельствуют о возможности получения чаги путем культивирования в контролируемых условиях [27].

Кроме биологически активных веществ, благотворно влияющих на организм человека и млекопитающих, имеются свидетельства антибактериальной активности метаболитов трутовика скошенного.

Дальнейшее развитие биотехнологического производства чаги связано с совершенствованием методов выращивания грибницы (вегетативного мицелия) данного гриба. Однако, особенности мицелия трутовика скошенного при росте в контролируемых условиях и его биосинтетическая активность еще нуждаются в изучении [19]. Особо следует отметить недостаток сведений о росте данного гриба в условиях жидкофазного культивирования.

## **1.2. Жидкофазное культивирование дереворазрушающих базидиомицетов.**

Трутовик скошенный относится к экологической группе дереворазрушающих грибов, которые сравнительно легко поддаются культивированию на сыпучих субстратах и жидких средах [13].

Известно, что биологически активные вещества высших грибов содержатся не только в базидиомах, но и в вегетативном мицелии гриба, получаемом путем жидкофазного и твердофазного культивирования. Важным преимуществом получения биомассы мицелия с помощью биотехнологических методов являются экологическая чистота получаемых препаратов, возможность создания производства и доступность сырьевых ресурсов [15].

Активные исследования по жидкофазному культивированию мицелия лекарственных и, особенно, съедобных грибов начались после того как было доказано, что состав глубинного мицелия по всем важнейшим показателям (содержание белка, липидов, ароматических соединений, витаминов; ненасыщенных жирных кислот, структурно-функциональных полисахаридов) сопоставим или качественно превосходит состав плодовых тел грибов [7]. Отмечено, что, в связи с возросшим интересом к базидиальным грибам, перспективно всестороннее исследование новых представителей данного класса как объектов, биотехнологического производства с целью получения на их основе профилактических и лечебных средств для поддержания иммунной системы в норме и при патологических состояниях [16]. Показано, что в условиях глубинного культивирования базидиомицеты синтезируют широкий спектр биологически активных веществ (белки, липиды, полисахариды, каротиноиды, низко- и высокомолекулярные фенольные соединения и др.) на уровне, превышающем содержание этих же веществ в плодовых телах [7]. Культивирование на жидких средах представляется наиболее подходящим для получения биомассы или ценных метаболитов грибов. Важным преимуществом



получения биомассы мицелия с помощью биотехнологических методов являются экологическая чистота получаемых препаратов, возможность создания производства и доступность сырьевых ресурсов [15].

Одной из причин отсутствия широкомасштабного производства мицелия базидиомицетов является их низкая скорость роста и длительная адаптация к источникам углеродного и азотного питания. Кроме того, для получения препаратов мицелия необходим поиск наиболее продуктивных и биологически активных штаммов. Поиск таких штаммов перспективно проводить среди изолятов, выделенных в мало изученных регионах России, таких как Западная и Восточная Сибирь и Республика Тыва. Скрининг штаммов среди этой группы макромицетов необходимо также осуществлять по показателям противомикробной активности, скорости роста и токсичности.

Для культивирования мицелия базидиальных грибов используются те же методы, что и для бактерий, анаморфных (несовершенных), грибов, дрожжей [16]. При поверхностном культивировании микроорганизмы развиваются на поверхности питательной среды. Среды могут быть плотными, сыпучими или представлять собой тонкий слой жидкой среды. Глубинный метод культивирования является более совершенным по сравнению с поверхностным. При этом микроорганизмы растут и развиваются во всем объеме питательной среды, а не только на ее поверхности.

Среды для культивирования должны содержать источники углерода, азота, других биогенных элементов, а также микроэлементы. В определенных случаях, если необходимо для роста культуры или получения определенного продукта, в среды добавляют специфические компоненты. Базидиальные грибы, обладающие мощной экзоферментной системой, способны расщеплять растительные полимеры (целлюлозу, пектины, лигнин, гемицеллюлозы, белки и проч.). Это позволяет при приготовлении сред использовать не химические реактивы, а отходы различных производств (лигноцеллюлозные субстраты, крахмал, молочную сыворотку, жмых

фруктов, ягод, семян и т.п.) [15]. При культивировании дереворазрушающих грибов необходимо учитывать, что в природе они обитают на субстратах с низким содержанием азота. Соотношение C/N в древесине составляет около 300, тогда как, например в почвах, где обитает большое количество бактерий и несовершенных грибов этот показатель варьирует от 12 до 20 [17]. Поэтому высокое содержание азотсодержащих компонентов в средах для культивирования мицелия ксилотрофов может ингибировать его рост.

