

Л. П. ДЗИГУН

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут»
пр-т Перемоги, 37, Київ, 03057

ОСОБЛИВОСТІ ДЕРЕВОРУЙНИВНОГО БАЗИДИОМІЦЕТА *LAETIPORUS* *SULPHUREUS* (BULL.: FR.) MURRILL В КУЛЬТУРИ

Ключові слова: базидіомицети, *Laetiporus sulphureus*,
ростовий коефіцієнт, лінійна швидкість радіального росту,
оксидази

Вищі базидіомицети є унікальним об'єктом біотехнології. Їх використовують як продуценти білків та незамінних амінокислот, ферментів різних класів тощо. В останні десятиріччя лікарські властивості базидіальних грибів привернули увагу біотехнологів, мікологів, мікробіологів, фармакологів. А. С. Бухало зі співавторами наводить список із 119 видів базидіальних макромицетів, котрі застосовуються в народній медицині різних країн і традиційній китайській медицині [2]. Близько 30 відсотків видів базидіомицетів зі списку відносяться до різних родин порядку *Polyporales*. Найбільша кількість базидіальних макромицетів порядку *Polyporales*, що мають лікарські властивості, є представниками родини *Polyporaceae*. Поряд з лікарськими видами родів *Coriolus*, *Cryptoporus*, *Fomes*, *Lentinus*, *Lenzites*, *Macrohyporia*, *Panus*, *Polyporus*, *Trametes* та інших до неї належить і сірчаножовтий трутовик *Laetiporus sulphureus*. Останнім часом в літературі з'явилися відомості про наявність у нього антифунгальної, антибактеріальної та протипухлинної активності [2, 8, 10, 11]. Є також дані про синтез *L. sulphureus* позаклітинних ферментів різного спектра дії [3–5, 9] і деякі відомості про морфологічні ознаки його міцелію при глибинному культивуванні [1]. Проте цілеспрямовано культурально-морфологічні особливості *L. sulphureus* не досліджувались, відсутні описи колоній різних за походженням штамів гриба на агаризованих живильних середовищах, немає відомостей про швидкість росту гриба. Між тим, саме ці параметри є вихідними для відбору штамів та розробки умов культивування вищих базидіомицетів на рідких середовищах і подальшого створення технології. Отже, одним із завдань нашої роботи було вивчення культуральних ознак колекційних та нових, виділених нами з різних субстратів, штамів істинного лікарського гриба *L. sulphureus* за різних умов культивування, а також розрахунок основних ростових показників. Для нових штамів ми вважали за доцільне дослідити наявність оксидаз.

© Л. П. ДЗИГУН, 2004

Матеріали та методи досліджень

Об'єктом дослідження були дев'ять штамів гриба *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murril (*Basidiomycota*), чотири з яких одержано з колекції шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАНУ (штами 306, 307, 308, 1518), п'ять виділено з плодових тіл, що розвивалися на природних субстратах в різних районах м. Києва та Київської обл. (табл. 1). В чисту культуру гриб виділяли з плодових тіл на агаризованому середовищі з додаванням антибіотиків пеніциліну і стрептоміцину в кількості 100–200 ОД/мл [1, 6]. Нові штами передано в колекцію шапинкових грибів Інституту ботаніки (№ 1772, 1773, 1774, 1775, 1776).

Для проведення досліджень використовували натуральні агаризовані середовища: морквяне (МА) та пивне сушло з вмістом цукру 4 % (СА) і комплексне картопляно-глюкозне (КГА) [1].

Ріст міцелію досліджували при трьох температурах: 22, 28 та 36 °С.

Культуру гриба інокулювали агаровим диском діаметром 5 мм на середовище в центр чашки Петрі. Повторність досліджень була 3-кратною. Кожну добу протягом експерименту вимірювали діаметр колонії (мм) у двох взаємоперпендикулярних напрямках, а також висоту колонії (мм). Відмічали щільність колонії за трибальною системою (1 — розріджена, 2 — середня, 3 — густа) [1].

Після повного заростання чашки Петрі встановлювали наявність оксидаз (лакази, тирозинази та пероксидази) за допомогою якісних реакцій, які проводили шляхом нанесення краплі реактиву на поверхню колонії. Зміну забарвлення спостерігали через 30 хв та 24 год. Лаказу виявляли реакцією з α -нафтолом, тирозиназу — з р-крезолом, пероксидазу — з пірогалолом та перекисом водню [1].

