

УДК 579.6

ВЛИЯНИЕ СИМБИОТИЧЕСКОГО МИКРОБОЦЕНОЗА НА РОСТ *PLEUROTUS OSTREATUS*, *AGARICUS BISPORUS* И НЕКОТОРЫХ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ¹

© 2007 В.Р. Киреев, О.Н. Макурина²

Проведены исследования влияния выделенного из грибного субстрата микробоценоза на рост съедобных грибов *Pleurotus ostreatus* *Agaricus bisporus*, а также на рост и развитие таких сельскохозяйственных культур, как *Capsicum annuum*, *Triticum aestivum* и *Solanum lycopersicum*

Введение

Одна из наиболее острых проблем современности, стоящих перед человечеством, это недостаток пищевого белка. Около 80% потребляемого белка дают человеку растения, однако увеличение ресурсов за счет естественных угодий имеет свои пределы. Грибы, являющиеся источником белков, можно выращивать круглогодично и независимо от световой зоны, погодных и почвенных условий и собирать большие урожаи. Согласно современным представлениям, практически весь азот живых организмов имеет своим источником биологическую фиксацию молекулярного азота атмосферы, который также используют грибы для построения своего мицелия и увеличения биомассы. Поиск природных азотфиксаторов, продукты жизнедеятельности которых могут использовать культивируемые грибы, на данный момент составляет одно из главных направлений научных поисков грибоводов.

Первые опыты искусственного разведения вешенки были осуществлены в Германии еще перед Первой мировой войной. В нашей стране исследования методов подготовки субстратов для выращивания грибов проводились сотрудниками Научного центра биологических исследований Российской академии наук в Пушкино, на биологическом факультете МГУ, в Университете инженерной экологии (раньше этот ВУЗ назывался Московским институтом химического машиностроения). Эти работы позволили разработать технологию промышленного куль-

¹ Статья представлена доктором биологических наук, профессором Н.В. Прохоровой.

² Киреев Владимир Реональдович, Макурина Ольга Николаевна (dekanat.05.54@mail.ru), кафедра биохимии Самарского государственного университета, 443011, Россия, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

тивирования вешенки на отходах переработки хлопка, льна, подсолнечника, на опилках, самой разнообразной соломе [1].

Выращивание съедобных грибов в настоящее время выделилось в перспективную, рентабельную и быстроразвивающуюся отрасль сельского хозяйства. Мировое производство грибов за последние два десятилетия резко возросло [2].

В естественных условиях ксилотрофные грибы растут в плотной древесине, развиваясь в ней достаточно медленно. При интенсивном культивировании вешенки используют рыхлые субстраты, такие как опилки, измельченная кора или солома зерновых культур. В практике грибоводы часто сталкиваются с появлением конкурентной микрофлоры в субстрате, прошедшем нормальную бактериальную обработку – ферментацию. В анаэробных зонах появляются метаболиты этих микроорганизмов, существенно ингибируя жизнедеятельность мицелия вешенки [3].

При культивировании съедобных грибов на лигноцеллюлозных субстратах конкурентные микроорганизмы часто вызывают серьезное снижение урожая. Поэтому на данный момент главной проблемой грибной отрасли является ее нестабильность. Возможным решением этих двух проблем может стать использование симбиотического микробоценоза, выделенного в лаборатории «Прикладной микологии и грибоводства» СамГУ. Поэтому **целью** данной работы стало изучение влияния симбиотического микробоценоза на рост *Pleurotus Ostreatus Agaricus Bisporus* и некоторых сельскохозяйственных культур.

В рамках поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. Доказать свойства симбиотической культуры как ингибитора конкурентов *Pleurotus ostreatus* и *Agaricus bisporus* и изучить ее влияние на плодообразование этих грибов.
2. Доказать свойства симбиотической культуры как азотфиксатора.
3. Изучить свойства данного микробоценоза как удобрения для сельскохозяйственных культур (*Capsicum annuum*, *Triticum aestivum* и *Solanum lycopersicum*).

