

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, *Kluveromyces 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),

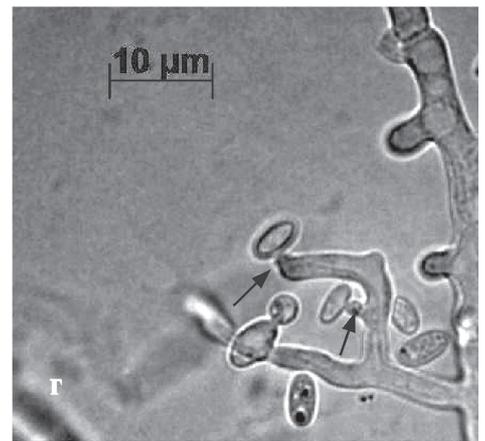
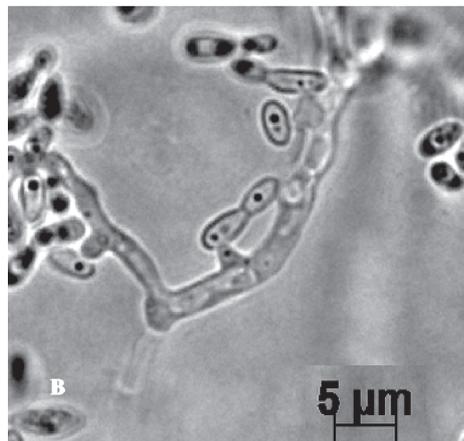
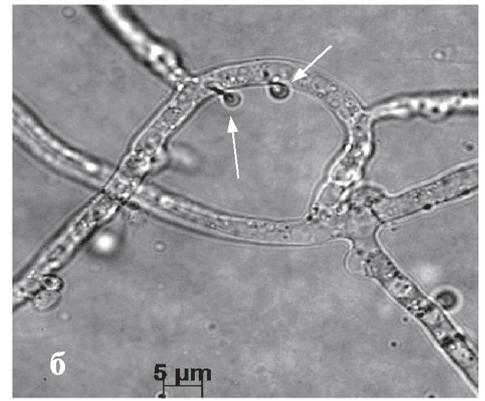
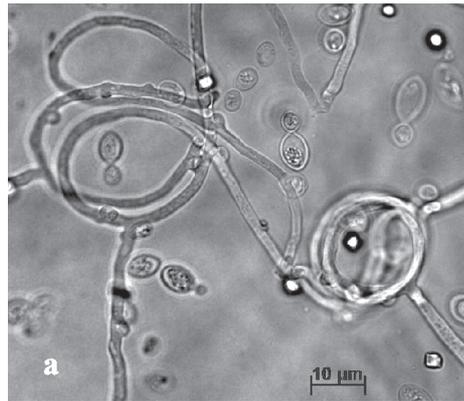
выращенных на скошенном сусле-агаре (2,2%), в виде капель (по 50 мкл) на расстоянии 1,5–2 см от края колонии гриба на 7-е сут роста мицелия. Микроскопирование проводили на 3–4 сут совместного роста при использовании светового микроскопа Axioskop 40 FL, оснащенного цифровой камерой AxioCam MRc. Все эксперименты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