

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

Оценка антибактериальной и фитостимулирующей
активности продукта культивирования трутовика скошенного *Inonotus*
obliquus (Fr.) Pilát. на березовых опилках

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

Красноярск 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4-5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
1. 1. <i>Inonotus obliquus</i> и его биологически активные метаболиты.....	6-9
1.2. Твердофазное культивирование базидиомицетов на сыпучих субстратах.....	9-13
1.3. Вегетативный мицелий <i>I. obliquus</i> как продуцент биологически активных веществ	13-15
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	15
2.1. Объект исследования.....	15
2.2. Среды и субстраты, используемые в работе.....	16-17
2.3. Культивирование грибов и бактерий.....	17-19
2.4. Приготовление гомогенатов, водных и спиртовых экстрактов.....	19-20
2.5. Проверка антибактериальной активности.....	20-21
2.6. Проверка эффективности стимуляции трутовиком скошенным на проращение семян сосны.....	21-23
2.7. Статистическая обработка данных.....	23
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	24
3.1. Культивирование на агаровых средах.....	24
3.1.1. Рост на агаризованных средах.....	24-25
3.1.2. Особенности морфологии мицелия трутовика скошенного на разных средах.....	25-27
3.2. Твердофазное культивирование трутовика скошенного на опилочном субстрате.....	27
3.2.1. Колонизация сыпучего субстрата мицелием <i>I. obliquus</i>	27-30
3.2.2. Оценка активности зернового инокулюма.....	30-33
3.3. Проверка антибактериальной активности <i>Inonotus obliquus</i> в отношении условно-патогенных бактерий <i>M. luteus</i> и <i>K. pneumoniae</i> ...	33-35
3.4. Воздействие водных экстрактов из продуктов твердофазного культивирования мицелия <i>I. obliquus</i> на проращение семян сосны.....	36-39
ВЫВОДЫ.....	40
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	41-46

ВВЕДЕНИЕ

Inonotus obliquus (Fr.) Pilat – трутовик скошенный - дереворазрушающий гриб, развивающийся на ослабленных березах. Он широко известен из-за своей способности образовывать на стволах растения-хозяина стерильные склероции - желвакообразные наросты, называемые «чагой» и содержащие вещества с противоопухолевой активностью. Медицинская значимость обуславливает значительный интерес к этому грибу исследователей и практиков [3].

Одним из проявлений этого интереса являются разработки технологий по искусственному выращиванию этого гриба в контролируемых условиях. Биотехнологическое производство лекарственных веществ трутовика скошенного обусловлено многими причинами: запасы чаги в природе ограничены, и усиленный сбор может привести к полному истощению ресурса, собранная в природе чага значительно варьирует по химическому составу в зависимости от условий произрастания, на качестве и безопасности собираемых склероциев может сказаться химическое и радиологическое загрязнение окружающей среды [1,3]. За рубежом уже предложены схемы твердофазного культивирования этого гриба на блоках измельченного растительного сырья (в том числе, опилках). Цель таких разработок – получение плодовых тел и склероциев [53].

Несмотря на то, что работы с культурами данного гриба ведутся с прошлого века, сведения о его биологической активности до сих пор ограничены характеристикой онкопротекторных и антиоксидантных веществ. Хотя, основываясь на принадлежности *I. obliquus* к экологической группе грибов-ксилотрофов, можно ожидать, что спектр продуцируемых им биологически активных веществ намного шире и может включать витамины, антибиотики, пигменты, стимуляторы роста растений и пр., которые постепенно привлекают интерес исследователей. В последние годы

появились работы по меланиногенезу у *I. obliquus*, бактериостатической и противовирусной активности [30,37,38,44].

Целью нашей работы было исследование роста мицелия *I. obliquus* на сыпучем опилочном субстрате и проверка влияния водных экстрактов из продуктов культивирования на рост условно-патогенных бактерий и прорастание семян сосны.

В задачи исследования входило:

1) Изучить рост мицелия трутовика скошенного на субстрате из березовых опилок.

2) Исследовать воздействие водного экстракта мицелиально-субстратной массы (МСМ) трутовика скошенного на рост условно-патогенных бактерий.

3) Оценить влияние водного экстракта из продукта твердофазного культивирования трутовика скошенного на прорастание семян сосны в лабораторных условиях.

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

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. 1. *Inonotus obliquus* и его биологически активные метаболиты

I. obliquus — трутовик скошенный, стерильная форма этого гриба именуется чагой. Развивается на стволах живых деревьев в виде неправильных желвакообразных наростов, достигающих 5—40 см в диаметре. Поверхность нароста черная, глубоко растрескивающаяся, внутренняя его часть темно-коричневая, ближе к древесине — рыже-бурая с белыми прожилками, состоящими из бесцветных гиф. Коричнево-бурая окраска возникает вследствие пигментации коричнево-бурых гиф с утолщенными стенками, составляющими основную массу чаги. Рост чаги при благоприятных для ее развития условиях может продолжаться 10—15 лет и дольше [36].

После отмирания дерева развитие трутовика скошенного практически прекращается, но на противоположной стороне ствола, как правило, появляется плодовое тело гриба буро-коричневой окраски, распростертое по субстрату и простирающееся по длине ствола на 0,5—1 м. Плодовое тело первоначально развивается под корой; причем по его краю образуется так называемые упорные пластинки, представляющие собой гребневидные выросты с уплощенной верхней частью. Когда заканчивается созревание плодового тела и начинается процесс споруляции, кора дерева под давлением упорных пластинок растрескивается и отстает, обнажая гименофор [36,51].

Под микроскопом гифы плодового тела аналогичны гифам стерильного нароста «чаги». В плодовом теле гифы располагаются параллельно субстрату (древесине), в упорных пластинках—перпендикулярно. В гимении, кроме базидий, имеются многочисленные грушевидные или почти конические, рыже-бурые щетинки и тонкие, бесцветные, парафизоидные гифы, развивающиеся одиночно или небольшими пучками. Споры, как правило, обильные, толстостенные, почти бесцветные, позднее бледно-желтовато-

рыжеватые, от эллипсоидальных до широко эллипсоидальных, часто с одной или несколькими каплями масла внутри [24].