1. Методика исследования

Объектом исследования служило симбиотическое сообщество микроорганизмов, выделенное из грибного субстрата (рис. 1), а также съедобные грибы: *Pleurotus ostreatus*, *Agaricus bisporus*, и культурные растения: *Capsicum annuum*, *Triticum aestivum* и *Solanum lycopersicum*.

Определение содержания азота в зерне проводилось в г. Кинель в Поволжском НИИ РАСХН селекции и семеноводства им. П.М.Константинова по методу Кьельдаля. Метод основан на минерализации анализируемого удобрения при нагревании с концентрированной серной кислотой в присутствии перекиси водорода, смешанного катализатора или раствора фенола в серной кислоте, с последующей отгонкой аммиака в раствор борной кислоты и титровании серной кислотой.

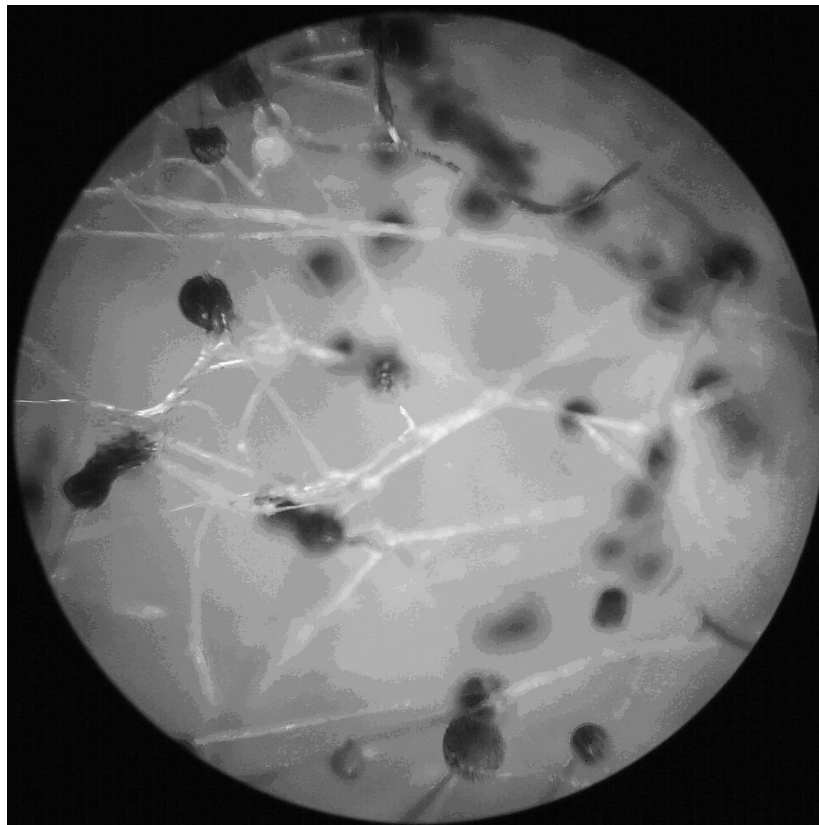


Рис. 1. Часть симбиотической культуры под микроскопом

Выращивание мицелия *Agaricus Bisporus* осуществляли следующим образом: зерно варили в течение 25-30 минут, после чего воду сливали, а наружную оболочку зерна просушивали путем продувания вентилятором горячего воздуха. Хорошо приготовленное зерно должно быть разбухшим, а его наружная оболочка должна быть сухой, чтобы не было наружной влаги. После этого зерно раскладывали по банкам (по 1 кг 50г), надевали обычные жестяные крышки с отверстиями диаметром 4см. В эти отверстия вставлялся ватно-марлевый тампон, который прижимали кусочком термостойкого материала.

