

О.М. Алексеєнко, І.В. Жерносекова, А.І. Вінніков

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара,
пр. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ, 49050, Україна,
тел.: +38 (056) 374 97 34, e-mail: microviro@rambler.ru

ВПЛИВ ЕКЗОМЕТАБОЛІТІВ *STREPTOMYCES RECIFENSIS* VAR. *LYTICUS* НА РІСТ ГРИБА *PLEUROTUS OSTREATUS*

*Встановлено стимулювальний ефект культуральної рідини штамів стрептоміцету *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* у відношенні ростових показників міцелію їстівного гриба роду *Pleurotus ostreatus*. Показники швидкості росту, діаметру колоній, ростового коефіцієнту *P. ostreatus* зростають, в порівнянні з контролем, у присутності екзометаболітів досліджуваних штамів стрептоміцету.*

*Ключові слова: культуральна рідина, стрептоміцет, *Pleurotus ostreatus*, літичні ферменти, міцелій.*

Мікроорганізми є потенційними продуцентами біологічно-активних речовин — стимуляторів метаболічних процесів у живих організмів. Відомо, що біопрепарати, створені на основі екзо- та ендометаболітів бактерій та грибів, здатні поліпшувати ріст та розвиток рослин, тварин, грибів та мікроорганізмів [6, 9, 11, 14]. Застосування стимуляторів мікробного походження в рослинництві, тваринництві, рибористві та бджільництві перспективно у зв'язку із спрощенням їх отримання, дешевизною, високими детоксикаційними властивостями в організмі, а також здатністю легко зв'язуватися у клітині і катаболізуватися [13]. З огляду на те, що стрептоміцети є активними продуцентами антибіотиків, ферментів, вітамінів, амінокислот, гетероауксинів та інших біологічно активних речовин, вони є важливими об'єктами біотехнології.

В літературі інформація про вплив на ріст їстівних грибів метаболітів стрептоміцетів відсутня. З кожним роком обсяг виробництва їстівних грибів зростає, що потребує більш глибокого вивчення біології культур грибів та удосконалення методів їх вирощування [1, 3]. На підставі проаналізованих даних літератури, зроблено висновок щодо можливості використання культуральної рідини штамів стрептоміцету *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* як стимулятора ростових процесів *Pleurotus ostreatus* (глива звичайна).



Метою даної роботи було визначення впливу екзометаболітів стрептоміцету *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* на ріст міцелію їстівного гриба *P. ostreatus* (глива звичайна).

Матеріали і методи

В роботі була використана 72-годинна культуральна рідина (КР) штамів *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435 (батьківський) і 2P-15 (рифампіциностійкий) відділена від біомаси при центрифугуванні та агарова культура грибного міцелію гливи звичайної *P. ostreatus* (штам Китайський чорний) віком три тижні.

Штам *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435 синтезує комплекс літичних ферментів (протеїнази, амілази, ліпази, целюлази, глікозидази, ендопептидази) та стимулятор росту, які проявляють бактеріо-, дріжджелітичну та рістстимулюючу активність [12, 17]. Рифампіциностійкий штам *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 також проявляє стимулюючу дію, синтезує високоактивні глікозидази, ендопептидази, протеази та не продукує дріжджолітичні ферменти [5, 12].

Для виявлення впливу екзометаболітів стрептоміцету на ріст міцелію гливи звичайної, останній вирощували на твердому живильному середовищі такого складу: відвар картоплі та агар-агар (1000 мл; 20 г/л) [1, 8], в який до стерилізації додавали культуральну рідину штаму *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435 або 2P-15 в концентраціях: 0,001%, 0,01%, 0,1%, 1%. Суміш автоклаували при 1,5 атм протягом 40 хв. Як контроль використовували міцелій вирощений на картопляному агарі без додавання КР. Проводили засів трьохтижневого агаризованого міцелію штаму Китайський чорний блочком діаметром 8 мм, розташовуючи його повітряним міцелієм донизу [4]. Спостерігали за ростовими змінами *P. ostreatus* під впливом різних концентрацій КР штамів *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435 і 2P-15 у динаміці розвитку гриба при 27 °C [15, 16]. Діаметр колонії гриба вимірювали у двох напрямках у кожному з 3-х повторів на 3-ю, 4-ту та 5-ту добу.

