

УДК 579.64:579.24

Бактерии рода *Azospirillum* в оптимизации искусственного культивирования высших грибов-ксилотрофов

© 2020 О. М. ЦИВИЛЕВА^{1,*}, А. Н. ШАТЕРНИКОВ¹, В. Е. НИКИТИНА¹¹ФГБУН Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, 410049

*e-mail: tsivileva@ibppm.ru

Поступила в редакцию 30.08.2019 г.

После доработки 16.01.2020 г.

Принята к публикации 24.03.2020 г.

Выявлена возможность и подобраны условия совместного погруженного культивирования базидиомицетов *Flammulina velutipes*, *Ganoderma lucidum* и *Pleurotus ostreatus* с бактериями *Azospirillum brasilense*. В условиях жидких сокультур, оптимизированных по составу среды и концентрации бактериального инокулюма, азоспириллы изученных штаммов активно двигались и образовывали скопления вблизи гиф грибов. Концентрация клеток бактериальных штаммов при прочих равных условиях эксперимента оказывала существенное влияние на рост бинарных культур. Выращивание *F. velutipes* совместно с *A. brasilense* Sp245 при оптимальной (0,5 об.%) концентрации бактериальных клеток в инокулюме ($A_{600} = 1,0$) позволило получить величину сухой биомассы, в 2,35 раза превышающую величину в контроле. Активному росту смешанной культуры грибов с изучаемыми штаммами азоспирилл благоприятствовала среда на основе *D*-глюкозы и *D*-фруктозы (в массовом соотношении 1 : 1) и *L*-аспаргина. Оценены характеристики развития плодовых тел *P. ostreatus* и снижение контаминации с использованием азоспирилл. Оказалось, что наибольшей эффективностью по параметрам накопления биомассы погруженного мицелия, скорости освоения зернового субстрата и интенсивности плодоношения обладали смешанные бактериально-грибные культуры *P. ostreatus* с *A. brasilense* SR80, используемые в качестве посевного материала. Полученные данные позволяют судить о высоком потенциале применения бинарных бактериально-грибных культур для эффективного получения мицелиальной биомассы и плодоношения базидиомицетов.

Ключевые слова: *Flammulina*, *Ganoderma*, *Pleurotus*, *Azospirillum*, сокультура, погруженное культивирование, плодоношение

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-2-16-25

Ксилотрофные базидиомицеты интересуют биотехнологов не только в качестве источника ценных пищевых ингредиентов [1, 2], но и как основа для получения высокоэффективных лекарственных препаратов [3]. В течение нескольких десятилетий проводятся перспективные биомедицинские исследования субстанций из ксилотрофных грибов – представителей родов *Flammulina*, *Ganoderma*, *Pleurotus* [4, 5]. Необходимость искусственного культивирования *P. ostreatus* обусловлена высокой продуктивностью этой культуры, обладающей ценными пищевыми свойствами [6]. Оптимизация условий роста базидиомицета *P. ost-*

reatus на жидких средах направлена на разработку технологии погруженного культивирования мицелия с целью получения не только биомассы кормового и пищевого назначения, но и разнообразных физиологически активных препаратов [7, 8] и биотехнологически ценных продуктов [9]. Погруженное культивирование известно как быстрый и эффективный метод производства посевного материала для грибоводства [10, 11]. Использование экологически чистых биологических способов стимуляции роста мицелия базидиомицетов будет способствовать улучшению технологии выращивания путем сокращения продолжительности

Список сокращений: КЖ – культуральная жидкость; НТА – нитрилтриацетат; Asn – *L*-аспарагин; Fru – *D*-фруктоза; Glc – *D*-глюкоза; PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) – ризобактерии, способствующие росту растений.

культивирования грибов и одновременного подавления роста контаминирующей микрофлоры. Ряд этапов искусственного культивирования съедобных базидиомицетов проводят в нестерильных условиях, что неизбежно сопряжено с загрязнением культур посторонней микрофлорой. Снизить до минимума контаминацию можно за счет выращивания мицелия базидиомицета совместно со стимулирующими рост бактериями.