Трутовик скошенный вызывает в древесине белую, активно развивающуюся гниль и, значит, является лигнин разрушающим грибом. Древесина во многих местах пронизана гифами мицелия и черными зонами, отграничивающими отдельные участки гниения. К моменту образования плодовых тел обычно бывает поражена уже большая часть ствола. Старые плодовые тела темнеют и растрескиваются на призматические участки, отпадающие от субстрата [6,24,36].

I. obliquus поражает преимущественно старую или приспевающую березу. На молодых деревьях, лучше сопротивляющихся внешним вредным воздействиям, он встречается реже. Наилучшими хозяевами гриба являются *Betula pendula* Roth и *Betula pubescens* Ehrh. Иногда развивается также на ольхе, значительно реже на рябине, клене, буке, вязе. Трутовик скошенный поражает только стволы живых деревьев [6,24].

В наростах трутовика скошенного содержится до 12, 3% золы, в состав которой входят окислы SiO_2 , Fe_2O_3 , Al_2O_3 , CaO , MgO , Na_2O , K_2O , ZnO , CuO , Mn_2O_3 [45,46,50]. Кроме того, в них обнаружены кислоты: щавелевая, муравьиная, уксусная, масляная, ванилиновая, параоксибензойная, две тритерпеновые кислоты из группы тетрациклических тритерпенов, обликвиновая, инонотовая и др., а также — свободные фенолы, полисахарид, птерины, лигнин, клетчатка, стеринны — эргостерол, ланостерол, инотодиол [47,48,49,53].

Основными биологически активными веществами *I. obliquus* считаются водорастворимые, интенсивно окрашенные хромогены, образовавшиеся из комплекса химически активных фенольных альдегидов, полифенолов, оксифенол-карбоновых кислот и их хинонов. Из хромогенного комплекса выделяются также гуминоподобные вещества, продуктами разложения которых являются глюкоза, галактоза и ксилоза [48]. Все углеводные соединения генетически связаны с оксиароматическими предшественниками

биосинтеза дубильных веществ березовой коры и лигнина древесины березы [19,48,50].

Птерины трутовика скошенного обуславливают ее цитостатическое действие. Они усиливают цитостатическую активность противоопухолевых препаратов, задерживают рост опухолей, вызывают их постепенную регрессию и замедляют развитие метастазов. При этом значительно улучшается самочувствие больных, восстанавливается их работоспособность и повышается общий тонус [5,8].

Хромогенный полифенолкарбоновый комплекс проявляет противоопухолевую активность, обусловленную тем, что фенольные соединения регулируют активность цитоплазматических и митохондриальных АТФ-аз и понижают образование АДФ, а так как раковые клетки в большей степени, чем нормальные, зависят от гликолиза, то нарушение этого процесса негативно отражается на их развитии [34].

Кроме того, препараты *I. obliquus* обладают спазмолитическими, мочегонными, антимикробными, репаративными свойствами, нормализуют деятельность желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и кишечную микрофлору, способствуют рубцеванию язв желудка и двенадцатиперстной кишки, проявляют выраженные гастропротективные свойства [39].

При наружном использовании гриб проявляет противовоспалительное, заживляющее и обезболивающее действие, защищает кожу от вредного воздействия внешней среды, в том числе от грибковых и вирусных инфекций, снимает отеки и способствует восстановлению здорового состояния кожи [40,41].

Преимущество препаратов *I. obliquus* перед другими химиотерапевтическими препаратами заключается в отсутствии токсичности и хорошей переносимости [18].

Препараты трутовика скошенного, представленные в официальной фармакологии и народной медицине, имеют, главным образом, природное происхождение. Однако, получать лекарственные препараты из природного

материала не всегда экономически выгодно и в некоторых случаях опасно, т.к. чага может содержать в себе вредные компоненты (если произрастает недалеко от проезжей части, промышленных производств и проч.). Кроме того, по мнению некоторых авторов, запасы природной чаги сокращаются слишком быстро, хотя это и возобновляемый ресурс [9]. Уже несколько десятилетий отмечается научный интерес к искусственному выращиванию культур этого гриба выделенных из материала, собранного в природных условиях (склероциев (наростов) чаги, собранных со стволов, гниющей под воздействием гриба, древесины). Искусственное выращивание позволяет контролировать условия роста, добиться нужного качества сырья и получить желаемые метаболиты. Показано, что выращенный искусственно мицелий базидиальных грибов, практически ничем не отличается от их плодовых тел, собираемых в природе [18]. Много внимания в настоящее время уделяется вопросам культивирования мицелия, искусственного получения плодовых тел и выделения биологически активных веществ лекарственных ксилотрофных грибов, широко известным представителем которых является трутовик скошенный [3,9,53].

1.2. Твердофазное культивирование базидиомицетов на сыпучих субстратах

Во второй половине прошлого века было показано, что мицелий высших базидиальных грибов можно выращивать искусственно, подобно бактериям и микроскопическим грибам, с целью получения биомассы кормового или пищевого назначения и биологически активных веществ [32,35].

Дереворазрушающие грибы (ксилотрофы) являются оптимальным объектом биотехнологических разработок из-за отсутствия специфических потребностей к составу культивационных сред и условий выращивания. Вслед за разработкой методик получения плодовых тел таких съедобных ксилотрофов начали разрабатывать методы получения их биомассы для пищевых и кормовых целей [9,21].

Культивирование мицелия грибов с целью получения желаемых метаболитов предполагает: наличие высокопродуктивной культуры; определение условий, необходимых для роста грибов и проявления их биосинтетической способности; подготовку стандартного посевного материала; выбор необходимых условий проведения ферментации, подготовку и стерилизацию питательных сред [13,29].

Рост грибов и проявление их биохимической активности происходит при определенных условиях: наличии источников питания, микроэлементов, стимуляторов роста, оптимальной температуры, влажности, степени аэрации, света и других факторов [4,15].

Выбор подходящей для гриба среды требует большой осторожности, так как один и тот же гриб для своего роста и накопления требуемого метаболита часто нуждается в различных средах [4,13,15,29].