По отношению к температуре базидиальные грибы являются мезофилами, то есть рост мицелия происходит в интервале от 18 до 25<sup>0</sup> С. Но культивирование различных видов грибов (даже разных штаммов одного и того же вида) может потребовать определения более узкого интервала оптимальной температуры, обеспечивающего максимальный урожай биомассы или другого продукта культивирования. Базидиальные грибы относятся к аэробам: им для роста мицелия необходим кислород. Но дереворазрушающие грибы, чей мицелий развивается под корой стволов и в толще древесины, адаптированы к дефициту кислорода и могут переносить достаточно высокие концентрации CO<sub>2</sub>. Еще одним важным условием для роста всех микроорганизмов является уровень кислотности среды. У базидиомицетов грибы этот показатель варьирует от 2 до 7 рН. Лигнинразрушающие ксилотрофы предпочитают «слабокислые» условия (4 – 6 рН), целлюлозоразрушающие грибы развиваются в этих же условиях, но в процессе роста могут понизить кислотность среды до 2 – 3 рН [29].

Преимуществами жидкофазного культивирования мицелия базидиальных грибов является то, что полученные на жидких средах биомасса и биологически активные вещества требуют меньше затрат на разделение и очистку [22].

Искусственное выращивание микроорганизмов, в том числе и культур базидиальных грибов, подразделяется по агрегатному состоянию сред культивирования на жидких средах (жидкофазное культивирование, ЖФК) и твердых сыпучих субстратах (твердофазное культивирование, ТФК).

Культивирование на жидких средах представляется наиболее подходящим для получения биомассы или ценных метаболитов грибов [8].

Рост на жидких средах может происходить стационарно и перемешиваемой глубинной культуре. В первом случае, мицелиальная пленка развивается на поверхности жидкой среды, на границе жидкостной и воздушной фаз. Во втором случае, рост мицелия происходит по всему объему постоянно перемешиваемой среды в виде отдельных округлых колоний – пеллет. Перемешивание может осуществляться за счет механических лопастных мешалок, которыми снабжают культивационные сосуды (ферментеры, тэнки), за счет барботирования (пропускания через среду пузырей воздуха). В лабораторных условиях глубинное ЖФК могут проводить в меньших объемах: в колбах, которые устанавливают на магнитные мешалки или в специальные приборы (шейкеры, качалки), обеспечивающих постоянное встряхивание или покачивание. Перемешивание среды обеспечивает достаточное для роста аэрирование и одинаковую концентрацию питательных веществ в любой точке культивационного сосуда [8].

Глубинное культивирование на жидких средах может быть периодическим и непрерывным. Совокупность остатков питательной среды, растущих в ней микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности, образующихся при глубинном культивировании, называется культуральной жидкостью. При периодическом культивировании на определенном этапе роста, когда культура достигла максимально возможного урожая биомассы или иного требуемого продукта, культивационный сосуд освобождают от биомассы и культуральной жидкости и готовят к следующему циклу культивирования. При непрерывном культивировании на соответствующем этапе из ферментера отбирают большую часть биомассы и культуральной жидкости, и к остатку доливают свежую порцию стерильной среды. Культивирование продолжается, при этом оставшаяся в ферментере биомасса служит инокулюмом для нового цикла роста [12].

Полученные при выращивании мицелия на жидких средах биомасса и биологически активные вещества грибов требуют меньше затрат на разделение и очистку.

Жидкофазное культивирование базидиомицетов имеет свои проблемы и среди них – получение подходящего инокуляционного материала. Желательно, чтобы инокуляционный материал обеспечивал множество точек роста (пропагулы, КОЕ – колониеобразующие единицы) в жидкой среде [24]. Это легко достижимо при работе с бактериями и конидиеобразующими несовершенными грибами, позволяющими приготовить суспензии с большим количеством КОЕ. У базидиальных грибов редко встречается конидиальное спороношение. И это требует специальных приемов подготовки инокуляционного материала.

### **1.3. Сведения о биосинтетической активности вегетативного мицелия *I. obliquus* .**

Для биотехнологического производства склероциев трутовика скошенного жидкофазное культивирование мицелия может быть использовано ограниченно, как один из методов получения инокулюма (посевого материала). Но сходство плодовых тел и вегетативного мицелия по биохимическому составу, доказанное у других видов базидиомицетов, а также то, что мицелий является одним из значимых компонентов чаговых наростов, позволяет предполагать, что в процессе культивирования собственно мицелия *I. obliquus* можно получать ценные биологически активные вещества, хотя и не обязательно обладающие лекарственными свойствами.