Известно, что бактерии, вовлеченные в ассоциативные и симбиотические отношения с корневой системой растения, могут способствовать улучшению его метаболизма и ростовых характеристик. Такие бактерии объединяют в условную несистематическую группу Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), то есть ризобактерии, способствующие росту растений (см., напр., [12, 13]). Бактерии рода *Azospirillum* – PGPR, грамотрицательные микроаэрофильные бактерии, – вступают в ассоциации со многими растениями, в том числе из умеренных климатических зон, и хорошо известны своими фитостимулирующими свойствами (см., напр., [14]). Признана целесообразность изучения разных аспектов благоприятного воздействия PGPR на микоризные базидиомицеты [15, 16]. Не менее обширна группа не образующих микоризу высших грибов. Многие лекарственные и съедобные базидиомицеты являются ксилотрофами. Ассоциации ксилотрофных базидиомицетов и бактерий изучены несравнимо хуже, чем микоризосферные сообщества, и описаны в единичных работах [17, 18].

Системное изучение совместного культивирования базидиомицетов с бактериями рода *Azospirillum* в искусственных условиях в литературе не было описано до начала исследований в лаборатории микробиологии ИБФРМ РАН двойной культуры штаммов *Lentinula edodes* F-249 с *Azospirillum brasilense* Sp7 [19, 20]. Изучена также роль лектин-углеводного распознавания как биоспецифического взаимодействия при совместном твердофазном культивировании *A. brasilense* Sp245 (и ряда мутантных штаммов) с базидиомицетом *Grifola frondosa* 0917 [21]. Анализ современной научной литературы о совместном культивировании ксилотрофных базидиомицетов и бактерий свидетельствует о недостаточной разработанности исследований по ростостимулирующим свойствам разных штаммов азоспирилл в отношении съедобных и/или лекарственных высших грибов; по факторам, стимулирующим подавление контаминантной микрофлоры в двойной культуре; по выявлению наиболее эффективных штаммов азоспирилл в отношении грибов разных систематических групп.

Цель работы состояла в выявлении возможности и оптимизации условий совместного погруженного культивирования базидиомицетов *Flammulina velutipes*, *Ganoderma lucidum* и *Pleurotus ostreatus* с бактериями *Azospirillum brasilense* и оценке действия бактерий на ростовые показатели грибов и плодоношение *P. ostreatus*.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектами исследования служили базидиомицеты *Ganoderma lucidum* 1315, *Flammulina velutipes* 0535 (коллекция кафедры микологии и альгологии Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва), *Pleurotus ostreatus* НК352 (ИБФРМ РАН), бактерии *A. brasilense* Sp245 и *A. brasilense* SR80 (Специализированная научная коллекция ИБФРМ РАН (СМ IBPPM); WFCC номер 975, WDCM номер 1021). Культуры гриба поддерживали на агаризованном пивном сусле (4 градуса по Баллингу) в темноте, бактерий – на питательных средах, рекомендуемых СМ IBPPM.

Для выращивания культур использовали среды следующего состава (г/л воды):

- сусло пивное (1,2 градуса по Баллингу) [22] (среда **I**);
- *D*-глюкоза – 9,0, *L*-аспарагин – 1,5 [23] (среда **II**);
- *D*-глюкоза – 4,5, *D*-фруктоза – 4,5, *L*-аспарагин – 1,5 (среда **III**);
- *D*-глюкоза – 9,0, *L*-аспарагин – 1,5, K_2HPO_4 – 1,0, K_2HPO_4 – 1,0, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ – 0,002; $\text{Fe(III)-нитрилотриацетат (НТА)}$ – 0,03, CaCl_2 – 0,02, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2, NaCl – 0,1, NH_4Cl – 1,0 (среда **IV**);
- *D*-глюкоза – 4,5, *D*-фруктоза – 4,5, *L*-аспарагин – 1,5, K_2HPO_4 – 1,0, K_2HPO_4 – 1,0, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ – 0,002, Fe(III)-НТА – 0,03, CaCl_2 – 0,02, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2, NaCl – 0,1, NH_4Cl – 1,0 (среда **V**);
- яблочная кислота – 3,76, дрожжевой экстракт – 0,1, K_2HPO_4 – 0,4, K_2HPO_4 – 0,4, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ – 0,002, Fe(III)-НТА – 0,03, CaCl_2 – 0,02, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2, NaCl – 0,1 [24] (среда **VI**);
- *D*-глюкоза – 10, дрожжевой экстракт – 1,0 (среда **VII**);
- *D*-глюкоза – 2,5, дрожжевой экстракт – 2,5, пептон – 5,0 (среда **VIII**);
- *D*-глюкоза – 5,0, дрожжевой экстракт – 5,0, пептон – 10,0 [25, 26] (среда **IX**);
- мука пшеничная высшего сорта – 20,0 (среда **X**).