Автоклавирование производилось в стерилизаторе при давлении пара в 1.5 атм в течение 2 часов в режиме небольшого стравливания пара через дренажный кран стерилизатора. После этого происходило охлаждение парогенератора с открытым дренажным краном. После выравнивания давления с окружающим воздухом открывали дверь стерилизатора и перекладывали банки в чистую зону посева на специальные стеллажи. После 10-часового охлаждения производился посев заранее приготовленной посевной культуры. Посевной мицелий выращивается на питательной среде, основу которой составляют лигноцеллюлозные комплексные субстратные вещества.

Посев проводился в условиях особой чистоты, при горящем пламени спиртовки в специальном боксе с фильтрованным воздухом, чтобы обеспечить отсутствие микроорганизмов в посевном материале. После посадки культуры, в банку снова вставляли ватно-марлевый фильтр и укладывали на стеллаж.

После окончания посева все банки переносились в термостатную комнату, где круговыми движениями осуществлялось равномерное перемешивание зерна с посевной культурой. На специальных стеллажах в горизонтальном положении мицелий обрастал субстрат в течение 10 дней и до посева хранился в холодильнике (рис. 2).



Рис. 2. Мицелий *Agaricus Bisporus*

Подготовка субстрата для выращивания *Pleurotus Ostreatus* проводилась иначе – субстратом для вешенки служила лузга подсолнечника и пшеничная солома. Подготовка сырья включала следующие стадии: 1) увлажнение (сырье заливали холодной водой в специально оборудованной емкости. После увлажнения вода сливалась. Включали парогенератор и вентилятор, обеспечивающие принудительную подачу воздуха, который, смешиваясь с паром, продувал субстрат (6-7

часов – лузгу и 12-14 часов-солому); 2) кондиционирование путем аэробной ферментации с участием термофильных бактерий (субстрат перемещали в специальное приспособление для обеспечения необходимых условий в виде ванной с решетчатым полом, системой воздухопроводов и парогенератором, подававшим паровоздушную смесь при температуре 57-58°C. Ферментация проводилась с целью создания селективных условий для роста мицелия в течение 1 недели); 3) охлаждение вентилятором в течение 3 часов.

Методика определения влияния симбиотического микробоценоза на рост мицелия *Pleurotus Ostreatus* включала перечисленную ниже последовательность событий.

Перед посевом мицелия все зерновки разрыхлялись, гифы гриба разрывались. В барабане вручную осуществлялось перемешивание посевного материала с субстратом, осуществлялась фасовка материала в цилиндрические пакеты, в которых формировались блоки субстрата. В термостатной комнате при температуре 18°C без вентиляции и света субстрат зарастал, а затем переносился в ростовую зону, в которой имеется дополнительная приточно-вытяжная и рециркуляционная вентиляция, необходимая для роста плодовых тел. Обмен воздуха составлял 200м³/ч на каждую тонну субстрата. Рециркуляционные воздухопроводы должны распределять воздух таким образом, чтобы вокруг каждого гриба двигался воздух со скоростью 0,2-0,3м/с. Кроме того, в ростовой зоне было освещение интенсивностью 200люкс в течение 10-12ч/сут и относительная влажность 85-95%.

Выращивание вегетативной фазы мицелия *Pleurotus Ostreatus* осуществлялось так: мицелий, который обычно покупают грибководы для посадки, двухъядерный. Обычно его в концентрации 1% сеют на солому в трехлитровую банку. В опыте в течение полугода поддерживался рост гриба в вегетативной фазе при температуре 24°C и 20°C. Через каждые 2 недели гриб пересаживали, не давая ему образовывать друзы – зачатки плодовых тел.

Влияние микробоценоза на рост и развитие культурных растений проводился в течение трех месяцев. Сообщество микроорганизмов вместе с субстратом для грибов (где отсутствовали съедобные грибы) добавляли в очень небольшом количестве в заранее очень бедную почву, основу которой (80 %) составлял только песок. Эта опытная группа растений выращивалась в условиях ограничения освещенности. Контрольная группа растений выращивалась в открытом грунте (богатая плодородная почва) с оптимальным количеством удобрений в ней.

