

УДК 582.238:57.083.13

## КУЛЬТИВИРОВАНИЕ *PLEUROTUS OSTREATUS* (JACQ.) P. KUMM. СОВМЕСТНО С ДРОЖЖАМИ

Д.Н. Новосёлова, О.В. Камзолкина

(кафедра микологии и альгологии; e-mail: dandylion.ds@gmail.com)

Исследованы совместные культуры *Pleurotus ostreatus* и восьми видов дрожжей на голодном агаре. В совместных культурах обнаружены специализированные структуры для контакта мицелия вешенки с клетками дрожжей: сосочковидные выросты, коралловидные гифы. Из восьми видов дрожжей выделены *Hanseniaspora uvarum*, *Rhodotorula minuta*, *Saccharomyces cerevisiae*, которые обозначены как пищевой преферendum для *P. ostreatus*. С использованием этих видов проведено культивирование вешенки на подсолнечной лузге; в присутствии суспензии *H. uvarum* и *S. cerevisiae* получен урожай плодовых тел на 52,8–75,7% больше, чем при выращивании вешенки без добавления дрожжей.

**Ключевые слова:** *Pleurotus ostreatus*, совместная культура, пищевой преферendum, *Hanseniaspora uvarum*, *Saccharomyces cerevisiae*.

Вешенка устричная *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. — один из самых распространенных в природе вид рода *Pleurotus*, широко культивируемый в разных странах мира. В грибоводстве вешенка устричная ценится своими вкусовыми качествами и выраженным “грибным” ароматом, а также неприхотливостью к условиям культивирования на различных субстратах растительного происхождения [1].

Вешенка устричная принадлежит к экологотрофической группе ксилотрофных грибов. Для всех дереворазрушающих грибов главным лимитирующим фактором роста является азот, поскольку соотношение С:N в древесине колеблется от 300:1 до 1000:1 и даже больше, тогда как оптимальное для роста большинства грибов соотношение — это 30:1 [2]. Для многих ксилотрофных грибов показана способность восполнять недостаток азота путем паразитизма на бактериях, дрожжах или водорослях, встречающихся в древесном субстрате [3, 4]. Эпифитные дрожжи широко распространены в природе на поверхности стеблей, листьев, плодов и ягод травянистых и древесных растений, а также на коре деревьев. Дрожжи не участвуют непосредственно в процессе разложения древесины, поскольку не имеют необходимых для этого ферментов, однако служат источником азота для ксилотрофных грибов, тем самым косвенно влияя на процессы разрушения древесины [5].

Свойство вешенки использовать микроорганизмы в качестве источника питания может быть успешно использовано в биотехнологии и грибоводстве для увеличения выхода съедобной биомассы мицелия: например, совместное культивирование вешенки с бактериями *Azospirillum brasilense* в жидкой среде позволяет увеличить выход биомассы ми-

целия на 30% и сократить время выращивания посевного мицелия [6]. Для стимуляции роста и плодоношения грибов более предпочтительным с точки зрения безопасности для здоровья потребителей является добавление не химических веществ-стимуляторов, а непатогенных для человека биологических объектов (бактерий, дрожжей). Кроме того, добавление в субстрат живой культуры микроорганизмов позволяет грибному мицелию длительное время использовать их как дополнительный источник питания в течение всего времени культивирования.

Цель настоящей работы — изучение взаимодействия вешенки и дрожжей в процессе вегетативного роста мицелия в культуре и влияния дрожжей на процесс плодотворения гриба.

### Материалы и методы

**Объекты исследования.** Ксилотрофный базидиомицет *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. НК-35. Дрожжи аскомицетного аффинитета: *Debaryomyces hansenii* (Zopf) Lodder & Kreger-van Rij, *Hanseniaspora uvarum* (Niehaus) Shehata, Mrak & Phaff, *Kluyveromyces marxianus* (E.C. Hansen) Van der Walt, *Metschnikowia pulcherrima* Pitt. & M.W. Mill., *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen 3785, 3809, Moment. Дрожжи базидиомицетного аффинитета: *Cryptococcus albidus* (Saito) C.E. Skinner, *Cystofilobasidium capitatum* (Fell, I.L. Hunter & Tallman) Oberw. & Bandoni, *Rhodotorula minuta* (Saito) F.C. Harrison.