По закінченні експерименту розраховували:

ростовий коефіцієнт (РК) на останню добу росту за формулою:

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

де d — діаметр колонії, мм; h — висота колонії, мм; g — щільність колонії, балів; t — вік колонії, діб [1];

лінійну швидкість радіального росту (Vr , мм/добу) за формулою:

$$Vr = \frac{a-b}{t},$$

де a — радіус колонії наприкінці росту, b — радіус колонії на початку фази лінійного росту, t — тривалість лінійного росту, діб [7].

Результати досліджень та їх обговорення

З плодових тіл *L. sulphureus*, зібраних з природних субстратів в м. Києві та Київській обл. (табл. 1), виділено п'ять штамів чистих міцеліальних культур.

В усіх досліджуваних колекційних та свіжоізольованих штамів спостерігали чітку зональність росту. Інокулюм та центральна зона колонії навколо нього

утворювали більш щільний та притиснутий до середовища міцелій, інтенсивно забарвлений на СА в яскраво-жовтогарячий колір у штамів 1774, 306, 307, 308 і 1518 та в жовтогарячий у штамів 1772, 1773, 1775 та 1776. Далі від центру до краю колонії розходилися концентричні кола більш розрідженого та високого міцелію, забарвлення якого було менш інтенсивне, хоча зберігало тональність кольорів, притаманних центральній зоні колонії, в залежності від штамів. Субстратний міцелій по краю колонії був білого кольору. На МА та КГА ця ознака зберігалася, хоча міцелій мав меншу інтенсивність забарвлення. Штами 1772, 1773, 1775, 1776, на відміну від колекційних культур, на СА відзначалися порошистою структурою міцелію колонії. Цю особливість спостерігали як при подальшому зберіганні в пробірках, так і при культивуванні на інших середовищах в чашках Петрі. Колонія штаму *L. sulphureus* 1774 мала більш волокнисту структуру міцелію і зберігала цю ознаку при зазначених вище умовах. Штами, отримані з колекції культур, де вони зберігалися протягом тривалого часу на СА, мали волокнисту структуру міцеліальної колонії на всіх досліджуваних середовищах.

Таблиця 1. Субстрати, на яких зібрано плодові тіла для виділення чистих культур *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murril

№ штаму	Субстрат	Місце збору плодового тіла	Час збору
1772	тополя	парк НТУУ «КПІ», м. Київ	07.01
1773	вишня	масив Нивки, м. Київ	08.01
1774	підстилка	на території НТУУ «КПІ», м. Київ	09.01
1775	з пня, можливо тополі	околиці м. Бровари, Київська обл.	10.01
1776	з пня, можливо каштану	на території НТУУ «КПІ», м. Київ	09.01

Таблиця 2. Час обростання живильного середовища в чашці Петрі штамми *L. sulphureus*, доби

№ штаму	Середовище					
	$t = 22^{\circ}\text{C}$			$t = 28^{\circ}\text{C}$		
	СА	МА	КГА	СА	МА	КГА
1772	6	13	13	7	13	13
1773	6	7	12	6	8	9
1774	7	7	8	8	8	9
1775	6	9	8	7	9	9
1776	7	13	13	7	13	10
306	10	14	14	9	16	10
307	7	8	9	7	9	9
308	7	9	9	7	9	9
1518	6	7	8	6	7	7

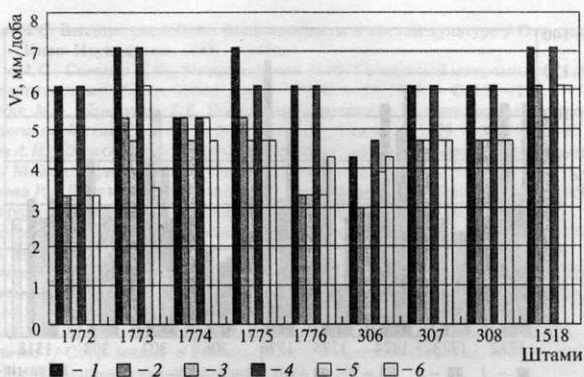


Рис. 1. Діаграма лінійної швидкості радіального росту штамів *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murril. Умовні позначення (тут і на рис. 2): 1 – CA, 2 – CA, 3 – KGA при температурі 22 °C; 4 – CA, 5 – MA, 6 – KGA при температурі 28 °C

Fig. 1. The diagram of linear speed of radial growth strains *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murril. Symbols indicate (here and on the Fig. 2): 1 – CA, 2 – CA, 3 – KGA at temperature 22 °C; 4 – CA, 5 – MA, 6 – KGA at temperature 28 °C

За час культивування для всіх досліджуваних штамів було відзначено повне обростання чашки Петрі при температурах 22 та 28 °C. При температурі 36 °C ріст колоній усіх штамів був дуже повільним або зовсім відсутнім.