В полупромышленных и промышленных масштабах грибной мицелий культивируют на жидких средах жидкофазное культивирование - и измельченных твердых (сыпучих) субстратах – твердофазное культивирование [22,26].

Твердофазное культивирование – это биотехнологический процесс, который протекает в массе измельченного и влажного твердого субстрата. Субстрат может иметь различную форму и размеры частиц. Он должен содержать доступные питательные вещества для роста микроорганизмов: целлюлозу, крахмал, сахара в качестве источников углерода, аммиак, мочевины, белки в качестве источников азота, минеральные соли. Субстрат может использоваться грибом полностью или частично. Независимо от варианта твердофазного культивирования субстрат не должен быть обделенным влажностью. Влага может пропитывать или образовывать пленку на его поверхности. Водные пленки могут быть различными в зависимости от свойств субстрата и потребностей используемого

продуцента, и, следовательно, соотношение объемов твердой, водной и воздушной фаз может варьировать [25,32].

В настоящее время известны несколько технологических вариантов твердофазной ферментации, направленных на промышленное получение синтезируемых микроорганизмами ферментов, биологически активных веществ, антибиотиков и обогащенных белком кормовых препаратов. Существуют следующие технологические варианты твердофазной ферментации: твердофазная ферментация в перемешиваемом слое; твердофазная ферментация в аэрируемом слое; перемешиваемая глубинная твердофазная ферментация; псевдожидкая культура; поверхностная твердофазная ферментация в «тонком слое». Последний вариант твердофазной ферментации относится к самому простому. Он исключает принудительную аэрацию массы субстрата или его перемешивание. В качестве микроорганизмов-продуцентов в поверхностной твердофазной ферментации, как правило, используют грибы. Их развитие происходит в тонком (3–5 см) поверхностном слое субстрата. Этот метод ферментации применяется в развитых странах для биосинтеза различных ферментов, которые затем экстрагируются из водной фазы [22,25].

Преимуществами твердофазного культивирования перед жидкофазным можно считать следующие: 1) отдельные микробиологические процессы протекают в условиях твердофазной ферментации намного интенсивнее, чем в погруженной культуре; 2) твердофазные процессы являются в меньшей степени энергоемки, трудоемки и материалоемки; 3) из-за низкого содержания воды в ферментируемой массе при твердофазном культивировании более рационально используется рабочее пространство; 4) более низкая стоимость при извлечении и высушивании конечного продукта; 5) условия, более приближенные к естественным для роста дереворазрушающих грибов [22,25,26,32].

Твердофазное культивирование дереворазрушающих грибов широко рекомендуется для биоконверсии растительных лигно-целлюлозных

субстратов, представляющих отходы сельского хозяйства и деревообрабатывающей промышленности. Проблема утилизации этих отходов в настоящее время является важной экологической задачей [22].

Одним из способов утилизации лигноцеллюлозных отходов деревообрабатывающей промышленности и садоводства является использование их в качестве субстратов при производстве плодовых тел базидиомицетов, относящихся к ксилотрофам. Ксилотрофы – это грибы, обладающие активными полиферментными системами и составляющие важное звено биологического распада органического вещества в природе. Они являются агентами биоконверсии таких сложных растительных субстратов, как солома злаковых, гидролизный лигнин, отходы деревоперерабатывающей промышленности и т.п. Использование этих биологических агентов в утилизации отходов производств решает проблему экологически чистых технологий и позволяет решать некоторые медико-биологические проблемы [32].

Растительные остатки, используемые для твердофазного культивирования грибов-ксилотрофов, являются источником питания для многих грибов и имеют сложный состав. Основные вещества растительной ткани представлены углеводной, ароматической и экстрактивной частями. В углеводную часть, которая составляет 70-80%, входят в основном полисахариды: целлюлоза – 30-59% и гемицеллюлоза – 12-36%. Ароматическая часть, составляющая 15-36% растительной ткани, представлена лигнином. Экстрактные вещества имеют сложный состав. В них входят эфирные масла, дубильные вещества, воска и т.д., содержание которых колеблется от 0,05% до 10% [32,47].

Основные компоненты растительной ткани лигнин и целлюлоза образуют природный комплекс – лигноцеллюлозу, где они структурно и химически прочно связаны между собой, что сильно затрудняет процесс утилизации растительного материала. Лигнин защищает полиглюкан от воздействия ферментов, поэтому для успешного использования полимерной целлюлозы

необходимо, прежде всего, удалить гемицеллюлозы, далее разрушить комплекс лигнина с целлюлозой, затем кристаллическую структуру самой целлюлозы. Разрушение лигноцеллюлозного комплекса происходит двумя путями: прямой и непрямой биоконверсией. Прямая биоконверсия – разрушение субстратов происходит только биологическим путем с участием ферментных систем различных организмов. Непрямая биоконверсия – при разрушении субстратов используются физические, химические и биологические методы [46,47,48].

При ТФК мицелий плотно срастается с частицами субстрата и практически невозможно количественно отделить его от неиспользованных частиц среды. При этом рост мицелия грибов на частицах субстрата может происходить за счет использования легко гидролизуемой части целлюлозы и не затрагивать лигноцеллюлозный комплекс [25].

При ТФК большое значение имеет физическое состояние субстрата, а именно: влажность, и размер частиц. Оптимальная влажность субстрата, на котором производится выращивание мицелия грибов, находится в интервале 60-65% [29].

Продуктами культивирования грибов-ксилотрофов на лигноцеллюлозных являются: субстратно-мицелиальная масса, которая может быть использована в качестве кормового продукта в животноводстве, органического удобрения, для производства плодовых тел съедобных грибов, для выделения биологически активных веществ [22,25,32].

Возможность культивирования трутовика скошенного на сыпучих лигноцеллюлозных субстратах уже доказана. В литературе описано искусственное выращивание этого гриба на субстратах, помещенных в пластиковые пакеты, при этом урожай плодовых тел и склероциев составлял 18,24 г/1 пакет и 6,17 г/1 пакет, соответственно. Результаты газовой хроматографии – масс-спектрологии показали сходство компонентов в образцах, полученных в лаборатории и собранных в природе. Главными

компонентами в обоих случаях были инотодиол, ланостерол и эргостерол [53].