**Культивирование на агаризованной среде.** Мицелий вешенки культивировали в чашках Петри отдельно и совместно с дрожжами на 1,5%-м голодном агаре при температуре  $25 \pm 1^\circ$ . Совместные культуры были созданы путем подсева водной суспензии дрожжей (концентрация  $10^5$ – $10^7$  кл/мл),

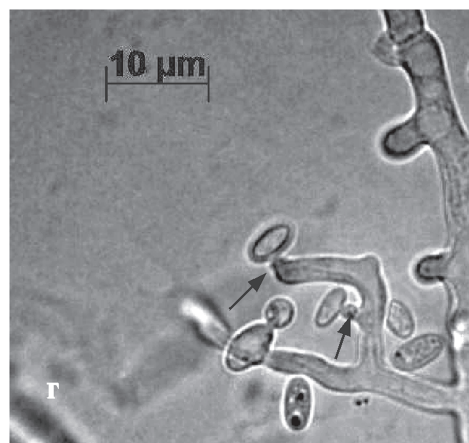
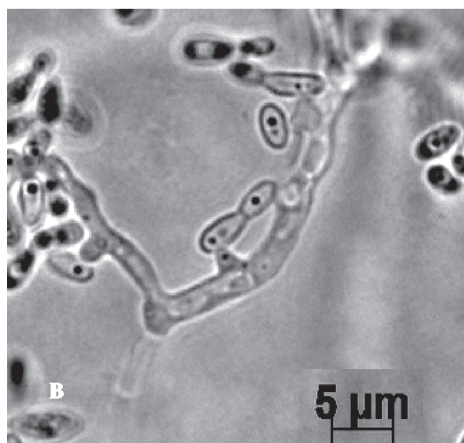
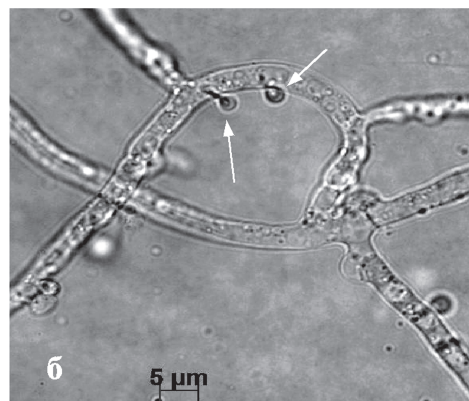
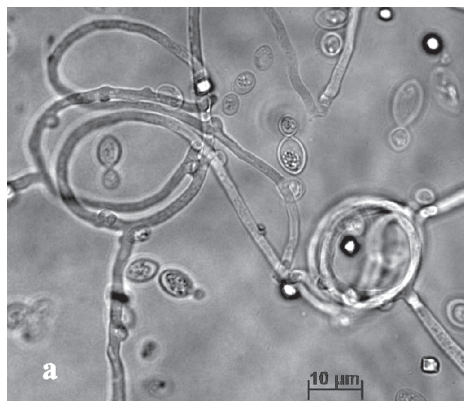
выращенных на скошенном сусло-агаре (2,2%), в виде капель (по 50 мкл) на расстоянии 1,5–2 см от края колонии гриба на 7-е сут роста мицелия. Микроскопирование проводили на 3–4 сут совместного роста при использовании светового микроскопа Axioskop 40 FL, оснащенного цифровой камерой AxioCam MRc. Все эксперименты проводили в трех повторностях.