Повне обростання середовища в чашці Петрі для культур *L. sulphureus* при температурах 22 та 28 °C відбувалося на 5–7 добу на CA і 9–13 добу — на KGA та MA (табл. 2). Лише для штаму 306 при температурі 22 °C цей термін становив 14 діб на CA та KGA і 16 діб — на MA. При температурі 36 °C діаметр колонії за весь час культивування для будь-якого штаму не перевищував 15–20 мм, а з часом ріст колоній припинявся, і гриб гинув.

За всіх умов культивування, крім температури 36 °C, штами зберігали означену раніше структуру міцелію. При температурі 36 °C колонія мала дуже розпоршену структуру, міцелій був дуже тонким, здебільшого субстратним, білим або дуже блідо-жовтогарячим.

На рис. 1 представлені дані щодо лінійної швидкості радіального росту штамів *L. sulphureus*. Найбільшою була швидкість росту всіх штамів на CA незалежно від температури культивування (4,3–7,1 мм/добу). Найвищими показниками (7,1 мм/добу) відзначалися штами 1773, 1775 та 1518. Проте у штаму 1774 спостерігалася однакова лінійна швидкість радіального росту на CA і MA при температурі 22 та 28 °C (5,3 мм/добу). На KGA при температурах 22 та 28 °C штаму 1774 ріс повільніше (4,7 мм/добу). Найменшу швидкість радіального росту (3,0 мм/добу) показав штаму *L. sulphureus* 306 на MA та KGA при температурі 22 °C.

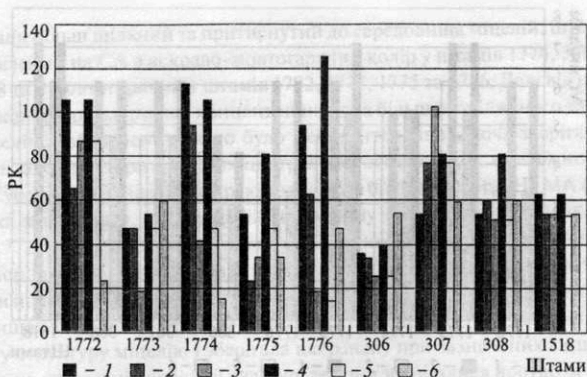


Рис. 2. Діаграма ростового коефіцієнта штамів *L. sulphureus*

Fig. 2. The diagram of growth rate strains *L. sulphureus*

За розрахунками ростового коефіцієнта побудовано діаграму (рис. 2), з якої видно, що більше значення ростового коефіцієнта штамів було на СА при 22 та 28 °С, хоча за певних умов цей показник для штамів 1773, 306, 307 та 308 був більшим на інших середовищах. Так, для штаму 1773 при температурі 22 °С РК був однаковим на СА та МА, а при 28 °С — на КГА. Для штаму 306 більший РК при температурі 28 °С був також на КГА, а для штаму 307 на тому ж середовищі — при 22 °С. Штам 308 мав більше значення РК на МА при 22 °С.

За значеннями ростового коефіцієнта на СА при температурі 28 °С штами розподілилися таким чином: штами 1772, 1774, 1776 належали до групи з високою швидкістю росту (РК > 100), 1773, 1775, 307, 308 та 1518 — з середньою (100 ≥ РК ≥ 50), а штам 306 (РК = 40) — до групи з повільною швидкістю росту (РК < 50).

При дослідженні наявності оксидаз були виявлені лаксаза і тирозиназа у штаму 1518 на СА, лаксаза на СА та тирозина на МА у 307 і тирозиназа на МА у 306. В інших штамів оксидазні ферменти не виявлено, що збігається з літературними даними [1] і пов'язане з забарвленням міцелію, яке заважає чіткому їх виявленню.

Висновки

Отримані результати дозволяють зробити такі висновки.

З трьох використаних середовищ придатнішим для культивування та отримання первинного посівного міцелію досліджених культур *L. sulphureus* є агаризоване пивне суєло, а для штамів 307 і 1773 — також і КГА. Найоптимальнішою температурою для культивування *L. sulphureus* є 28 °С.