2. Результаты исследований и их обсуждение

При культивировании микробоценоза в соломе через 2 недели появляется запах аммиака, что является доказательством процессов азотфиксации и разложения органической основы субстрата. Через год солома превратилась в вязкую текучую коричневую жидкость с запахом аммиака.

По-видимому, микробоценоз не только активно связывает азот, но и расщепляет целлюлозу и лигнин субстрата, о чем свидетельствует отсутствие твердых фрагментов и присутствие запаха аммиака. Кроме того, переход в жидкую фазу свидетельствует о низкой требовательности культуры к содержанию кислорода.

При длительном культивировании микробоценоза (начальная влажность субстрата – 70%) в соломе через 2 недели появляется запах аммиака, но запаха сероводорода практически не было. Через год солома превратилась в вязкую текучую коричневую жидкость с запахом аммиака. Активное выделение NH_3 свидетельствовало о происходящем процессе азотфиксации.

По-видимому, микробоценоз не только активно продуцирует связанный азот, но и расщепляет целлюлозу и лигнин субстрата, о чем свидетельствует отсутствие твердых фрагментов. Кроме того, переход в жидкую фазу свидетельствует о ее низкой требовательности культуры к содержанию кислорода, то есть данный микробоценоз можно назвать факультативным анаэробом.

Процесс увеличения содержания азота в зерне, в которое была инокулирована симбиотическая культура, был экспериментально доказан методом Кьельдаля (табл. 1). Содержание общего азота так же, как и сырого протеина, через 3 месяца увеличилось на 6%, а через 6 месяцев – на 38%.

Учитывая тот факт, что в среду не вносились дополнительные источники азота, можно говорить об интенсивном процессе азотфиксации симбиотическим микробоценозом.

Таблица 1

Результаты определения сырого протеина по методу Кьельдаля

Наименование образца	Воздушно-сухая навеска	
	% общего азота	% сырого протеина
Контроль (вареное зерно)	2,36±0,03	13,52±0,34
Опытный (3 месяца)	2,51±0,05	14,33±0,26
Опытный (6 месяцев)	3,83±0,07	21,88±0,43

Субстрат, освоенный симбиотической культурой, не поражался конкурирующими грибами, в том числе триходермой.

После введения в зерновой субстрат в течение 1,5 месяцев, кроме высших грибов, ни один конкурент не мог освоить его. Даже при минимальной посевной норме 2% в субстрате не обнаруживалось признаков контаминаций, гриб полностью осваивал субстрат, но не сразу (табл. 2), что говорит о сильной метаболической защите микробоценоза, которую шампиньон, имеющий гораздо более широкий набор ферментов и намного более высокую скорость освоения субстрата, чем *Mucor*, смог преодолеть только через 3 недели после посадки.

Таблица 2

**Освоение субстрата, ферментированного микробиоценозом
в течение 3-х месяцев**

гриб	время начала освоения субстрата	% внесения зерна
шампиньон	через 3 недели после посадки	50
вешенка	сразу	50

При внесении мицелия в нехарактерные высокопитательные субстраты – например, зерно, предварительно обработанное микробиоценозом, гриб полностью осваивал субстрат. Хотя при высоком содержании высокопитательных легко усваиваемых веществ, как правило, мицелий *Pleurotus Ostreatus* быстро прекращает свой рост и гибнет, не выдержав конкуренции с микроскопическими грибами и бактериями, содержащимися в субстрате. Таким образом была выявлена токсичность метаболитов биоценоза.

Подавление микроскопических конкурентов микробиоценозом может происходить за счет быстрого роста самой культуры и более полного освоения субстрата за счет использования дополнительного источника азота и, следовательно, скорости белкового синтеза.