Плотные среды получали, добавляя в питательные растворы 1,8–2,0% (m/v) агара.

Опенк зимний (*F. velutipes*), вешенку устричную (*P. ostreatus*) и трутовик лакированный (*G. lucidum*) выращивали погруженным способом при температуре 28 °С в течение 21 сут в случае

монокультур гриба, либо 7 сут до объединения с *A. brasilense* Sp245 или *A. brasilense* SR80. После объединения бактериально-грибные культуры выращивали в течение 14 сут.

В качестве инокулята при посеве гриба использовали 14-суточные культуры, выращенные на агаризованном пивном сусле (4 градуса по Баллингу). Глубинные посевные бактериальные культуры выращивали до экспоненциальной фазы роста при температуре 30 °С в течение 18 ч на модифицированной синтетической среде (VI) с рН 7,0. Смешанную культуру на жидких средах получали, подсевая *A. brasilense* к погруженной культуре гриба, либо в виде смыва с агаризованных сред VI или VIII, либо в виде 24-часовой культуры на жидкой среде VI.

Скорость роста при глубинном культивировании определяли в соответствии с рекомендациями [22] по накоплению сухой биомассы в единицу времени в зависимости от продолжительности выращивания. Содержимое колб для определения сухой биомассы фильтровали через предварительно взвешенные на аналитических весах фильтры, высушивали до постоянной массы и вновь взвешивали, определяли прирост биомассы по сравнению с контрольными образцами данной среды.

Биомассу двойных культур базидиомицетов с *A. brasilense* Sp245 или *A. brasilense* SR80 определяли на жидких химически детерминированных средах II, III, IV и V; для сравнения использовали общепринятую для базидиомицетов органическую среду I. Величина оптического поглощения (при $\lambda = 600$ нм) исходной бактериальной суспензии, измеряемая в каждой серии независимых экспериментов, составляла около 1,0. Варианты опыта условно обозначали А1, А2 и А4 при объеме вносимого в среду инокулята 0,5, 1,0 и 2,0% (v/v) соответственно.

Для получения плодовых тел *P. ostreatus* посевной мицелий производился по стандартной технологии на зерне пшеницы твердых сортов. Зерно выдерживали в горячей (80 °С) воде в течение 20 мин, подсушивали, распределяли по специальным емкостям с широким горлом, закупоривали и подвергали дробному автоклавированию при избыточном давлении 1 атм в течение 30 мин дважды с интервалом 24 ч. Для инокуляции зернового субстрата использовали погруженные монокультуры базидиомицетов или бактериально-грибные культуры, выращенные на среде X. В процессе роста через 3, 5, 7, 9 и 14 сут зерновой субстрат встряхивали для равномерной колонизации и визуального выявления загрязнения конкурирующей микрофлорой. Культивирование проводили при 24–26 °С в течение 2 недель.

Субстратом для получения плодовых тел служила лузга подсолнечника. Выращивание плодовых тел производили в лабораторных условиях по стандартной методике на пастеризованном при 95 °С в течение 4 ч субстрате, инокулированном зерновым 14-суточным мицелием в соотношении 10% от объема субстрата. После 2 недель выращивания в темноте емкости с колонизированной лузгой подсолнечника выставляли во влажную камеру на свет. Наблюдали за появлением примордиев, вели ежедневное наблюдение за ростом плодовых тел. Урожайность оценивали в пересчете на 1 кг субстрата [27].

Световую микроскопию образцов культур проводили при увеличении $\times 20$ и $\times 40$ на микроскопе Leica DM6000B (Leica Microsystems, Германия) в Центре коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» ИБФРМ РАН. Для анализа брали по 3 образца, возраст двойной культуры составлял 14 сут.

Обработка результатов. Опыты по измерению биомассы проводили в 5–10 повторах, все остальные – в 3 повторах. Для количественной обработки данных использовали программу Microsoft Excel 2003. При статистической обработке полученных результатов пользовались методом расчета стандартного отклонения среднего арифметического при уровне доверительной вероятности 0,95.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор объектов исследования

Выбор грибных объектов для исследования обусловлен ценными свойствами культивируемых базидиомицетов, что в полной мере относится к опенку зимнему, трутовика лакированному и вешенке устричной. Выбор азоспирилл как бактериального объекта исследования проводили на основе принадлежности к виду, положительно зарекомендовавшему себя в проведенных нами ранее исследованиях с базидиомицетом *Lentinula edodes* [28, 29]. Для совместного культивирования с ксилотрофными базидиомицетами выбрали два штамма: модельный объект изучения эндофитного симбиоза *A. brasilense* Sp245 и эпифитный штамм *A. brasilense* SR80 [30].