Швидкість лінійного росту визначали за формулою [10]:

$$V=S/t,$$

де V — швидкість росту (мм/доба);

S — діаметр колонії (мм);

t — час культивування (доба);

Густину колонії відмічали за 3-х бальною системою (1 — рідка, 2 — середня, 3 — щільна). На основі отриманих даних обчислювали ростовий коефіцієнт (РК) за формулою [2]:

$$PK=d \cdot h \cdot g/t,$$

де d — діаметр колонії (мм);



- h — висота колонії (1 мм);
- g — щільність колонії (бал);
- t — вік колонії (год);

Досліди проводили у 3-х повторах та обчислювали статистично з використанням t-критерію Стьюдента з вірогідністю 95% [7].

Результати та їх обговорення

В результаті проведеного експерименту було виявлено пряму кореляцію залежності збільшення діаметру колонії гливи від концентрації КР штаму 2P-15, внесеної у тверде картопляне середовище. Міцеліальні колонії гливи найбільшого діаметру ($54,3 \pm 1,0$ мм та $50,8 \pm 0,3$ мм) вирости на 5-ту добу культивування при додаванні у середовище культуральної рідини штаму 2P-15 в концентрації 1,0% та 0,1%, відповідно, що достовірно перевищило контроль на 11% та 4% (табл. 1). Найменший діаметр колонії $48,5 \pm 0,8$ мм встановлено при додаванні у середовище мінімальної концентрації культуральної рідини, що практично співпадало з контрольним рівнем.

Таблиця 1

Вплив культуральної рідини *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 на ріст міцелію *Pleurotus ostreatus*

Table 1

Influence of cultural liquid *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 on the growth of mycelium *Pleurotus ostreatus*

Концентрація культуральної рідини (%)	Діаметр колоній (мм)			Швидкість росту колоній (мм/доба)			Густина колонії (бал), 5 доба	Ростовий коефіцієнт (%), 5 доба
	3 доба	4 доба	5 доба	3 доба	4 доба	5 доба		
0,001	$18 \pm 0,3$	$29,5 \pm 0,3$	$48,5 \pm 0,8$	$6,00 \pm 0,09^*$	$7,38 \pm 0,14$	$9,7 \pm 0,15$	2	81
0,01	$17,7 \pm 0,9$	$30,5 \pm 1,5$	$49,2 \pm 0,7$	$5,89 \pm 0,06$	$7,63 \pm 0,07$	$9,8 \pm 0,18$	2	82
0,1	$19,3 \pm 0,5$	$31,0 \pm 0,7$	$50,8 \pm 0,3^*$	$6,44 \pm 0,06$	$7,75 \pm 0,19$	$10,2 \pm 0,27$	3	127
1,0	$20,5 \pm 0,1^*$	$33,5 \pm 0,4^*$	$54,3 \pm 1,0^*$	$6,84 \pm 0,17$	$8,38 \pm 0,5$	$10,87 \pm 0,35^*$	3	136
контроль	$19,2 \pm 0,4$	$30,5 \pm 0,8$	$49,0 \pm 0,6$	$6,4 \pm 0,1$	$7,63 \pm 0,07$	$9,8 \pm 0,12$	2	82

Примітка:* — різниця між контрольним і дослідним варіантами достовірна на 0,05% рівні значимості.

Згідно отриманих даних було визначено швидкість росту міцелію гливи звичайної на 5-ту добу. У контролі вона становила $9,8 \pm 0,12$ мм/добу. Найвищий показник швидкості росту — $10,87 \pm 0,35$ мм/добу перевищував показник контролю на 11% і спостерігався при додаванні 1% культуральної рідини, що призвело до максимального збільшення діаметру колонії.



метру колонії. Крім того, було визначено густину колонії гриба за трьох бальною шкалою. У контрольних та дослідних зразках з концентраціями КР 0,001% та 0,01% колонії були більш «прозорими», не пухнастими і ватяними, що візуально відповідало двом балам. При розрахунку ростового коефіцієнту найвище значення 136% отримано за найвищої концентрації культуральної рідини, що перевищувало контроль в 1,7 разу.