Грибы (в том числе *Mucor*) более приспособлены, чем бактерии, в особенности анаэробные, так как они имеют более широкий набор ферментов, в том числе разрушающие целлюлозу, белковые вещества и другие биополимеры до мономеров и могут приготовить стартовое питание (стабилизированное) для азотфиксирующих организмов. Кроме того, в результате своей жизнедеятельности он потребляет O₂, избыток которого подавляет активность нитрогеназной системы *Clostridium* и *Pleurotus Ostreatus*. Отмершие клетки плесневого гриба имеют стабильный питательный состав, который использует азотфиксирующая бактерия. *Azotobacter* также нуждается в повышенной влажности, а после переработки грибами рода *Mucor* влажность субстрата увеличивается от 50 до 75% за счет высвобождения биологически связанной воды.

Содержание азотфиксирующих бактерий рода *Clostridium* sp в симбиотическом микробиоценозе также увеличивает скорость накопления азота в культуре. *Azotobacter* очень активно поглощает из среды кислород, создавая его низкое парциальное давление, необходимое для *Clostridium*. В то же время Последний образует органические кислоты, которые использует *Azotobacter*. *Clostridium* является кислотообразователем, а *Azotobacter* образует щелочные продукты. Таким образом устраняются скачки pH.

Предположительно, создается сильная метаболическая защита биоценоза, наиболее вероятно, что это гуминовые вещества, так как субстрат накапливает до 4-5% N.

Понятие дружности плодоношения означает одновременность образования плодовых тел грибом *Pleurotus Ostreatus* на доступной поверхности (прорезях в полиэтиленовых мешках). Обычно при температуре 17-17,5 °С (температура поддерживается центральным отоплением, радиатором и вентилятором) при внесении мицелия в концентрации 1% рационально используется от 30 до 60% доступной для плодоношения площади. Если же засевание проводится в субстрат, в который предварительно был внесен симбиотический микробоценоз, то есть содержащий его метаболиты (сами микроорганизмы предварительно были убиты автоклавированием), то дружность плодоношения составляет 100% (табл. 3).

Таблица 3

Плодоношение *Pleurotus Ostreatus* в при внесении мицелия в субстрат с метаболитами симбиотического микробоценоза

Характеристика субстрата	Дружность плодоношения, % от использования доступной поверхности	Урожайность 1-й волны, % от массы субстрата	Время начала плодоношения 1-й волны
Обычная солома	30-60%	17	24-й день
Солома, содержащая метаболиты симбиотического микробоценоза	100%	17	14-й день

При этом урожайность 1-й волны в обоих случаях оставалась одинаковой и составила 17% от массы субстрата

Мицелий *Pleurotus Ostreatus*, который обычно покупают грибоводы для посадки, двухъядерный. Если его в обычной концентрации (1%) посеять на солому в трехлитровую банку, то обрастание субстрата наступает за 14 дней, после чего начинается плодообразование (рис.3). В опыте в течение полугода поддерживался рост гриба в вегетативной фазе. Линейная скорость роста составляла в среднем около 8 мм/сут при температуре 24°С и 6 мм/сут при 20°С. Через каждые 2 недели гриб пересаживали, не давая ему образовывать друзы – зачатки плодовых тел. В результате получили 2,5 метра (суммарно) линейного роста вегетативной фазы гриба.