1.3. Вегетативный мицелий *I. obliquus* как продуцент биологически активных веществ

Несомненно, чага является ценным и интересным объектом культивирования, но для успешного выращивания необходимо знать культурально-морфологические и биохимические свойства вегетативного мицелия. Интересен тот факт, что у многих базидиомицетов биохимический состав плодовых тел и грибницы сходен. Можно предположить, что при культивировании трутовика скошенного мицелий является источником лекарственных веществ и вовсе необязательно получать стерильные наросты с этой целью [43,44].

Несмотря на длительное изучение трутовика скошенного и использование его в официальной и народной медицине, интерес к этому грибу не ослабевает. За последние годы появились новые работы как в России, так и за рубежом [2,3,53].

За все время исследования *I. obliquus* было обнаружено множество соединений различной химической природы в грибе: аминокислоты, полипептиды, стерины, ароматические и жирные кислоты, простые и сложные сахара, тритерпеноиды, полифенолы [12,33,46].

Препараты из трутовика скошенного применяют как неспецифическое лекарственное средство для лечения гастритов, язвы желудка (антибактериальное действие) [43], полипозов, предраковых заболеваний и некоторых форм злокачественных опухолей, в том числе рака IV стадии (противоопухолевое действие) [8,34], а так же против простого герпеса 2 типа, ретровирусов (антивирусное действие) [37,38]. В 2004 году были проведены исследования, в которых было показано, что культуральная жидкость штамма *I. obliquus* может ингибировать рост возбудителя

туляремии - *Francisella tularensis* (McCoy, Chapin) Dorofe'ev и бактерии *Mycobacterium smegmatis* (Trevisan) Lehmann, Neumann [43,44].

Исследование биосинтетической активности продолжается и сегодня. В первую очередь обращают внимание на химический состав гриба, который способен изменяться, и на химические соединения, спектр которых все шире и шире и зависит от биологических и физико-химических особенностей объекта исследования, характера экстракции и используемых физико-химических методов анализа [3].

При исследовании природного материала гриба было выявлено, что на биологическую активность и на состав могут влиять особенности взаимоотношений с березой, на которой растет трутовик скошенный, и мицелий других конкурентов. Работы, проведенные в лабораторных условиях также показали, что биосинтетической активностью *I. obliquus* можно управлять с помощью химического состава среды или субстрата, температуры культивирования, воздействия света с определенной длиной волны, совместный рост с другими организмами и др. внешними факторами. Цель современного исследования - разработка условий культивирования, позволяющая получать большой урожай требуемого продукта с заданными свойствами [1,22,30,31].

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объект исследования

В работе использовали два штамма трутовика скошенного: сибирский (Ch 3) и японский (Io). Систематическое положение трутовика скошенного [10]:

Царство *Fungi*

Отдел *Basidiomycota*

П/отдел *Agaricomycotina*

Класс *Agaricomycetes*

Порядок *Hymenochaetales*

Семейство *Hymenochaetaceae*

Род *Inonotus*

Вид *Inonotus obliquus* (Fr.) Pilat.

Сибирская культура (Ch 3) была изолирована из нароста чаги на березе, собранного в окрестностях г. Красноярска (2004 г.), и японская культура (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 оценки антибактериальной активности были использованы культуры условно-патогенных бактерий: *Klebsiella pneumoniae* (Sch.) Trevisan и *Micrococcus luteus* (Sch.) Cohn из рабочей коллекции Института леса.

Систематическое положение *K. pneumoniae*: *Bacteria*; *Negibacteria*; *Proteobacteria*; *Gammaproteobacteria*; *Enterobacteriales*; *Enterobacteriaceae*; *Klebsiella*; *Klebsiella pneumonia* [17].

Систематическое положение *M. luteus*: *Bacteria*; *Actinobacteria*; *Actinobacteria*; *Actinomycetales*; *Micrococcaceae*; *Micrococcus*; *Micrococcus luteus* [17].

Для оценки эффективности прорастания семян и стимуляции роста были использованы семена *Pinus sylvestris* L. Систематическое положение: *P. sylvestris*; *Plantae*; *Viridiplantae*; *Streptophyta*; *Embryophyta*; *Tracheophyta*; *Spermatophytina*; *Pinidae*; *Pinales*; *Pinaceae*; *Pinus*; *Pinus sylvestris* [17].

2.2. Среды и субстраты, используемые в работе

Для исследования культурально-морфологических свойств штаммов были использованы следующие питательные среды для культивирования грибов: глюкозо-пептонный агар (ГПА) (по Фалиной [26]): пептон – 3 г; глюкоза – 10 г; KH_2PO_4 – 0,6 г; K_2HPO_4 – 0,4 г; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,0 г; вода – 1 л; крахмал-аммиачный агар, который был модифицирован нами и приготовлен на солевой основе среды Норкранс [23] (НКА): крахмал – 10 г; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2 г; KH_2PO_4 – 0,6 г; K_2HPO_4 – 0,4 г; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,0 г; вода – 1 л; агаризованное неохмеленное пивное сусло (СА) (3,4 градуса по Баллингу).

Для выращивания бактериальных культур и проверки антибактериальной активности экзометаболитов *I. obliquus* использовали мясо-пептонный бульон и агар (МПА) (пептон – 10 г; NaCl – 5 г; мясной бульон – 1 л, агар – 15 г) и мясо-пептонный-сусло-агар (МСА) (сусло-агар : мясо-пептонный агар (1 : 1)).

Для приготовления сред использовали водопроводную воду, как источник микроэлементов. Агар (Helicon, РФ) добавляли к средам из расчета 15 г/л.

Все питательные среды автоклавировали при 1 атм., 30 мин, кроме ГПА (0,5 атм., 30 минут). рН сред доводили перед автоклавированием до уровня 7,0.