Ростовые показатели сокультур в зависимости от состава среды

Прежде всего необходимо было решить задачу экспериментального подтверждения возможности выращивания двойной бактериально-грибной

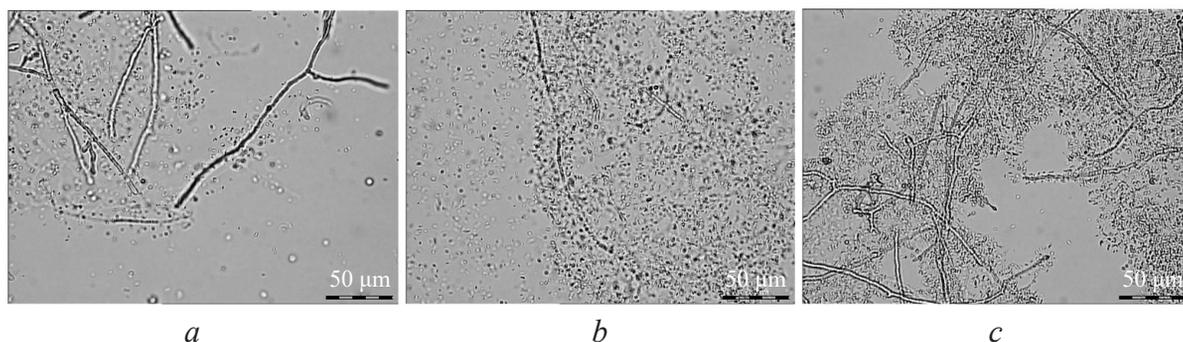


Рис. 1. Световая микроскопия сокультур *Pleurotus ostreatus* HK352 и *Azospirillum brasilense* SR80 после 14 сут совместного выращивания на углеводно-аспарагиновой среде V в вариантах опыта A1 (a), A2 (b) и A4 (c).

Fig. 1. Light microscopy of co-cultures of *Pleurotus ostreatus* HK352 and *Azospirillum brasilense* SR80 in 14 days of joint growth on the carbohydrate-asparagine medium V at A1 (a), A2 (b) and A4 (c) modes.

культуры для изучаемых биологических объектов. Подбирая условия совместного культивирования базидиомицетов и азоспирилл, использовали как описанные в литературе, так и модифицированные среды, перечисленные выше, предположительно подходящие для оптимизации получения мицелия в погруженной культуре и/или бактериальных суспензий.

Судя по количественным характеристикам ростовых процессов культур и данным световой микроскопии, наиболее благоприятными средами для роста и грибных, и бактериальных штаммов оказались углеводно-аспарагиновые среды III и V, в меньшей степени – среда VII. Среда с дрожжевым экстрактом, а именно VIII и в меньшей степени IX, подходили для роста культур обоих бактериальных штаммов. Модифицированная малатная среда VI была использована для получения посевных бактериальных суспензий, среда с пшеничным отваром X – для получения посевных моно- и бинарных культур *P. ostreatus* на первом этапе биотехнологической схемы выращивания плодовых тел.

На основе данных световой микроскопии судили о достаточно активном росте азоспирилл на тех же средах, на которых мицелий грибов в присутствии этих бактерий также развивался (рис. 1).

Углеводно-аспарагиновые среды были в разной степени пригодны для увеличения (в сравнении с контрольным вариантом) сухой биомассы в двойных культурах *F. velutipes* с эндофитным штаммом *A. brasilense* Sp245 и эпифитным штаммом *A. brasilense* SR80 – в последнем случае удалось получить прирост на 3% в одном варианте опыта с минимальной исходной плотностью бактериальной суспензии (A1) на среде V (рис. 2, вариант V-s2).

Если в составе жидких питательных сред источник углерода был представлен только глю-

козой при исключении фруктозы, но суммарное содержание углеводов сохранялось (среды II и IV), то при выращивании погруженной культуры опенка зимнего прослеживалось наиболее выраженное снижение накопления мицелиальной биомассы в бинарных культурах по сравнению с контрольными вариантами опыта (рис. 2, столбцы под номерами II, IV).