В порівнянні з наведеними вище результатами досліджень, при використанні культуральної рідини батьківського штаму *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435 стимулювальний ефект отримали при низьких досліджених концентраціях. Так, концентрації КР штаму *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435 0,001% і 0,01% були ефективнішими за вищі (0,1% та 1%). Діаметр колоній гриба на 5-ту добу становив $49,3 \pm 0,1$ мм, $50,2 \pm 0,3$ мм, що недостовірно перевищувало контроль лише на 2% та 4%, відповідно. Найменший діаметр колонії — $48,0 \pm 0,5$ мм отримано при додаванні у середовище 0,1% КР, отже ріст гливи не досягав контрольного значення (табл. 2).

Таблиця 2

Вплив культуральної рідини *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435 на ріст міцелію *Pleurotus ostreatus*

Table 2

Influence of cultural liquid *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435 on the growth of mycelium *Pleurotus ostreatus*

Концентрація культуральної рідини (%)	Діаметр колоній (мм)			Швидкість росту колоній (мм/доба)			Густина колонії (бал), 5 доба	Ростовий коефіцієнт (%), 5 доба
	3 доба	4 доба	5 доба	3 доба	4 доба	5 доба		
0,001	$18,0 \pm 0,3^*$	$32,0 \pm 0,3^*$	$49,3 \pm 0,1$	$6,00 \pm 0,09$	$7,88 \pm 0,07$	$9,87 \pm 0,02^*$	2	82
0,01	$19,3 \pm 0,2$	$31,2 \pm 0,7$	$50,2 \pm 0,3^*$	$6,44 \pm 0,06$	$7,79 \pm 0,08$	$10,03 \pm 0,07^*$	3	126
0,1	$18,3 \pm 0,5$	$29,5 \pm 0,6$	$48,0 \pm 0,5$	$6,11 \pm 0,15$	$7,37 \pm 0,14$	$9,60 \pm 0,10$	3	120
1,0	$18,7 \pm 0,6$	$30,3 \pm 0,9$	$48,5 \pm 0,8$	$6,22 \pm 0,20$	$7,59 \pm 0,22$	$9,70 \pm 0,15$	3	121
контроль	$19,0 \pm 0,1$	$30,0 \pm 0,5$	$48,5 \pm 0,5$	$6,33 \pm 0,10$	$7,42 \pm 0,20$	$9,71 \pm 0,05$	2	81

Примітка: * — різниця між контрольним і дослідним варіантами достовірна на 0,05% рівні значимості.

Показник швидкості росту на 5-ту добу склав $10,03 \pm 0,17$ мм/добу, що встановлено при додаванні 0,01% КР штаму *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435. Тобто, спостерігалось незначне підвищення швидкості росту гливи на 3% у порівнянні з контролем, що і було наслідком незначного



збільшення діаметра колоній. У той же період, найнижчі показники мали колонії гриба, які виростили на живильному середовищі з 0,1% та 1% КР. Крім того, зразки з внесенням 0,01%, 0,1% та 1% культуральної рідини мали більш щільний ватоподібний міцелій ніжно-білого забарвлення, який візуально оцінено в три бали.

Ростовий коефіцієнт 126% був максимальним при додаванні 0,01% культуральної рідини штаму *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435, що перевищило контроль в 1,6 разу.

Таким чином, можна констатувати, що для культивування їстівного гриба роду *P. ostreatus* можливо використання метаболітів стрептоміцету, що містяться у КР штамів *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435 та 2Р-15, як стимулювальні речовини ростових процесів гриба. Встановлено, що показники росту гриба значно зростали при дії КР штаму *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2Р-15. З отриманих експериментальних даних можна зробити висновок, що ефект стимуляції залежить від штамових особливостей продуцентів біологічно-активних речовин та концентрації КР, що вноситься у живильне середовище гливи.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бисько Н.А., Билай В.Т., Митропольская Н.Ю. Рекомендации по выращиванию шампиньонов и вешенки. — К.: ООО Международная консультативно-производственная группа «Грибы», 2001. — 38 с.
2. Биттеева М.Б., Бирюков В.В., Черкезов А.А., Ширшиков Н.В., Щерблякин И.Н., Горшина Е.С., Шушеначева Е.В., Стехновская Л.Д., Китайкин В.М., Зюкова А.А. Способ получения белковой биомассы гриба: Патент на изобретение РФ № RU 2189395 // 2000.07.31
3. Бухало А.С., Бисько Н.А., Бухало А.С., Соломко Э.Ф. Культивирование съедобных и лекарственных грибов. — К.: Урожай, 2004. — 128 с.
4. Гарибова Л.В. Выращивание грибов. — К.: Вече, 2005. — 96 с.
5. Жерносекова И.В. Изменчивость продуцента литических ферментов *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* и его селекция: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07. / К., 2002. — 20 с.
6. Косенко Л.В., Мандровская Е.Д., Кругова Е.Д., Варбанец Л.Д. Действие стимулятора роста растений бактозоля на *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* 250a и его азотоустойчивый мутант М-71 в условиях различной обеспеченности азотом // Микробиология. — 2003. — Т. 72, № 1. — С. 40.
7. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1990. — 352 с.
8. Морозов А.И. Выращивание вешенки. Донецк: Сталкер, 2001. — 48 с.
9. Патика В.П., Копилов Е.П., Патика Т.І., Черницький Ю.О., Надкерничний С.П. Мікробні препарати — важливий компонент біологізації технологій вирощування ярої пшениці // Агроекологічний журнал, 2004, № 4. — С. 3—4.