Несмотря на длительный период исследований и широкое использование в народной и официальной медицине препаратов на основе дереворазрушающего базидиального гриба *I. obliquus*, интерес к изучению его химических компонентов и пониманию механизмов их биологического действия остаются всё ещё востребованными. Только за последние годы, как в России, так и в Китае появилось несколько обзорных работ,

свидетельствующих о значительном интересе к этому грибу и его непереходящей медицинской значимости [1].

Продуцирование биологически активных веществ в вегетативных культурах трутовика скошенного в России исследовали еще в середине прошлого века. За более чем полувековую научную историю изучения гриба *I.obliquus* было обнаружено множество соединений различной химической природы: тритерпеноиды, полифенолы, простые и сложные сахара, ароматические и жирные кислоты, аминокислоты, полипептиды. Многие из названных соединений проявляют специфический характер биологической активности и помогают в лечении рака, сердечно-сосудистых заболеваний, диабета, успешны при аллергии, регулируют кровяное давление и содержание липидов в крови, являются активными антиоксидантами, а также стимулируют иммунную систему организма [5].

В последние годы показано, что мицелий *I.obliquus* является перспективным агентом биотехнологии для получения противовирусных препаратов. Водные экстракты из мицелия этого гриба, содержащие полисахариды и меланино-протеиновые комплексы, показали эффективность против ВИЧ, вирусов герпеса, гриппа, ортопоксивирусов и проч. При этом, спектр вирусных штаммов, на которые воздействовали культуры трутовика скошенного, был шире, чем у других дереворазрушающих грибов [28].

В настоящее время интерес исследователей обратился к производству грибных меланинов, обладающих высокой антиоксидантной и сорбирующей способностями. Показано, что культуры *I.obliquus* являются перспективными продуцентами меланиновых пигментов и их свойства интенсивно исследуются [7, 11].

Согласно данным литературы, трутовик скошенный может проявлять антибактериальные свойства. Показано ингибирование роста возбудителя туляремии – *Francisella tularensis* и бактерии *Mycobacterium smegmatis* культуральной жидкостью *I. obliquus* [4].

Исследования биосинтетической активности вегетативного мицелия трутовика скошенного продолжают. Различные авторы обращают внимание на изменчивость химического состава гриба и обнаруживают всё новые соединения, что в значительной мере зависит от биологических и физико-химических особенностей объекта исследования, характера экстракции и используемых физико-химических методов анализа [18].

При исследовании природного материала (чаги) было обнаружено, что на состав и свойства антибактериальных веществ трутовика скошенного, паразитирующего на стволах живых деревьев, могут влиять особенности его взаимоотношения с растением-хозяином или мицелием других базидиомицетов-конкурентов [19]. Работы выполненные в лабораторных условиях также показали, что биосинтетической активностью культивируемого мицелия *I.obliquus* можно управлять с помощью внешних факторов (химический состав среды или субстрата, температура культивирования, воздействие света с определенной длиной волны, совместный рост с другими организмами и проч.) [7, 11, 30]. Исследования в этой области ведутся для разработки условий культивирования, позволяющего получать большой урожай требуемого продукта с заданными свойствами.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 2.1. Общая характеристика объектов исследования.

Основным объектом исследования были штаммы трутовика скошенного - *Inonotus obliquus* (Fr.) Pilát (*Hymenochaetaceae*, *Hymenochaetales*, *Incertae sedis*, *Agaricomycetes*, *Agaricomycotina*, *Basidiomycota*, *Fungi*) [9]. В работе использовали 2 штамма: сибирская культура (ch3), изолированная из нароста чаги на березе, собранного в окрестностях г. Красноярска (2004 г.), и культура, имеющая японское происхождение (Io), получена (2003 г.) из Чунбукского Университета (Республика Корея). Оба штамма поддерживались на скошенном агаре в рабочей коллекции грибных культур Института леса ФИЦ КНЦ СО РАН.

Для проверки антибактериальной активности использовали культуры условно-патогенных бактерий: *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* из рабочей коллекции Института леса.

В опытах по оценке влияния на прорастания семян и стимуляцию роста хвойных были использованы семена *Pinus sylvestris* L.