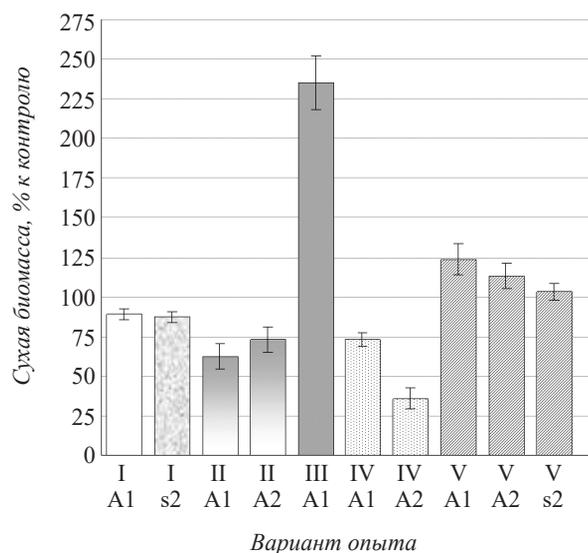


Рис. 2. Накопление биомассы погруженными сокультурами *Flammulina velutipes* 0535 с *Azospirillum brasilense* Sp245 или *A. brasilense* SR80 (s2) в вариантах опыта A1 и A2 через 21 сут на среде с пивным сусликом (1,2 градуса по Баллингу) I и углеводно-аспарагиновых средах с Glc (II, IV) или с Glc+Fru (III, V). Вариант s2 соответствует A1, если специально не обозначено.

Fig. 2. Biomass accumulation by submerged co-cultures of *Flammulina velutipes* 0535 with *Azospirillum brasilense* Sp245 or *A. brasilense* SR80 (s2) at A1 and A2 modes in 21 days on barley wort medium (1.2 Brix) (I) and on the carbohydrate-asparagine media based on Glc (II, IV) or Glc+Fru (III, V). s2 mode corresponds to the A1, if not specially indicated.

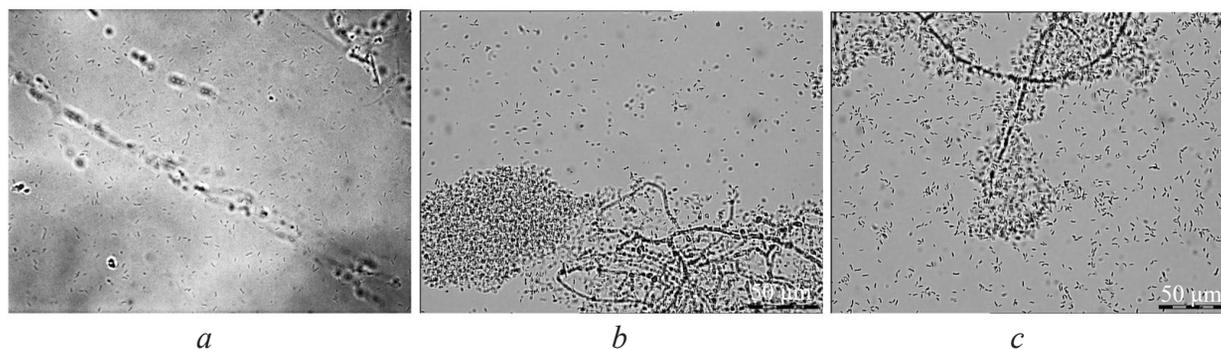


Рис. 3. Световая микроскопия сокультур *Ganoderma lucidum* 1315 с *Azospirillum brasilense* SR80 (a) или *A. brasilense* Sp245 (b, c) после 14 сут совместного выращивания на углеводно-аспарагиновой среде III в вариантах опыта A2 (a, b) и A4 (c).

Fig. 3. Light microscopy of co-cultures of *Ganoderma lucidum* 1315 with *Azospirillum brasilense* SR80 (a) or *A. brasilense* Sp245 (b, c) in 14 days of joint growth on the carbohydrate-asparagine medium (III) at A2 (a, b) and A4 (c) modes.

Эксперимент с выращиванием *F. velutipes* совместно с *A. brasilense* Sp245 в оптимальном варианте «*A. brasilense* Sp245, A1» (рис. 2, III-A1) позволил получить значительное накопление сухой биомассы: 235% относительно контроля. Такому активному росту смешанной культуры гриба с данным штаммом азоспирилл благоприятствовала среда III, содержащая Glc и Fru в массовом соотношении 1:1 и отличающаяся по составу от среды V отсутствием солей. При правильном дозировании бактериальной суспензии на среде V также наблюдали прирост биомассы мицелия опенка зимнего до 24% в сравнении с контролем – при той же более низкой плотности посевной суспензии *A. brasilense* Sp245 (рис. 2, V-A1).