10. *Перт С.Дж.* Основы культивирования микроорганизмов и клеток. — М.: Мир, 1978. — 332 с.

11. *Цавкелова Е.А., Климова Ю.С., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И.* Микроорганизмы — продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение // Прикл. биохим. и микробиол. — 2006. — Т. 42, № 2. — С. 133—147.

12. *Черногор Н.П.* Вивчення рістстимулюючих властивостей лізоenzимного препарату *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* Автореф. дис.... канд. біол. наук 03.00.07/ІМВ НАНУ. — К., 1998. — 16 с.

13. *Черногор Н.П., Бабенко Ю.С.* Влияние условий культивирования микоорганизмов на проявление ростстимулирующей активности лизоenzимного препарата *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435 // Микробиол. журнал, 1996. — Т. 58, № 5. — С. 44—50.

14. *Чуйко Н.В., Бега З.Т., Булавенко Л.В., Курдиш І.К.* Вплив бактеріального препарату комплексної дії на ріст декоративних рослин // Мікробіол. і біотехнол. — 2010, № 2. — С. 43—50.

15. *Deacon J.W.* Fungal biology. — 4th ed. — Edinburgh: Blackwell Publishing Ltd., 2006. — 380 p.

16. *Minter D.W., Dudka I.O., Andrianova T.V.* Mycology in Ukraine. — CD: PDMS Publishing, 2003. — 826 p.

17. *Sokolova I.E., Kylochek T.P., Vinnikov A.I.* Biosynthesis activity of *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* // Микробиол. журн., 2004. — Т. 66, № 6. — С. 10—17.

Е.Н. Алексеенко, И.В. Жерносекова, А.И. Винников

Днепропетровский национальный университет имени Олеса Гончара,
пр. Гагарина, 72, Днепропетровск, 49050, Украина,
тел.: +38 (056) 374 97 34, e-mail: microviro@ Rambler.ru

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ *STREPTOMYCES RECIFENSIS* VAR. *LYTICUS* НА РОСТ ГРИБА *PLEUROTUS OSTREATUS*

Реферат

Установлен стимулирующий эффект культуральной жидкости штаммов стрептомицета *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* в отношении ростовых показателей мицелия съедобного гриба рода *Pleurotus ostreatus*. Показатели скорости роста, диаметра колоний, ростового коэффициента *P. ostreatus* увеличиваются по сравнению с контролем в присутствии экзозимов исследуемых штаммов стрептомицета.

Ключевые слова: культуральная жидкость, стрептомицет, *Pleurotus ostreatus*, литические ферменты, мицелий.



O.M. Alekseenko, I.V. Zhernosekova, A.I. Vinnikov

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University,
72, Gagarina str., Dnipropetrovsk, 49050, Ukraine,
tel.: +38 (056) 374 97 34, e-mail: microviro@rambler.ru

**STUDY OF *STREPTOMYCES RECIFENSIS* VAR. *LYTICUS*
EXOMETABOLITES INFLUENCE ON THE GROWTH
OF MUSHROOM *PLEUROTUS OSTREATUS***

Summary

Stimulating effect of cultural liquid of strains *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* was shown relatively to the growth parameters of mushroom *Pleurotus ostreatus*. Growth speed, colony diameter, the coefficient of growth of *P. ostreatus* was increased in the presence of streptomycetes strains exometabolites compared with control.

Key words: cultural liquid, streptomycetes, *Pleurotus ostreatus*, lytic enzymes, mycelium.