### 2.2. Среды и субстраты, используемые в работе.

Основной средой в работе было разбавленное неохмеленное пивное сусло (3,4 градуса по Баллингу). Эта среда использовалась в агаризованном виде (СА) для выращивания инокуляционного материала трутовика скошенного и совместного культивирования трутовика и березовой губки. Жидкое разбавленное сусло использовали для культивирования мицелия трутовика, как в чистом виде (СС), так и с добавлением водного экстракта чистотела (СЭЧ) (соотношение сусло : экстракт – 2 : 1). Экстракт чистотела был введен в среду, поскольку в литературе имеются сведения о том, что он стимулирует рост дереворазрушающих грибов-ксилотрофов [6]. Жидкие среды разливали по 20 или 30 мл в колбы (объем 100 мл) или стандартные чашки Петри.

Дополнительно был проверен рост исследуемых штаммов на среде (БСО), содержащей березовый сок (собран в мае 2017 г., до использования хранился в замороженном виде) и отвар опилок березы (160 г воздушно-сухих опилок кипятили 30 минут в 800 мл водопроводной среды, остужали, фильтровали и доводили водопроводной водой до первоначального объема).

Кроме органических сред на основе разбавленного суслу и древесины березы в работе был проверен рост исследуемых культур на полусинтетических средах – глюкозо-пептонной и крахмало-аммиачной.

Глюкозо-пептонная (ГПС) (по Фалиной) [2] Маттисон и др пептон – 3 г; глюкоза – 10 г;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,6 г;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,4 г;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 1,0 г; вода – 1 л.

Крахмал-аммиачная на солевой основе Норкранс (НКС): крахмал – 10 г;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 2 г;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,6 г;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,4 г;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 1,0 г; вода – 1 л. Была модифицирована: приготовлена на солевой основе среды Норкранс [2].

Для выращивания бактериальных культур и проверки антибактериальной активности экзометаболитов трутовика скошенного использовали мясо-пептонный бульон и агар (МПБ, МПА) (пептон – 10 г;  $\text{NaCl}$  – 5 г; мясной бульон – 1 л, агар – 15г). Среда МПА была использована также для культивирования штаммов трутовика скошенного в экспериментах по проверке возможности индуцирования антибактериальной активности у этого гриба при росте на неблагоприятном субстрате.

Взаимоотношение трутовика скошенного и условно-патогенных бактерий при прямом контакте колоний исследовали на среде МСА (Агаризованная среда, состоящая из смеси равных объемов МПБ и разбавленного суслу).

Субстрат для получения зернового инокулюма (ЗИ) трутовика скошенного готовили следующим образом. 100 г зерна пшеницы заливали 150 мл водопроводной воды, доводили до кипения и варили в течение 15 мин., не допуская разваривания зерновок. Зерно отбрасывали на сито и слегка подсушивали при комнатной температуре. Влажное зерно смешивали



с 2 г гипса и 0,6 г мела, раскладывали по колбам объемом 0,5 л (высота зернового слоя – 2,5 – 3 см) и стерилизовали автоклавированием при 1 атм, 30 мин.

### **2.3. Культивирование грибов и бактерий**

**Получение инокулюма.** При выполнении экспериментов использовали агаровый и зерновой инокулюмы. В первом случае культуры грибов выращивали на среде СА в течение 14 дней. Агаровые блоки (диаметр – 9 мм), вырезанные при помощи стерильного пробочного сверла из края колоний использовали как инокуляционный материал в экспериментах.

Для получения зернового инокулюма (ЗИ), колбы с зерновым субстратом, приготовленным, как описано выше, засеивали блоками с мицелием трутовика скошенного: 3 блока/колба. Колбы помещали в термостат при 24<sup>0</sup>С и культивировали в течение 30 суток, встряхивая энергично колбы на 8, 20 и 26 сутки для перемешивания, аэрации и сохранения сыпучести. На 30 сутки колбы без встряхивания помещали в холодильник на неделю. Перед использованием ЗИ в экспериментах колбы из холодильника снова энергично встряхивали, что возвращает сыпучесть и позволяет точнее дозировать порции ЗИ при засеивании сред.

**Культивирование грибов и бактерий.** Жидкие среды разливали по 100 мл в колбы (объем 250 мл) или по 20 мл в стандартные чашки Петри. Колбы и чашки засеивали агаровым инокулюмом из расчета 1 блок/1 чашка. Культивирование выполняли в течение 60 дней. Незасеянные колбы со средой, которые инкубировали вместе с посевами, служили контролем.

Для сравнительной оценки зернового (ЗИ) и агарового (АИ) инокулюмов трутовика скошенного жидкое сусло (СС) засеивали обоими типами посевного материала: в каждую колбу, содержащую 30 мл среды помещали по 2 блока, вырезанных из грибной колонии, или зерновой инокулюм, эквивалентный агаровому по объему. Культивирование в этом случае продолжалось 21 день.