#### Получение плодовых тел.

Плодовые тела вешенки получали на подсолнечной лузге в условиях климатической камеры. Посевной мицелий выращивали на пшеничном зерне, содержащем 3% мела, в течение 14 сут в термостате при температуре  $25 \pm 1^\circ$ . Субстрат культивирования готовили по модифицированной методике Стэйметса [7]. Влажность (влагосодержание) субстрата определяли по общепринятой в грибоводстве методике: влажность (%) =  $\frac{\text{масса сырого субстрата} - \text{масса сухого субстрата}}{\text{масса сырого субстрата}} \times 100\%$  [8]. Выгонку плодовых тел производили при температуре  $20 \pm 1^\circ$  и относительной влажности воздуха 95%. После инокуляции субстрата мицелием вешенки в субстрат добавляли водную суспензию дрожжей (концентрация  $10^5$ – $10^7$  кл/мл) по 10 мл в каждую емкость. В ходе эксперимента использовали два вида контроля: субстрат без каких-либо добавок (контроль № 1) и субстрат, в который добавляли стерильную воду по 10 мл в каждую емкость (контроль № 2). Все эксперименты проводили в трех повторностях.

#### Результаты и обсуждение

**Культивирование на агаризованной среде.** Мицелий вешенки полностью зарастает микроколонии дрожжей на поверхности голодного агара. Частота ветвления гиф мицелия увеличивается в 4–8 раз в совместных культурах с *C. albidus*, *H. uvarum*, *M. pulcherrima*, *S. cerevisiae*. Сильно ветвящиеся гифы мицелия образуют коралловидные структуры [3]; такие структуры наблюдали в совместных культурах с *H. uvarum*, *R. minuta*, *S. cerevisiae*. В совместных культурах с *C. albidus*, *D. hansenii*, *K. marxianus*, *S. cerevisiae* обнаружены мицелиальные кольца (рисунк, а); они представляют собой участок спираль-



Микроморфология мицелия *P. ostreatus* в совместной культуре (СК) с клетками дрожжей: а — мицелиальные петли в СК с *C. albidus*; б — головчатые выросты в СК с *C. albidus* (указаны стрелками); в — контакты гифы мицелия с дрожжевыми клетками в СК с *H. uvarum*; г — контакты гифы мицелия с дрожжевыми клетками в СК с *R. minuta* (сосочковидные выросты указаны стрелками)

но закрученной вегетативной гифы и внешне сходны с ловчими петлями, которые образует мицелий хищных грибов, а также *P. ostreatus* в присутствии нематод в культуре [2]. Функция мицелиальных колец вешенки обыкновенной не вполне понятна: по-видимому, они образуются не для захвата клеток дрожжей, а являются физиологическим ответом мицелия на присутствие дрожжей в культуре.

Как в монокультуре вешенки, так и в совместных культурах со всеми видами дрожжей, кроме *R. minuta*, обнаружены головчатые выросты (рисунк, б). В апикальной части выроста образуется капля секрета. Наиболее известна нематоцидная активность секрета: такие выросты образуются у вешенки и у хищных грибов и служат для обездвиживания нематод [2]. Однако функции секрета, выделяемого на головчатых выростах вешенки, окончательно не ясны. По-видимому, это может быть не только нематотоксин, но и какое-либо другое вещество, выделяемое клетками мицелия.

Во всех совместных культурах на мицелии наблюдали образование специализированных коротких выростов, осуществляющих связь мицелия и клеток дрожжей, названных сосочковидными (рисунк, в, г) [9]. Сосочковидные выросты встреча-

Плодоношение *P. ostreatus* на подсолнечной лузге  
в присутствии клеток дрожжей и без них

Варианты	Время зарастания субстрата (сут)	Длительность инкубации (сут)	Максимальная высота плодовых тел (мм) $\pm 5$ мм	Масса плодовых тел с 1 банки (г)
Контроль № 1	18	11	70,5	7,0 $\pm$ 1,0
Контроль № 2	18	13	60	8,0 $\pm$ 0,8
+ <i>H. uvarum</i>	14	11–13	55,5	12,3 $\pm$ 1,8
+ <i>R. minuta</i>	14	13	70	9,0 $\pm$ 1,0
+ <i>S. cerevisiae</i>	14	11–13	55	10,7 $\pm$ 0,6