При выращивании глубинных культур *G. lucidum*, *P. ostreatus* на среде III различий в накоплении мицелиальной биомассы между контролями и сокультурами не выявлено. В ходе микроскопического исследования в двойной культуре *G. lu-*

cidum и *A. brasilense* SR80 на среде III к моменту наблюдения бактерии практически отсутствовали, зафиксирован и лизис гиф *G. lucidum* (рис. 3a). При культивировании *G. lucidum* с *A. brasilense* Sp245 на той же среде III бактериальные клетки сохраняли подвижность; в поле светового микроскопа был виден мицелий и скопления бактериальных клеток вблизи гиф (рис. 3b, c).

В результате микроскопического анализа показано, что на углеводно-аспарагиновой среде с добавлением солей (V) в жидких сокультурах азоспириллы обоих штаммов подвижны, хотя происходил лизис гиф *P. ostreatus* (рис. 4a, b). При совместном культивировании *F. velutipes* с *A. brasilense* SR80 на той же среде наблюдался активный рост грибного мицелия (рис. 4c).

При выращивании *G. lucidum* совместно с *A. brasilense* Sp245 на среде V в варианте «*A. brasilense* Sp245, A2» увеличение сухой биомассы составило 15% (рис. 5, GV-A2). Заметный прирост

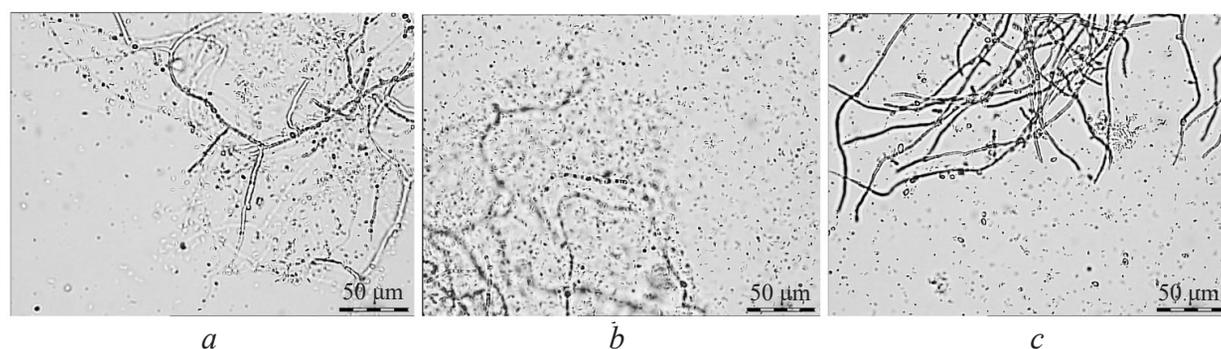


Рис. 4. Световая микроскопия сокультур *Pleurotus ostreatus* HK352 с *Azospirillum brasilense* Sp245 (a, b) или *Flammulina velutipes* 0535 с *A. brasilense* SR80 (c) после 14 сут совместного выращивания на углеводно-аспарагиновой среде V в режимах A1 (a, c) и A2 (b).

Fig. 4. Light microscopy of co-cultures of *Pleurotus ostreatus* HK352 with *Azospirillum* Sp245 (a, b) or *Flammulina velutipes* 0535 with *A. brasilense* SR80 (c) in 14 days of joint growth in the carbohydrate-asparagine medium (V) at A1 (a, c) and A2 (b) modes.

биомассы мицелия трутовика лакированного, примерно на 18% выше по сравнению с монокультурой, был в сокультуре с другим штаммом – *A. brasilense* SR80 (рис. 5, GV-s2). В этом варианте опыта выращивание бактериально-грибной культуры проводили также на среде V, но при меньшей исходной плотности бактериальной суспензии (A1).

В среде V наблюдали значимое увеличение сухой биомассы в двойных культурах *P. ostreatus* и *A. brasilense* SR80: по сравнению с контрольным вариантом прирост составлял до 23% при дозировании бактериальной суспензии по варианту A2 (рис. 5, PV-s2A2). При выращивании мицелия этого же гриба в смешанной культуре с эндофитным штаммом *A. brasilense* Sp245 биомасса увеличивалась по сравнению с контролем на 41% и 54% в вариантах опыта A1 и A2 соответственно (рис. 5, PV-A1 и PV-A2).