Рост исследуемых культур происходил при постоянной температуре 240С, в темноте. При культивировании на разных средах в чашках Петри на 14 и 21 сутки роста описывали морфологию колоний и выполняли микроскопические исследования. Препараты для микроскопических исследований – «раздавленная капля» – готовили с использованием водно-спиртово-глицериновой (1:1:1) смеси в качестве поддерживающей среды [8]. Микропрепараты исследовали с помощью микроскопа МикМед 2, снабженного фазово-контрастной системой КФ-4М (производство ЛОМО, РФ) и фотокамерой. Готовый препарат просматривали на микроскопе, отмечая особенности микроморфологии мицелия и проводя замеры толщины гиф.

По завершении культивирования биомассу фильтровали и сушили до постоянного веса. По полученным значениям а.с.в. рассчитывали урожай биомассы по формуле:

$$A = a/v \quad (\text{г/л}),$$

где  $a$  – количество биомассы (г, а.с.в.),

$v$  – объем среды (л), обеспечивший накопление биомассы « $a$ », (в зависимости от опыта  $v = 0,02, 0,03$  или  $0,1$  л).

Небольшое количество сырой биомассы штамма Ю, полученной на среде СЭЧ, использовали для приготовления гомогената мицелия. Высушенную биомассу, полученную на среде СЭЧ, использовали для приготовления спиртовых экстрактов. Культуральную жидкость и контрольную стерильную среду, измерив рН, использовали для исследования антибактериальной активности и оценки влияния на прорастание и развитие сосны обыкновенной.

Изучение взаимоотношений трутовика скошенного и условно патогенных бактерий изучали в совместной культуре на среде МСА. Среду в чашках Петри инокулировали в центр одним блоком с мицелием трутовика скошенного. Через 5 суток подсевали штрихами бактериальные культуры (*Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*). Учет проводили на 16 сутки роста,

описывая качественные проявления взаимодействия грибных и бактериальных культур.

Культуры трутовика скошенного выращивали на среде МПА в течение 30 суток, после чего агаровые блоки с мицелием грибов использовали для проверки антибактериальной активности экзометаболитов.

По завершении роста на жидких средах собирали и сушили грибную биомассу, для оценки активности роста исследуемых штаммов, измеряли рН культуральной жидкости, используя рН метр, кроме того, культуральную жидкость использовали для проверки антибактериальной активности экзометаболитов чаги.

#### **2.4. Проверка антибактериальной активности.**

Взаимоотношение исследуемых штаммов трутовика скошенного с условно-патогенными бактериями *S. aureus* и *P. vulgaris* были предварительно проверены при совместном культивировании на среде МСА. Среду инокулировали, помещая агаровый блок с мицелием гриба в центр агаровой пластинки. Чашки инкубировали 7 суток при 240С, и после начала роста гриба к его колонии методом «штриха» подсевали бактериальные культуры. Учет взаимоотношений проводили на 4, 7 и 14 сутки роста, описывая качественные проявления взаимодействия грибных и бактериальных культур.

Антибактериальную активность проверяли у материала, полученного при культивировании исследуемых штаммов *I.obliquus* на среде СЭЧ. При этом были проверены: 1) исходная среда, культуральная жидкость, водный гомогенат сырой биомассы штамма *Io* культивировании на жидких средах антибактериальную активность проверяли у стерильной среды и культуральной жидкости, водного гомогената сырой биомассы, спиртового экстракта высушенной биомассы и концентрированных (упаренных в токе теплого воздуха до сиропообразной консистенции) исходной среды и культуральной жидкости.

Для приготовления водного гомогената сырую биомассу (около 1г) помещали в стерильную ступку, добавляли 2 мл стерильной воды и тщательно растирали.

При приготовлении спиртового экстракта высушенную биомассу растирали в ступке с кварцевым порошком (стеклом). В стерильные пробирки Эппендорфа (объем 2 мл) помещали по 100 мг порошкообразной биомассы. К навескам добавляли по 1 мл этанола (96%) (соотношение 1:10) [1]. Пробирки закрывали, тщательно встряхивали и помещали для настаивания при комнатной температуре на 4 суток.

Концентрат для приготовления водного экстракта получали упариванием культуральной жидкости в токе тёплого воздуха до состояния густого сиропа.