лись единично в совместных культурах с *C. albidus*, *C. capitatum*, *D. hansenii*, *K. marxianus*, *S. cerevisiae* 3785; от одного до трех в поле зрения — в совместных культурах с *M. pulcherrima*, *R. minuta*, *S. cerevisiae* 3809, *S. cerevisiae* Moment. Особенно обильно они образовывались в совместных культурах вешенки с дрожжами *H. uvarum* (более трех в поле зрения). Контакты выростов гиф с дрожжевыми клетками наблюдали в совместных культурах с *C. albidus*, *C. capitatum*, *H. uvarum*, *R. minuta*, *M. pulcherrima*, *S. cerevisiae* 3785, 3809 и Moment, особенно обильно (более трех в поле зрения) — с *H. uvarum*. Контакты образовывались только в совместных культурах, в которые вносили суспензию живых клеток дрожжей. При внесении в культуру суспензии клеток, убитых кипячением, не формировались сосочковидные выросты на гифах и контакты с дрожжевыми клетками.

Пищевой преферендум для *P. ostreatus* был определен на основании следующих признаков: увеличение частоты ветвления гиф более чем в 4 раза, обильное формирование сосочковидных выростов (два и более в поле зрения) и коралловидных структур, многочисленные контакты мицелия с дрожжевыми клетками (два и более в поле зрения). Таким образом, из восьми видов дрожжей были отобраны три вида *H. uvarum*, *R. minuta*, *S. cerevisiae* в качестве пищевого преферендума. Данные виды дрожжей использованы в процессе культивирования вешенки на подсолнечной лузге.

**Получение плодовых тел.** Во всех образцах с добавлением дрожжей (*H. uvarum*, *R. minuta*, *S. cerevisiae*) полное зарастание субстрата мицелием наблюдали на 14-е сут, в контроле № 1, 2 — на 18-е сут; таким образом, выгонку плодовых тел в образцах с добавлением дрожжей начали на четверо суток раньше. Длительность инкубации, т.е. время, прошедшее с момента постановки банок на выгонку в климатическую камеру до момента сбора плодовых тел, было практически одинаковым при выращивании вешенки отдельно и совместно с дрож-

жами: плодовые тела были срезаны на 11–13-е сут во всех образцах.

Влажность субстрата при добавлении стерильной воды, а также суспензии дрожжевых клеток изменяется минимально в пределах нормы влажности, установленной для выращивания вешенки [10]. В контроле № 1 влажность субстрата составляла  $61,2 \pm 2,0\%$ , контроле № 2 и в опытных образ-

цах —  $60,5 \pm 1,5\%$ . Таким образом, влияние влажности субстрата на скорость его зарастания мицелием можно исключить: ускорение роста мицелия происходит за счет добавления в субстрат суспензии дрожжевых клеток.

Плодовые тела *P. ostreatus* внешне были одинаковыми как при выращивании их совместно с дрожжами, так и отдельно. Грибы образовывались одиночно или группами по 2–3 плодовых тела. Было отмечено, что в контроле № 1, 2 и в присутствии дрожжей *R. minuta* плодовые тела более высокие (до 75 мм) и тонкие, а в присутствии дрожжей *H. uvarum* и *S. cerevisiae* — низкие (до 60 мм) и более мясистые. Достоверных различий по биомассе в контроле № 1, 2 и в присутствии *R. minuta* не наблюдается. Биомасса плодовых тел была выше, чем в контроле, в присутствии *H. uvarum* — на 75,7%, в присутствии *S. cerevisiae* — на 52,8% (таблица).

Максимальная прибавка биомассы урожая наблюдалась в присутствии дрожжей *H. uvarum*, что коррелирует с максимальным количеством сосочковидных выростов и контактов мицелия с клетками дрожжей *H. uvarum* на агаризованной среде. Жизнеспособные дрожжевые клетки обнаружены в субстрате на 14-е и 28-е сут культивирования, т.е. в течение всего времени роста мицелия и плодоношения. По-видимому, в процессе роста на субстрате вешенка также использует дрожжевые клетки в качестве дополнительного источника питания.