Культивирование бактерий на пивном сусле (среда I) мы предприняли с учетом ранее полученных для *A. brasilense* Sp7 положительных результатов [20]. Однако в ходе экспериментов с монокультурами выяснилось, что среда I подходила для выращивания только базидиомицетов, но не для *A. brasilense* Sp245 и *A. brasilense* SR80, так как при относительно высоких концентрациях углеводов в составе этой среды (4 градуса по

Баллингу), так и при разбавлении в 10 раз (рис. 2 и 5, варианты I) прирост биомассы был незначительным. Очевидно, субстрат, характеризующийся одновременно избыточным содержанием углерода и обеднением по питательным веществам, необходимым для их жизнедеятельности, по-видимому из-за дисбаланса, не поддерживает рост изучаемых штаммов бактерий [31]. Известны низкомолекулярные метаболиты других фитостимулирующих бактерий, тормозящие развитие мицелия низших грибов [32]. Некоторое снижение накопления биомассы при выращивании смешанных бактериально-грибных культур на среде I мы наблюдали для всех изученных базидиомицетов (рис. 2 и 5, варианты I).

Показатели роста сокультур в зависимости от способа подготовки бактериального инокулюма и его концентрации

При изучении бинарных культур было важно, чтобы бактерии сохраняли жизнеспособность в течение продолжительного культивирования с базидиомицетами. Следовало учесть, что условия роста при комнатной температуре, особенно в суспензии с высокой плотностью клеток, способствуют автолизу симбиотрофных азотфиксирующих ассоциативных бактерий [33].

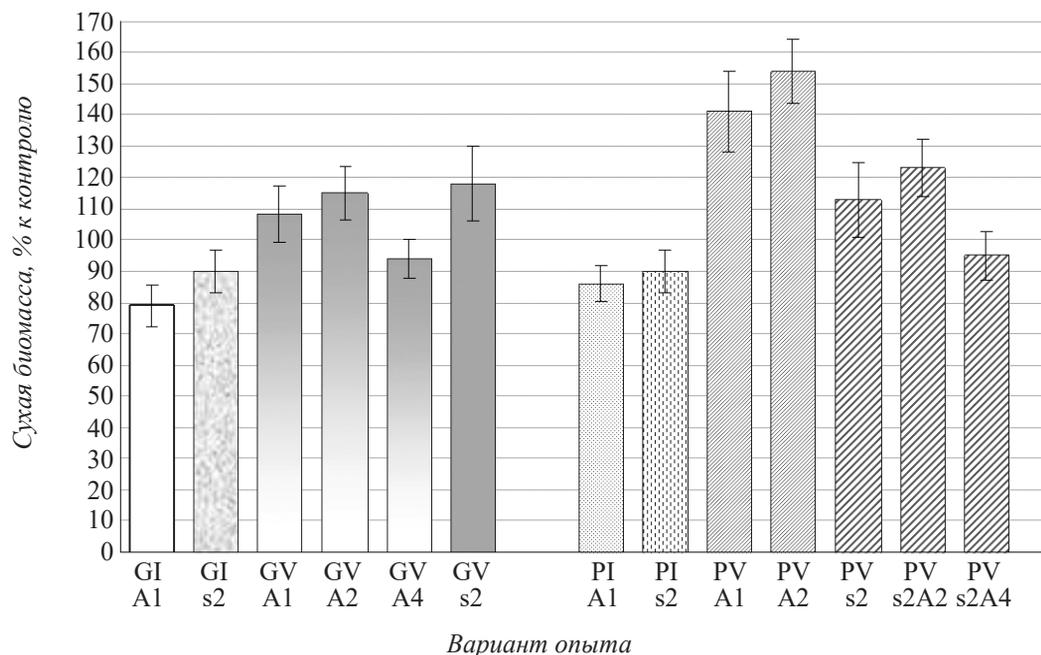


Рис. 5. Накопление биомассы погруженными сокультурами *Ganoderma lucidum* 1315 (G) или *Pleurotus ostreatus* HK352 (P) с *Azospirillum brasilense* Sp245 или *A. brasilense* SR80 (s2) в вариантах опыта A1, A2 и A4 через 21 сут на среде с пивным суслом (1,2 градуса по Баллингу) I и углеводно-аспарагиновой среде V. Вариант s2 соответствует A1, если специально не обозначено.