Антибактериальную активность проверяли методом лунок [31]. В пластинках МПА стерильно пробочным сверлом вырезали 4 лунки (диаметр – 8 мм). В каждую лунку вносили по 100 мкл жидкости: 1 лунка – контроль (стерильная вода или спирт) и 3 лунки – опыт. Чашки с заполненными лунками помещали на сутки в термостат для диффузии веществ из жидкости в агаровую пластинку. После чего чашки засеивали исследуемыми бактериальными культурами - *S. aureus* и *P. vulgaris*. Засев производили, внося по 0,1 мл водной суспензии бактерий с произвольным титром в чашки с лунками и растирали шпателем. На 3 и 7 сутки отмечали наличие или отсутствие зон роста бактерий вокруг блоков.

При исследовании концентратов культуральной жидкости или среды сиропобразную жидкость наносили виде капли (около 200 мкл) в центр пластинки МПА. Чашки выдерживали сутки при 24<sup>0</sup>С для диффузии веществ в агар. После этого методом «штриха» подсеивали культуры используемых бактерий.

## **2.5. Оценка влияния культуральной жидкости трутовика скошенного на прорастание семян и развитие сеянцев сосны обыкновенной**

В тесте использовали семена сосны обыкновенной, собранные в декабре 2013 года в АУГХ «Ширалессервис» (получены из Лесосеменной станции Красноярского края). Семена помещали в маркированные марлевые мешочки по 50 штук и протравливали препаратом «Максим» (ООО «Сингента»), чтобы предотвратить развитие плесневых и фитопатогенных грибов на поверхности семян. Действующее вещество препарата – фунгицид флудиоксонил, концентрация в рабочем растворе – 25 г/л. 24 мешочка с семенами замачивали в 300 мл раствора препарата на 30 минут. После этого мешочки выкладывали на фильтровальную бумагу и оставляли на 1 час для удаления избытка раствора препарата.

Протравленные и обсушенные семена подвергали обработке следующих жидкостей:

- 1) стерильная вода (контроль Кв);
- 2) стерильная среда (контроль Кс);
- 3) водный экстракт чаги (контроль Кч);
- 4) культуральная жидкость сибирского изолята трутовика скошенного sh 3 (опыт Окж).

Кроме того, было проверено влияние замачивания на прорастание семян, необработанных препаратом. Для этого семена, непрошедшие поверхностное обеззараживание, помещали в:

- 1) стерильную воду (контроль НКв);
- 2) культуральную жидкость сибирского изолята трутовика скошенного sh 3 (опыт НОж).

Во всех вариантах замачивание проводили из расчета 3 марлевых мешочка с семенами/ 40 мл исследуемой жидкости. Настаивание длилось 24 часа при температуре 17 – 19°C. После этого семена извлекали, слегка обсушивали на фильтровальной бумаге и раскладывали во влажные камеры. Прорастание семян сосны оценивали согласно ГОСТу 13056.6-97 «Семена

деревьев и кустарников»[2] и учитывали на двух этапах: 1) спустя 7 дней после раскладки семян (энергия прорастания) и 2) спустя 14 дней после раскладки (техническая всхожесть). Энергия прорастания – это способность семян быстро и одновременно прорасти:

$$\text{Э} = n/N * 100\%,$$

где n - число семян, проросших за 1/2 или 1/3 срока проращивания, шт.;

N – число семян, взятых для проращивания, шт.

Техническая всхожесть – это отношение числа проросших семян к общему числу семян, взятых для проращивания, выраженное в процентах:

$$\text{В} = n/N * 100\%,$$

где n – число проросших семян, шт.;

N – число семян, взятых для проращивания, шт. [3]

По окончании эксперимента оценивали влияние метаболитов трутовика скошенного на морфометрические показатели сеянцев (общую длину, длину корней и надкорневой части) и их фитомассу (по а.с.в.).

## **2.6. Статистическая обработка данных**

Все эксперименты выполняли в 3 – 6 повторностях. Средние показатели скорости роста и пределы их варьирования рассчитывали по стандартным процедурам. Определение достоверности различий средних показателей проводили с использованием пакетов программ Excel 2007 и STATISTICA 8.0. Статистическая Достоверность различий (при  $P \leq 0,05$ ) оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни, а также по критерию Стьюдента (при значениях  $>30$ ).

## **РЕЗУЛЬТАТЫ**

[Изъято 14 страниц]

## ВЫВОДЫ

Полученные нами результаты позволили сделать следующие выводы:

1. Установлено, что при стационарном культивировании на жидких средах большее накопление биомассы исследуемых штаммов трутовика скошенного (8-11 г/л а.с.в.) обеспечивало разбавленное неохмеленное сусло. Показано, что использование для засева жидкой среды зернового инокулюма трутовика скошенного увеличивало урожай биомассы исследуемых штаммов в 2-5 раз по сравнению с агаровым инокулюмом.