Для подальшого дослідження перспективними є штами *L. sulphureus* 1772, 1774, 1518, 1773 як такі, що мали високу лінійну швидкість росту та великий ростовий коефіцієнт.

1. Бухало А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре / Отв. ред. — Дудка И.А. — Киев: Наук. думка, 1988. — 144 с.
2. Бухало А.С., Соломко Е.Ф., Митропольська Н.Ю. Базидіальні макромицети з лікарськими властивостями // Укр. ботан. журн. — 1996. — 53, № 3. — С. 192—201.
3. Даниляк М.І., Панащенко Т.В. Позаклітинні целюлази, β-глюкозидаза та глюкомілаза *Laetiporus sulphureus* (Dull. ex Fr.) Bond. et Sing. // Там же. — 1979. — 36, № 5. — С. 408—410.
4. Капич А.Н., Шишкіна Л.Н. Фосфолипиди мицелія дереворазрушаючих базидіомицетів // Микол. и фитопатол. — 1993. — 27, № 3. — С. 32—37.
5. Маслова Р.А. Рост и развитие некоторых афиллофоровых грибов на различных питательных средах: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Л., 1972. — 25 с.
6. Методи експериментальної мікології: Справочник / Под ред. В.И. Билай. — Киев: Наук. думка, 1982. — 550 с.
7. Соломко Е.Ф., Ломберг М.Л., Митропольська Н.Ю., Чоловська О.В. Ріст окремих видів лікарських макромицетів на поживних середовищах різного складу // Укр. ботан. журн. — 2000. — 57, № 2. — С. 119—126.
8. Тихонова О.В., Лурье Л.М., Еришова Е.Ю. и др. Изучение глубинной культуры *Laetiporus sulphureus* // Совр. микол. в России: I Съезд микологов (Москва, 2002 г.): Тез. докл. — М.: Изд-во Национ. акад. микологии, 2002. — 257 с.
9. Федотов О.В., Негруцький С.Ф., Бойко М.І. Порівняльна характеристика грибів порядку *Aphyllphorales* — продуцентів молокозгортаючих ферментів // Укр. ботан. журн. — 1997. — 54, № 2. — С. 145—153.
10. Semerdzieva M., Veselský J. Léčivé houby dřeva a nyní. — Praha: Academia, 1986. — 177 s.
11. Wasser S.P., Weil A.L. Therapeutic effects of substances occurring in Higher Basidiomycetes Mushrooms: a modern perspective // Critical Reviews in Immunology. — 1999. — 19. — P. 65—96.

Рекомендує до друку

Надійшла 08.09.2003

А.С. Бухало

Л.П. Дзыгун

Национальный технический университет Украины
«Киевский политехнический институт»

ОСОБЕННОСТИ ДЕРЕВОРАЗРУШАЮЩЕГО БАЗИДИОМИЦЕТА *LAETIPORUS SULPHUREUS* (BULL.: FR.) MURRIL В КУЛЬТУРЕ

Культуральные особенности девяти штаммов *Laetiporus sulphureus* исследовали на натуральных и комплексной питательных средах (СА, МА и КГА) при различных температурах (22, 28 и 36 °С). Определены морфологические особенности грибной колонии и скорость радиального роста мицелия различных штаммов *L. sulphureus*. Наиболее оптимальной температурой для роста мицелия *L. sulphureus* была 28 °С. При помощи качественных цветных реакций установлено наличие оксидаз. Для дальнейших исследований, как наиболее перспективные, отобраны четыре штамма *L. sulphureus* (1712, 1774, 1518 и 1773).

Л.Р. Dzyg

National Technical University of Ukraine «Kyiv polytechnical institute»

PECULIARITIES OF WOOD-DESTROYING BASIDIOMYCETES *LAETIPORUS SULPHUREUS* (BULL.: FR.) MURRIL IN CULTURE

Natural and complex nutritive media (MA, CA, PGA) were used for the investigation of cultural peculiarities of 9 *Laetiporus sulphureus* strains at various temperatures (22, 28 and 36 °C). The morphological features of mushroom colonies and rate of radial mycelium growth in different strains of *L. sulphureus* were established. The better temperature for *L. sulphureus* radial mycelium growth was determined as 28 °C. The presence of several oxydases were revealed by the method of coloured reactions. 4 *L. sulphureus* strains (1772, 1774, 1518 and 1773) were selected for further researches.