Полученные данные демонстрируют способность вешенки *P. ostreatus* переходить к паразитизму и использовать дрожжевые клетки как источник питания в лабораторных условиях на голодном агаре, т.е. на среде, не содержащей доступных для гриба источников углерода и азота. При этом наблюдается неодинаковая степень паразитической активности в отношении разных видов дрожжей. Внесение суспензии живых клеток дрожжей приводит к увеличению скорости роста гриба на субстрате и увеличению биомассы плодовых тел.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stamets P. Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms. Third Edition. Ten Speed Press, Berkeley. Toronto, 2000. 574 p.

2. Barron G.L. Predatory fungi, wood decay, and the carbon cycle // Biodiversity. 2003. Vol. 4. P. 3–9.



3. Hutchison L.J., Barron G.L. Parasitism of yeasts by lignicolous *Basidiomycota* and other fungi // Can. J. Bot. 1996. Vol. 74. P. 735–742.

4. Hutchison L.J., Barron G.L. Parasitism of algae by lignicolous *Basidiomycota* and other fungi // Can. J. Bot. 1997. Vol. 75. P. 1006–1111.

5. Blanchette R.A., Shaw C.G. Associations among bacteria, yeasts, and Basidiomycetes during wood decay // Phytopathology. 1978. Vol. 68. P. 631–637.

6. Никитина В.Е. Способ получения посевного мицелия съедобных грибов. Описание изобретения к патенту Российской Федерации RU2249614. 21.03.2003.

7. Stamets P. Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms. Ten Speed Press, Berkeley. Toronto, 1993. 552 p.

8. Сайт ООО “Экоцентр” (URL: [http://ecocentr.ru/index.php?option=com\\_content&view=article&id=6:2008-03-24-10-10-48&catid=3:technologies&Itemid=4](http://ecocentr.ru/index.php?option=com_content&view=article&id=6:2008-03-24-10-10-48&catid=3:technologies&Itemid=4) 22.02.2011).

9. Камзолкина О.В., Гришанина А.Н., Панчева Е.В., Волкова В.Н., Козлова М.В. Микроморфологические особенности штаммов *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel. и *P. ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., культивируемых отдельно и совместно с дрожжами // Цитология. 2006. Т. 48. № 2. С. 153–160.

10. Заикина Н.А., Коваленко А.Е., Галынкин В.А., Дьяков Ю.Т., Тищенко А.Д. Основы биотехнологии высших грибов. СПб: Проспект Науки, 2007. 336 с.

Поступила в редакцию  
28.02.11

### CO-CULTIVATION OF *PLEUROTUS OSTREATUS* (JACQ.) P. KUMM. WITH YEASTS

D.N. Novoselova, O.V. Kamzolkina

Co-cultivation of *Pleurotus ostreatus* with eight yeast species were investigated on water agar. Special mycelial structures to contact with yeast cells were found in such cultures: nipple-like appendages and coralloid hyphae. Three out of eight species, *Hanseniaspora uvarum*, *Rhodotorula minuta*, and *Saccharomyces cerevisiae* were identified as trophic preferendum for *P. ostreatus*. These three yeast species were used for mushroom cultivation on sunflower seed's peel. The biomass of fruiting bodies increased on 52,8–75,7% with the *H. uvarum* and *S. cerevisiae* suspension presence in the substrate.

**Key words:** *Pleurotus ostreatus*, co-cultivation, trophic preferendum, *Hanseniaspora uvarum*, *Saccharomyces cerevisiae*.

#### Сведения об авторах

Новосёлова Дарья Николаевна — аспирантка кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ. Тел. (495)939-54-82; e-mail: dandylion.ds@gmail.com

Камзолкина Ольга Владимировна — докт. биол. наук, проф. кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ. Тел. (495)939-54-82; e-mail: o-kamzolkina@yandex.ru