2. Проверка антибактериальной активности культуральной жидкости и экстрактов биомассы исследуемых штаммов трутовика скошенного показала слабый антагонизм гриба в отношении *Staphylococcus aureus*: зону отсутствия бактериального роста шириной 2-3 мм наблюдали только при действии концентрированной упариванием культуральной жидкости штамма Ю.

3. Установлено, что культуральная жидкость сибирского штамма *I. obliquus* ch3 оказывала стимулирующее действие на прорастание семян сосны обыкновенной: после замачивания в культуральной жидкости показатель энергии прорастания достоверно увеличивался на 20%, средние показатели длины и веса сеянцев, соответственно, на 7 и 15% по сравнению с семенами, замоченными в воде.



### Список используемой литературы.

1. Жилинская Н.В., Диссертация Противомикробные свойства базидиомицетов *Fomitopsis officinalis* (Vill.: Fr.) Bond. et Sing., *Fomitopsis pinicola* (Sw.: Fr) P. Karst. u *Trametes versicolor* (L.: Fr.). Дисс. Кандидата биол. наук. – Москва, 2015. – 24с.
2. ГОСТ 13056.6-97 «Семена деревьев и кустарников». Электронный ресурс <http://gostrf.com/normadata/1/4294838/4294838083.pdf>
3. Определение качества семян. Электронный ресурс [http://forest-culture.narod.ru/Issled\\_gr/lk\\_90/lab10.html](http://forest-culture.narod.ru/Issled_gr/lk_90/lab10.html)
4. Шариков А.М., Пашенова Н.В., Нешумаев Д.А., Новицкий И.А. Исследование антибиотической активности гриба чаги в отношении возбудителя туляремии // Тихоокеанский медицинский журнал 2010. - № 1 (39). – С.64-65
5. Шиврина А. Н., Ловягина Е. В. Исследование стеринов и тритерпенов у гриба *Inonotus obliquus* (Fr.) Pil. В кн.: Кормовые белки и физиологически активные вещества для животноводства. М.—Л., «Наука», 1965.
6. Пашенова Н.В., Лоскутов С.Р., Пермякова Г.В., Анискина А.А. Влияние отвара чистотела на биоконверсию сосновых опилок культурами базидиальных грибов-ксилотрофов. Мат. IV Всерос. конф. «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья». Барнаул, 21–23 апреля 2009г. – Барнаул: Изд. Алт. Ун-та, 2009. – Кн. 2. – С. 39-41
7. Бабицкая В.Г., Щерба В.В., Пучкова Т.А., Бисько Н.А. Биологически активные соединения съедобных и лекарственных грибов. / Биологические особенности лекарственных макромицетов в культуре. Сборник научных трудов. Т.2. – Киев, 2012. – С. 76-344.
8. Егоров Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М.: МГУ, 1995. — 224 с.
9. Index Fungorum <http://www.indexfungorum.org>

10. Jarosz-Wilkolazka A., Malarczyk E., Iarzysta M., Biali Z., Leonowicz A. Effect of saponin from *Medicago sativa* extracts on biological activity of *Trametes versicolor* // New Horizon of Bioscience in Forest Products Field. Proc.of the 2nd International Symposium, April 19-20, 2003, Cheongju, Korea.- Cheongju:Chungbuk National University, 2003.- P. 213-220.

11. Поединок Н.Л. Биотехнологические основы интенсификации культивирования съедобных и лекарственных макромицетов с помощью света низкой интенсивности. Дисс. Доктора биол. наук. – Киев, 2015.- 387с.

12. Проценко М.А. Разработка технологии экспериментальных образцов препаратов из высших базидиомицетов. Дисс. Кандидата биол. наук. – Кольцово, 2017. – 178с.

13. А.С.Бухало, Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. Издательство «Наукова думка» Киев 1988. – 143 с.

14. Г.К. Ковалева. Автореферат диссертации по теме "Биологические особенности и биохимический состав ксилотрофных базидиомицетов *Fomitopsis officinalis* (Vill.: Fr.) Bond. et Sing., *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. и *Trametes versicolor* (L.: Fr.) Pilat". Москва 2009.

15. Госманов, Р.Г. Микробиология: Учебное пособие / Р.Г. Госманов, А.К. Галиуллин, А.Х. Волков. - СПб.: Лань, 2011. - 496 с.