Для твердофазного культивирования мицелия трутовика скошенного использовали субстрат на основе березовых опилок. Для увлажнения опилок готовили пропитку, состоящую из 1 части водного экстракта чистотела и 2 частей неохмеленного пивного сусла, разбавленного в 10 раз. 175 г сухих опилок заливали 600 мл жидкости (соотношение – 1 : 3,5). Для лучшего увлажнения опилок, смесь прогревали на плитке при 1000 С, помешивая, в течение 15 мин. Влажный субстрат распределяли по чашкам Петри (около 45

г влажного субстрата/1 чашка) и стерилизовали в автоклаве при 1 атм, 30 мин. Экстракт чистотела был введен в среду, поскольку в литературе имеются сведения о том, что он стимулирует рост дереворазрушающих грибов-ксилотрофов [28].

При сравнительной оценке зернового и агарового инокулюма также использовали опилочный субстрат, который увлажняли сушлом, разбавленным в 20 раз водопроводной водой, без добавок.

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

Культуры условно-патогенных бактерий выращивали на среде МПА при 24⁰С в течение 3 суток, после чего использовали для приготовления водных суспензий с произвольным титром.

При культивировании грибов использовали два вида инокулюма: агаровый и зерновой инокулюмы. Для получения агарового инокулюма культуры грибов выращивали на среде СА в течение 14 дней. Для получения зернового инокулюма колбы с зерновым субстратом, приготовленным, как описано выше, засевали блоками с мицелием *I. obliquus*: 3 блока/колба. Колбы помещали в термостат при 24⁰С и культивировали в течение 30 суток, встряхивая энергично колбы на 8, 20 и 26 сутки роста для перемешивания зерна, аэрации и сохранения сыпучести. На 30 сутки колбы без встряхивания помещали в холодильник на неделю. Непосредственно перед засевом сред и

субстратов в экспериментах колбы из холодильника снова энергично встряхивали, что позволяло дозировать сыпучий инокулюм.

Для получения зернового инокулюма колбы с зерновым субстратом, приготовленным, как описано выше, заседали блоками с мицелием *I. obliquus*: 3 блока/колба. Колбы помещали в термостат при 24⁰С и культивировали в течение 30 суток, встряхивая энергично колбы на 8, 20 и 26 сутки роста для перемешивания зерна, аэрации и сохранения сыпучести. На 30 сутки колбы без встряхивания помещали в холодильник на неделю. Непосредственно перед засевом сред и субстратов в экспериментах колбы из холодильника снова энергично встряхивали, что позволяло дозировать сыпучий инокулюм.

Агаровые блоки (диаметр 9 мм), вырезанные при помощи стерильного пробочного сверла из края колоний, использовали как инокуляционный материал в экспериментах. В каждую чашку помещали по одному блоку. Зерновой инокулюм вносили в чашки Петри с агаровой средой и опилочным субстратом в количестве 4-5 зерновок, что по объему приблизительно было равно 1 агаровому блоку. Посевы производили в центр чашки Петри с агаровой средой или опилочным субстратом.

Культивирование грибов осуществляли в термостате при температуре 24⁰С. Для оценки скорости роста штаммов трутовика скошенного измеряли диаметры колоний на 7, 14 и 21 сутки. Диаметры измеряли в двух направлениях, под прямым углом друг к другу. Среднее из двух измерений учитывалось, как диаметр колонии на соответствующем сроке культивирования. Для исследования ростового коэффициента трутовика скошенного были проведены замеры высоты колонии и оценивалась в баллах плотность мицелия [9].

По данным замера диаметров рассчитывали скорость роста по формуле:

$$CP = (d2 - d1)/2 * n \text{ (мм/сут);}$$

где $d1$ и $d2$ – диаметры колоний, измеренные в начале и в конце некоторого промежутка времени (мм); n – количество времени (сут.), прошедшее между первым и вторым замерами диаметров.

Ростовой коэффициент рассчитывался по скорости роста по формуле:

$$PK = \frac{dhg}{t};$$

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

Описание морфологии колоний и микроскопические исследования выполняли на 14 и 21 сутки роста. Препараты для микроскопических исследований – «раздавленная капля» – готовили с использованием водно-спиртово-глицериновой (1:1:1) [13].

Микроморфологические особенности исследовали с помощью микроскопа МикМед 2, снабженного фазово-контрастной системой КФ-4М (производство ЛОМО, РФ). Готовый препарат просматривали на микроскопе, отмечая толщину гиф их тип ветвления. Для каждого сочетания «штамм – среда» были проведены замеры толщины гиф в 30 повторностях. Для фотографирования использовали фотокамеру, связанную программным обеспечением с компьютером. Данное ПО позволяло проводить измерение микроскопических структур с высокой точностью.

Твердофазное культивирование штаммов *I. obliquus* продолжалось в течение 60 суток. В качестве контроля вместе с засеянными чашками инкубировали стерильный субстрат. Диаметры развивающихся колоний грибов измеряли на 7, 14 и 21 сутки для расчета показателей СР.

Микроморфологические особенности мицелия в условиях ТФК исследовали на 7 и 14 сутки. По окончании культивирования для исходного субстрата и продуктов культивирования, представляющих субстратно-мицелиальную массу (СМС), определяли влажность по убыли веса в процессе сушки и рН. При определении рН водные вытяжки из расчета 1г субстрата или СМС/10мл дистиллированной воды. Смесь настаивали час при

комнатной температуре, отфильтровывали через технический капрон и измеряли рН. Остаток СМС сушили и использовали для приготовления гомогенатов, водных и спиртовых экстрактов.

2.4. Приготовление гомогенатов, водных и спиртовых экстрактов

Для приготовления гомогената небольшое количество исходного субстрата или опилочно-мицелиальной массы (0,5 – 0,6 г по а.с.в.) помещали в стерильную ступку и растирали с 2 мл стерильной воды.

Приготовление спиртовых экстрактов происходило следующим образом: высушенную СМС тщательно растирали в ступке с кварцевым порошком (стеклом). В пластиковые стерильные пробирки Эппендорфа (объем 2 мл) помещали по 100 мг измельченного продукта. К навескам добавляли по 1 мл этанола (96%) (соотношение 1:10). Пробирки закрывали, тщательно встряхивали и помещали для настаивания при комнатной температуре на 4 суток.