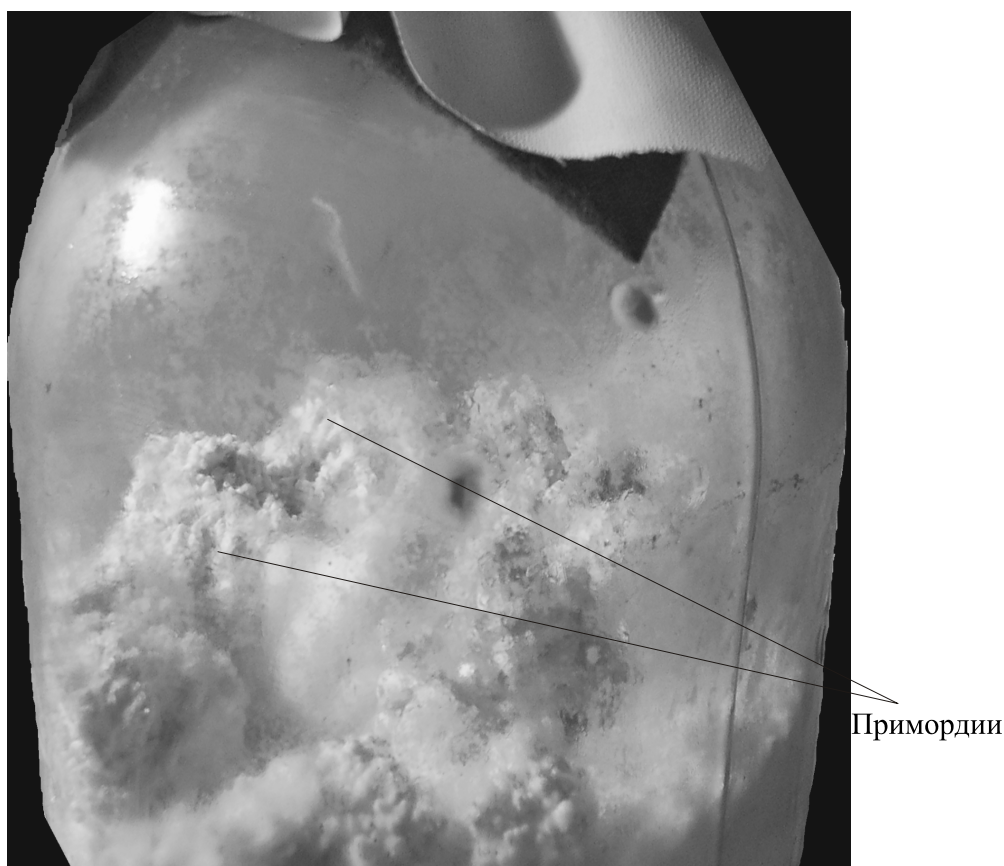


Рис. 3. Обрастание субстрата генеративной фазой мицелия *Pleurotus Ostreatus* (хорошо видны *примордии* – зачатки плодовых тел)

Функциональные свойства конечных клеток этого мицелия отличались от начальных – при засеве такими клетками соломенного субстрата плодообразование начиналось лишь на 24 день.

Полученная в итоге биомасса гриба остается та же, что говорит о полном использовании мицелием гриба питательных веществ субстрата. При этом распределение питательных веществ в первом случае неоднородно – в тех местах, где их больше, плодообразование наступает раньше. Во втором случае они равномерно распределены по субстрату, в результате чего время сбора урожая с одного мешка сокращается, в среднем, в два раза.

По-видимому, благодаря предварительной конверсии субстрата микробиоценозом питательные вещества субстрата располагаются более однородно, и гриб быстрее осваивает всю массу субстрата. Кроме того, возможно, метаболиты сим-

биотического микробоценоза, возвращают мицелий *Pleurotus Ostreatus* в активную (генеративную) фазу, стимулируя способность гриба к плодообразованию. Генеративная фаза, как оказалось в ходе исследований, более требовательна к содержанию кислорода – обычно это хорошо проявляется на высокопитательных средах. Мицелий в объеме субстрата 1,5л погибает уже при 7⁰С, в то время как вегетативный мицелий (без активации генеративных свойств) в этих же условиях и даже при температуре 10⁰С продолжает свой рост. При этом морфологические отличия в мицелии гриба в этих двух фазах учеными-микологами не найдены (что подтверждают исследования Ларисы Михайловны Краснопольской – доктора биологических наук, академика РАН в институте им. Гаузе). Можно сделать предположение, что эти две фазы роста гриба отличаются количественным соотношением различных, в том числе генеративных клеток.