16. Мазин В.В.: Грибы, растения и люди. - М.: Агропромиздат, 1986. – 208с.

17. Бабьева И.П., Зенова Г.М. Биология почв: Издательство Московского университета, 1983. — 248 с.

18. Материалы первого всероссийского конгресса по медицинской микологии. Грибная биотехнология в медицине: лекарства, пищевые добавки и вакцины. Под общей научной редакцией Ю.В. Сергеева. Издательство «Национальная академия микологии» от 12.04.2001. Том 1, глава 6.

19. Н.В. Белова, О необходимости изучения биологии и биохимической активности *Inonotus obliquus*. Микология и фитопатология. Ботанический

институт имени В.Л. Комрова, Санкт-Петербург, Россия 2014. Том 48, вып.6, с. 401-403.

20. Rayner A.D.M., Boddy L. Fungal Communities in the Decay of Wood // *Advances in Microbial Ecology*. 1988. V. 10. P. 115 – 166 с.

21. Беккер З.Э.: Физиология грибов и их практическое использование. - М.: МГУ, 1963. – 272с.

22. Гарибова Л.В., Лекомцева С.Н. Основы микологии: морфология и систематика грибов и грибоподобных организмов. М.: КМК, 2005. – 220с.

23. Дьяков Ю.Т. Введение в альгологию и микологию. М.: МГУ, 2000. – 192с.

24. Мюллер Э., Лефлер В. Микология. М.: Мир, 1995. – 343 с.

25. Мир растений. Том 2. Грибы. / М.В.Горленко. М.: Просвещение, 1991. – 479 с.

26. Лакин Г.Ф. Биометрия. М. Изд. 4-е, перераб. и доп. М.: Изд-во Высшая школа, 1990. – 253 с.

27. Sun Y., Yin T., Chen X.H., Jiang J.H., Zhang G., Curtis R.B., Lu Z.H. In vitro antitumor activity and structure characterization of ethanol extracts from wild and cultivated chaga medicinal mushroom, *Inonotus obliquus* (Pers.:Fr.) Pilát (Aphyllophoromycetidae) // *International Journal Of Medicinal Mushrooms*, 2011. – V.13. – N 2. – P. 121-130.

28. Т.А.Косогова, Автореферат Штаммы базидиальных грибов юга западной сибире- перспективные продуценты биологически активных препаратов. Кольцово 2013.

29. Рабинович М. Л., Болобова А. В. Древесина и разрушающие ее грибы. В кн.: Теоретические основы биотехнологии древесных композитов. М.: Наука, 2001. - С. 193-237.

30. Лыков Ю. С. Влияние модификации лигноцеллюлозного субстрата на рост и развитие ксилотрофных базидиомицетов. Автореф. дисс. канд.биол.наук. – Москва, 2011. – 23 с.

31. Захарчук Л. М., Татаринова Я. Ю. Образование и направленный синтез антибиотиков-актиномицинов. В кн.: Практикум по микробиологии / Под ред. А. И. Нетрусова. — М.: Издательский центр «Академия», 2005. - С.354-359.

32. Соломко Э.Ф. Пищевая ценность и лекарственные свойства культивируемых базидиальных макромицетов. В сб.: Биологические особенности лекарственных макромицетов в культуре. – Киев: Альтерпрес, 2011. – С. 5-82.

33. Н.Л.Маттисон, Н.Н.Фалина, Г.Г.Пасскель Академия наук СССР Продукты биосинтеза высших грибов и их использование. Издательство «Наука» Москва-Ленинград 1966. 136 с.

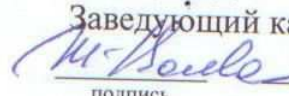
34. Шариков А.М. Гриб чага *Inonotus obliquus* Pilat: Антибиотическая активность метаболитов // Современные наукоемкие технологии. 2010, № 8. - С. 176.

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой



подпись

Т. Г. Волова  
инициалы, фамилия

« 18 »

июня

2018г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 – Биология

«Поверхностное жидкофазное культивирование и  
биологическая активность трютовика скошенного *Inonotus obliquus* (Fr.)  
Pilát.»

Руководитель

  
подпись, дата

к.б.н., доцент  
должность, ученая степень

Афанасова Е.Н.  
инициалы, фамилия

Консультант

  
подпись, дата

к.б.н., с.н.с.  
должность, ученая степень

Пашенова Н.В.  
инициалы, фамилия

Выпускник

  
подпись, дата

ДЫВДЫК Ю.Н.  
инициалы, фамилия

Красноярск 2018