При изготовлении водных экстрактов кроме исходного субстрата, и СМС, в качестве дополнительного контроля, использовали аптечный препарат чаги. Доведенный до воздушно-сухого веса материал механически измельчали до порошкообразного состояния. Полученные порошки заливали кипящей водой (100⁰С): на 1 весовую часть вещества 10 объемных частей воды. Полученные суспензии перемешивали, закрывали фольгой и настаивали в течение 1 часа при постоянной температуре 24⁰С. После чего отфильтровывали осадок через фильтровальную бумагу. Полученные фильтраты были использованы для дальнейшей работы.

При исследовании на антибактериальную активность дополнительно были приготовлены концентраты водных экстрактов из исходного субстрата и СМС. Для этого часть полученного фильтрата упаривали в токе теплого воздуха до консистенции сиропа.

2.5. Проверка антибактериальной активности

В предварительном эксперименте были проверены взаимоотношения трутовика скошенного и бактерий *M. luteus* и *K. pneumoniae* при прямом контакте. Для этого в центр чашки на агаровую пластинку МСА был помещен инокуляционный блок с мицелием *I. obliquus*. Через 7 суток роста при 240С методом «штриха» были подсеяны культуры условно-патогенных бактерий: *M. luteus* и *K. pneumoniae*, таким образом, что в чашке Петри были представлены оба вида бактерий. Учет взаимоотношений проводили на 4, 7 и 14 сутки роста, описывая качественные проявления взаимодействия грибных и бактериальных культур.

Антибактериальную активность гомогената, спиртовых и водных экстрактов СМС проверяли методом лунок (Ссылка). В пластинках МПА стерильно пробочным сверлом вырезали 4 лунки (диаметр – 6 мм). В каждую лунку вносили по 100 мкл жидкости. Чашки с заполненными лунками помещали на сутки в термостат для диффузии экзометаболитов в агаровую пластинку. После чего чашки засеивали исследуемыми бактериальными культурами - *M. luteus* и *K. pneumoniae*. Для этого водную суспензию бактерий с произвольным титром вносили по 0,1 мл в подготовленные чашки и растирали шпателем. На 3 и 7 сутки отмечали наличие или отсутствие зон роста бактерий вокруг блоков.

При проверке концентратов водных экстрактов исходного субстрата и СМС их наносили в виде капли на пластинку МПА в количестве около 200 мкл. Чашки выдерживали сутки при 240С для диффузии веществ в агар. После этого методом «штриха» подсеивали культуры используемых бактерий.

2.6. Проверка эффективности стимуляции трутовиком скошенным на прорастание семян сосны

Для эксперимента использовали семена сосны обыкновенной, получены от Лесосеменной станции Красноярского края. Семена были собраны в декабре 2013 года в АУГХ «Ширалессервис».

Семена в количестве 50 штук помещали в маркированные марлевые мешочки. Перед работой семена протравливали препаратом «Максим» (ООО «Сингента») для предупреждения развития плесневых и фитопатогенных грибов на поверхности семян. Рабочий раствор содержал 4 мл препарата в 1 л водопроводной воды, концентрация действующего вещества – фунгицида флудиоксонила – 25 г/л. Мешочки с семенами замачивали в водный раствор препарата (из расчета 24 мешочка / 300 мл раствора) на 30 минут. После протравливания мешочки, не промывая, выкладывали на фильтровальную бумагу и оставляли на 1 час для удаления избытка раствора препарата [11,27].

Протравленные и обсушенные семена подвергали обработке следующих жидкостей:

- 1) стерильная вода (контроль Кв);
- 2) водный экстракт опилочного субстрата (контроль Коп);
- 3) водный экстракт чаги (контроль Кч);
- 4) водный экстракт продукта твердофазного культивирования сибирского изолята трутовика скошенного Ch 3 на опилочном субстрате (опыт Ом).

Дополнительно было исследовано влияние замачивания на прорастание семян, не прошедших поверхностное обеззараживание. Для этого семена, необработанные препаратом «Максим» помещали в:

- 1) стерильную воду (контроль НКв);
- 2) водный экстракт продукта твердофазного культивирования сибирского изолята трутовика скошенного Ch 3 на опилочном субстрате (опыт Ом).

Во всех вариантах по 3 марлевых мешочка с семенами помещали в указанные/упомянутые выше жидкости, объемом - 40 мл. Настаивание/обработка/замачивание длилось 24 часа при температуре 17 – 19⁰С. После этого марлевые мешочки с семенами помещали на фильтровальную бумагу, чтобы удалить избыток влаги [11,27].

Семена раскладывали в стерильные влажные камеры, приготовленные из чашек Петри (диаметр – 9 см) и фильтровальной бумаги, 50 семян/чашка.

Проращение семян сосны оценивали согласно ГОСТ 13056.6-97 «Семена деревьев и кустарников» и рассматривали на двух этапах: 1) спустя 7 дней после раскладки семян (энергия проращивания) и 2) спустя 14 дней после раскладки (техническая всхожесть). Энергия проращивания – это способность семян быстро и одновременно прорасти:

$$\mathcal{E} = n/N * 100\%;$$

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:

$$B = \frac{n}{N} * 100\%;$$

где n – число проросших семян, шт.; N – число семян, взятых для проращивания, шт.

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

2.7. 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 2016 и Statistica 8. Статистическая обработка результатов проводилась с помощью стандартного Достоверность различий (при $P \leq 0,05$) оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни, а также по критерию Стьюдента (при значениях >30) [20].

РЕЗУЛЬТАТЫ

[Изъято 16 страниц]