Переход же из одной фазы в другую объясняет теория стресса, который стимулирует плодообразование (со слов Елены Петровны Феофиловой, профессора в Институте микробиологии РАН им. С.Н.Виноградского, доктора биологических наук, заслуженного деятеля наук РФ).

Процесс азотфиксации также интересен для применения к другим сельскохозяйственным культурам – уже после 3-х месяцев (а лучше 6) нахождения на зерне или соломе данный субстрат может использоваться не только для грибов, но и как удобрение для других сельскохозяйственных культур.

При добавлении данного сообщества организмов в заранее более бедную почву (очень небольшое количество, разбавлена песком) и выращивании на ней перца овощного (*Capsicum annuum*) в условиях сокращенного светового дня плоды растения созрели на 1,5 месяца раньше, чем контрольная группа в открытом грунте. А в аналогичных условиях *Capsicum annuum* высох несозревшим.

Влияние на рост грибов *Triticum aestivum* также было доказано экспериментальным путем (рис. 4). За период эксперимента опытные растения значительно превосходили растения контрольной группы по массе листьев, их длине, качеству корневой системы, количеству листьев и их площади.

Жидкость, полученная при длительном культивировании симбиотического микробоценоза на солоmistом субстрате, оказалась прекрасным удобрением – при поливе комнатного лимонника, винограда, рассады томатов они росли более интенсивно, а на лимоннике пропали клещи.

Таким образом можно говорить об азотсодержащих метаболитах симбиотической культуры как о биологическом удобрении – альтернативе нитратам, широко применяемым в сельском хозяйстве.



Рис. 4. Рост *Triticum Aestivum* в грунте, содержащем симбиотическую культуру (слева), и без нее (справа)

Выводы

1. Симбиотический микробоценоз является ингибитором конкурентов *Pleurotus Ostreatus* и *Agaricus Bisporus* и способствует плодообразованию этих грибов.
2. Симбиотический микробоценоз является активным азотфиксатором, о чем свидетельствует увеличение содержания азота в зерне на 38% и в грибных субстратах до 4-5%.

3. Симбиотический микробоценоз является хорошим удобрением: использование его метаболитов сокращает время сбора урожая *Pleurotus Ostreatus* с единицы площади, в среднем, в два раза, *Capsicum annuum* – на 1,5 месяца; растения *Triticum aestivum* развиваются в 2 раза более интенсивно, чем контрольные.

4. Симбиотический микробоценоз препятствует развитию конкурентной микрофлоры и способствует быстрому освоению субстрата *Agaricus Bisporus*.

Литература

- [1] Дудка, И.А. Вешенка обыкновенная / И.А. Дудка, В.А. Шепя, С.П. Вассер. – Киев: «Наукова Думка», 1976. – С. 185-296.
- [2] Выращивание грибов в домашних условиях // сборник статей. – Донецк, 2000. – С. 25-28, 65, 67.
- [3] Сычев, П.А. Экофизиология высших грибов / П.А. Сычев. – Донецк: Каспиопея, 2000. – С. 276.

Статья поступила в редакцию 26/XII/2006;
в окончательном варианте – 26/XII/2006.

EFFECT OF SYMBIOTIC MICROBIOCENOSSES ON THE GROWTH OF PLEUROTUS OSTREATUS, AGARICUS BISPORUS AND AGRICULTURE PLANTS³

© 2007 V.R. Kireev, O.N. Makurina⁴

An effect of symbiotic microbocenoses from mushroom substrate on the growth of edible mushrooms *Pleurotus ostreatus* *Agaricus bisporus* and on the growth and development of such agriculture plants as *Capsicum annuum*, *Triticum aestivum* and *Solanum lycopersicum* is analyzed.

Paper received 26/XII/2006.

Paper accepted 26/XII/2006.

³ Communicated by Dr. Sci. (Biology) Prof. N.V. Prochorova.

⁴ Kireev Vladimir Reonaldovich, Makurina Olga Nikolaevna (rambler@biomig.ru), Dept. of Biochemistry, Samara State University, Samara, 443011, Russia.