ВЫВОДЫ

- 1) Выполненные исследования показали, что, по сравнению с водной пропиткой, увлажнение березовых опилок разбавленным сушлом с экстрактом чистотела ускоряло колонизацию субстрата в 1,7-1,9 раз и обеспечивало развитие обильного мицелия трутовика скошенного. Показана возможность использования зернового инокулюма для твердофазного культивирования трутовика скошенного на опилочных субстратах. При этом только зерновой инокулюм обеспечивал колонизацию «бедного» субстрата с низким содержанием стартовых питательных веществ.
- 2) Выполненные исследования не выявили антибактериальную активность водных экстрактов из продуктов твердофазного культивирования трутовика скошенного в отношении условно-патогенных бактерий *Micrococcus luteus* и *Klebsiella pneumoniae*. Очень слабое ингибирование роста бактерий проявил только концентрированный (упаренный до сиропообразного состояния) водный экстракт из продукта культивирования японского штамма Ю на опилочном субстрате.
- 3) Установлено, что, по сравнению с замачиванием в воде, обработка водным экстрактом из продукта твердофазного культивирования сибирского штамма Ch 3 *I. obliquus* стимулировала прорастание семян сосны и развитие сеянцев. Отмечено увеличение показателей: энергии прорастания – на 22%, средней длины сеянцев – на 8%, средний вес сеянца – на 15%.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабицкая, В.Г. Биологически активные соединения съедобных и лекарственных грибов. Биологические особенности лекарственных макромицетов в культуре. / В. Г. Бабицкая, В.В. Щерба, Т.А. Пучкова, Н.А. Бисько. – Киев: Альтерпрес, 2012. – Т.2. – с. 76-344.
2. Баландайкин, М. Э. Химическая структура и лечебные свойства чаги / М. Э. Баландайкин // Фармация : Ульяновский государственный университет, 2013. - №5. – с. 52-55.
3. Белова, Н. В. О необходимости изучения биологии и биохимической активности *Inonotus obliquus* / Н. В. Белова // Микология и фитопатология. – Москва : Федеральное государственное унитарное предприятие «Академический научно-издательский, производственно-полиграфический и книгораспространительский центр «Наука», 2014. – Т.48. – с. 401-403.
4. Билай, В. И. Методы экспериментальной микологии / В. И. Билай. – Киев : Наукова думка, 1973.
5. Блинова, К. Ф. Ботанико-фармакогностический словарь / К. Ф. Блинова, Г. П. Яковлев. - Москва : Высшая школа, 1990. - с. 272.
6. Бондарцев, А. С. Чага и некоторые наиболее распространенные трутовики на березе / А. С. Бондарцев. – Ленинград : мед. лит., 1959.
7. Бондарцева, М. А. Семейства гименохетовые, лахнокладиевые, кониофоровые, щелелистиковые / М. А. Бондарцева, Э. Х. Пармасто. - Ленинград : Наука, 1986.
8. Булатов, П. К. Чага и ее лечебное применение при раке IV стадии / П. К. Булатов, М. П. Березина, М. А Якимов. – Ленинград : Медгиз, 1959. - с. 333.
9. Бухало, А. С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре / А. С. Бухало. - Киев : Наукова думка, 1988.
10. Глобальная грибная номенклатура : содержит названия грибов (в том числе дрожжей, лишайников, хромидных грибных аналогов, простейших

- грибных аналогов и ископаемых форм) во всех рангах [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.indexfungorum.org/> (18.06.18).
11. ГОСТ 13056.6-97 Семена деревьев и кустарников. Методы определения всхожести. — Взамен ГОСТ 13056.6-75 : введен. 01.07.1998. – Москва : Издательство стандартов, 1998.
 12. Грачева, Н. В. Химическая модификация природных полимеров меланинов гриба *Inonotus obliquus* (чага) / Н. В. Грачева, В. Ф. Желтобрюхов, А. Б. Голованчиков // Известия Волгоградского государственного технического университета. – Волгоград: Волгоградский государственный технический университет, 2014. – Т.12. – с. 93-97.
 13. Егоров, Н. С. Практикум по микробиологии / Н. С. Егоров. – Москва: издательство московского университета, 1976. – с. 246-248.
 14. Жилинская, Н. В. Противомикробные свойства базидиомицетов *Fomitopsis officinalis*, *Fomitopsis pinicola*: оценка перспектив использования в технологии пищевых продуктов: диссер. / Н. В. Жилинская. – Москва, 2015.
 15. Захарчук, Л. М. Практикум по микробиологии / Л. М. Захарчук, Я. Ю. - М.: Академия, 2005. – с.354-359.
 16. Инструкция по сбору и сушке сырья чаги : сборник / Инструктивные материалы. Москва : Всес. конъюктурно-инфор. бюро Минздрава СССР, 1969.
 17. Интегрированная таксономическая информационная система : авторитетная таксономическая информация о растениях, животных, грибах и микробах Северной Америки и всего мира [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.itis.gov/> (18.06.18).
 18. Косогова, Т. А. Штаммы базидиальных грибов юга Западной Сибири – перспективные продуценты биологически активных препаратов : автореф. / Т. А. Косогова. – Кольцово, 2013.

19. Кузнецова, Г. А. Химия пигментов чаги / Г. А. Кузнецова. – Ленинград : мед. лит., 1959.
20. Лакин, Г.Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. – Москва : Высшая школа, 1990.
21. Ловягина, Е. В. Изучение кислотного состава чаги методом распределительной хроматографии на бумаге / Е. В. Ловягина, А. Н. Шиврина, Е. Г. Платонова. – Ленинград : мед. лит., 1959.
22. Лыков, Ю. С. Влияние модификации лигноцеллюлозного субстрата на рост и развитие ксилотрофных базидиомицетов: диссер. / Ю. С. Лыков. - Москва, 2011. – с. 23.
23. Маттисон, Н. Л. Продукты биосинтеза высших грибов и их использование / Н. Л. Маттисон, Н. Н. Фалина, Г. Г. Пассекель. - Москва : Наука, 1966. - с. 14.
24. Мильберг, Г. К. Чага и методы ее заготовки / Г. К. Мильберг, П. А. Якимов. – Москва : Центросоюза, 1957.
25. Минаков, Д. В. Зависимость продуктивности *Grifola frondosa* от размера частиц лигниноцеллюлозного субстрата / Д. В. Минаков, К.В. Севодина, А.И. Шадринцева, В.П. Севодин // Техника и технология пищевых производств : Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2017. – Т. 44. – с. 24-30.
26. Низковская, О. П. Рост высших грибов в глубинной культуре. Микология и фитопатология / О. П. Низковская. – Москва : Наука, 1972. - Т. 6. - с. 306-312.
27. Определение качества семян [Электронный ресурс] : Сибирский Государственный технологический университет. Кафедра лесных культур. - Омск. – Режим доступа: http://forest-culture.narod.ru/Issled_gr/lk_90/lab10.html.
28. Пашенова, Н. В. Материалы IV Всероссийской конференции «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья. Влияние отвара чистотела на биоконверсию сосновых опилок культурами базидиальных грибов-ксилотрофов» / Н. В. Пашенова, С. Р. Лоскутов, Г.

- В. Пермякова, А. А. Анискина. – Барнаул: издательство алтайского университета, 2009. – Кн. 2. – с. 39-41.
29. Пименова, М.Н. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / М. Н. Пименова, Н. Н. Гречушкина, Л. Г. Азова, А. И. Нетрусов. – Москва : МГУ, 1995.
30. Поединок, Н. Л. Световая регуляция роста и меланинообразования у *Inonotus obliquus* / Н. Л. Поединок // Экспериментальные статьи. – Киев : Biotechnologia Acta, 2013. – Т.6. – с. 115-120.
31. Поединок, Н.Л. Биотехнологические основы интенсификации культивирования съедобных и лекарственных макромицетов с помощью света низкой интенсивности: диссер. / Н. Л. Поединок. – Киев, 2015. – с. 387.
32. Решетникова, И. А. Мицелий грибов как источник кормового и пищевого белка / И. А. Решетникова. – Москва : Московский университет, 1989.
33. Сенюк, О. Ф. Anti-infective properties of the melanin – glucan complex obtained from medicinal tinder bracket mushroom, *Fomes fomentarius* / О. Ф. Сенюк, Л. Ф. Горовой, Г. В. Бекетова // International journal of medicinal mushrooms. – Xuzhou Normal University, 2011. – Т.13. – с. 7-18.
34. Сенюк, О. Ф. Современная микология в России / О. Ф. Сенюк, Л. Ф. Горовой, Л. А. Паламар, В. А. Ковалев, Н. И. Круль, П. Г. Рытик, И. И. Кучеров. – Москва, 2008. – Т.2. – с. 518-519.
35. Соломко, Э. Ф. Пищевая ценность и лекарственные свойства культивируемых базидиальных макромицетов / Э. Ф. Соломко – Киев: Альтерпрес, 2011. – с. 5-82.
36. Стороженко, В. Г. Атлас-определитель дереворазрушающих грибов лесов Русской равнины / В. Г. Стороженко, В.И. Крутов, А.В. Руоколайнен, В.М. Коткова, М.А. Бондарцева. – Москва : Товарищество научных изданий КМК, 1962.

37. Теплякова, Т. В. Современная микология в России / Т. В. Теплякова, Е. И. Казачинская, Е. И. Рябчикова, Т. А. Косогова. – Москва, 2012. – Т.3. – с. 418-419.
38. Теплякова, Т. В. Современная микология в России / Т. В. Теплякова, Н. М. Гашникова, С. М. Балахин, Т. А. Косогова. – Москва, 2012. – Т.3. – с. 419-420.
39. Тутельян, В. А. Материалы VII международного съезда «Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения» / В. А. Тутельян, Б. В. Суханов, В. М. Булаем. - Санкт-Петербург-Пушкин, 3-5 июля, 2003. – с. 469-471.
40. Чага — косметика для всей семьи // Провизор № 20. - 2001. - с. 22.
41. Чага сохранит вашу кожу здоровой // Провизор № 3. - 2002. - с. 29.
42. Чехов, П. Медицинские теории в инфографике / П. Чехов. – Москва : АСТ, 2016.
43. Шариков, А. М. Гриб чага *Inonotus obliquus* Pilat: Антибиотическая активность метаболитов / А. М. Шариков // Современные наукоемкие технологии. – Москва, 2010, № 8. - с. 176.
44. Шариков, А. М. Исследование антибиотической активности гриба чаги в отношении возбудителя туляремии / А. М. Шариков, Н. В. Пашенова, Д. А. Нешумаев, И. А. Новицкий // Тихоокеанский медицинский журнал. – Владивосток : Тихоокеанский государственный медицинский университет, 2010. – с. 99.
45. Шиврина, А. Н. Исследование стеринов и тритерпенов у гриба *Inonotus obliquus* / А. Н. Шиврина. – Москва — Ленинград : Наука, 1965.
46. Шиврина, А. Н. К характеристике комплекса сложных соединений чаги / А. Н. Шиврина, Е. В. Ловягина, Е. Г. Платонова. – Ленинград : мед. лит., 1959.
47. Шиврина, А. Н. О химическом составе чаги / А. Н. Шиврина, Е. В. Ловягина, Е. Г. Платонова. – Ленинград : мед. лит., 1959.

48. Шиврина, А. Н. Химическая характеристика действующих начал чаги / А. Н. Шиврина. – Москва : Наука, 1966.
49. Якимов, П. А. Зольные элементы чаги и препараты из нее / П. А. Якимов, М. Ф. Ступак. - Ленинград : мед. лит., 1959.
50. Якимов, П. А. Общая биологическая и химическая характеристика чаги как исходного сырья для получения препаратов / П. А. Якимов. – Ленинград : мед. лит., 1959.
51. Nobles, M. K. Identification of cultures of wood-inhabiting Hymenomycetes / M. K. Nobles // Canadian Journal of Botany, 1965. - V. 26. - P. 1097-1139.
52. Rayner, A.D.M. Fungal Communities in the Decay of Wood / A.D.M. Rayner, L. Boddy // Advances in Microbial Ecology, 1988. - V. 10. - P. 115–166.
53. Sun, Y. 1. In vitro antitumor activity and structure characterization of ethanol extracts from wild and cultivated chaga medicinal mushroom, *Inonotus obliquus* / Y. 1. Sun, X.H.1 Chen, J. H. 1 Jiang, G. 2 Zhang, R. B. 3 Curtis, Lu Z. H. 4 // International journal of medicinal mushrooms. – Xuzhou Normal University, University of Winnipeg, University of Manitoba, China Agricultural University, 2011. – Т.13. – с. 121-130.

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой



Т. Г. Волова

подпись

инициалы, фамилия

« 18 »

июня

2018г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Оценка антибактериальной и фитостимулирующей
активности продукта культивирования трутовика скошенного *Inonotus*
obliquus (Fr.) Pilat на березовых опилках

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

Шупикова А.А.
инициалы, фамилия

Красноярск 2018