Fig. 5. Biomass accumulation by submerged co-cultures of *Ganoderma lucidum* 1315 (G) or *Pleurotus ostreatus* HK352 (P) with *Azospirillum brasilense* Sp245 or *A. brasilense* SR80 (s2) at A1, A2 and A4 modes in 21 days on barley wort medium (1.2 Brix) (I) and on the carbohydrate-asparagine medium (V). s2 mode corresponds to the A1, if not specially indicated.

Мы предполагали, что способ подготовки бактериального инокулюма влияет на показатели роста совместных культур, поэтому использовали два способа получения посевного материала бактерий. В одном случае в качестве инокулята использовали суточную культуру азоспирилл на жидких средах, в другом – бактериальную биомассу смывали стерильной водой с агаризованной питательной среды. Путем кратного разведения получали необходимую концентрацию клеток в суспензии (по оптической плотности). Инокулюм в обоих методах вносили в таком количестве, чтобы обеспечить одинаковую начальную оптическую плотность в смешанной бактериально-грибной культуре. При сопоставлении величины прироста биомассы сокультуры с указанными характеристиками бактериального инокулюма мы не выявили связи между этими показателями. Выяснилось, что гораздо большее влияние на развитие бактериально-грибных культур оказывает исходная концентрация клеток азоспирилл.

При исследовании влияния концентрации клеток азоспирилл на рост мицелия базидиомицетов показано, что наибольшая стимуляция роста грибных культур штаммом *A. brasilense* Sp245 была в варианте опыта с наименьшей оптической плотностью (вариант опыта А1) инокулюма для *F. velutipes* (рис. 2, III-A1, IV-A1, V-A1) и с более высокой плотностью (вариант А2) посевной бактериальной суспензии для *G. lucidum* (рис. 5, GV-A2), *P. ostreatus* (рис. 5, PV-A2). Относительно высокая концентрация клеток в инокулюме (вариант опыта А4) штамма *A. brasilense* Sp245 приводила к снижению ростовых показателей для *G. lucidum* 1315 (на 6% относительно контроля, рис. 5, GV-A4).

При инокуляции погруженных культур базидиомицетов другим штаммом азоспирилл наблюдали ростстимулирующую активность *A. brasilense* SR80 в варианте опыта А2 у вешенки устричной (рис. 5, вариант PV-s2A2). Однако в отношении роста мицелия опенка зимнего (рис. 2, вариант V-s2) и трутовика лакированного (рис. 5, вариант GV-s2) эпифитный штамм *A. brasilense* SR80 проявлял положительный эффект исключительно в минимальной концентрации посевной суспензии (вариант А1). При увеличении концентрации клеток *A. brasilense* SR80 выше указанных оптимальных значений (варианты опыта А1 и А2) наблюдали ингибирование роста мицелия *F. velutipes* и *G. lucidum* и небольшое снижение ростовых показателей для *P. ostreatus* НК352 (на 5% относительно контроля, рис. 5, вариант PV-s2A4).

Известно, что низкая концентрация микроорганизмов не обеспечивает их выживаемости, одна-

ко и высокий «оккупационный» фон бактерий [34] может быть неблагоприятным для базидиомицета.

Показатели роста сокультуры в зависимости от штамма бактерий

При использовании одного и того же титра исходной бактериальной суспензии результаты оценки стимулирующих свойств азоспирилл в отношении роста мицелия базидиомицетов оказались неодинаковыми для *A. brasilense* Sp245 и *A. brasilense* SR80. Этот эффект штамма бактерий проявлялся в разной степени у всех смешанных культур, но был наиболее выражен у *G. lucidum* 1315. В бинарных культурах *G. lucidum* со штаммом *A. brasilense* SR80 прирост биомассы в сравнении с монокультурой гриба наблюдали только в случае минимальной концентрации бактерий (рис. 5, вариант GV-s2). Если в культуру трутовика лакированного вносили *A. brasilense* Sp245, то накопление биомассы мицелия превышало контрольные величины даже при более высокой концентрации клеток в исходной бактериальной суспензии (рис. 5, вариант GV-A2) и только в варианте опыта А4 немного снижалось в сравнении с монокультурой гриба (рис. 5, вариант GV-A4).

Ростовые показатели вешенки устричной оставались практически неизменными в сравнении с монокультурой базидиомицета даже при относительно высокой исходной концентрации клеток *A. brasilense* SR80 (вариант опыта А4). При более низких концентрациях бактериального инокулюма, соответствующих вариантам опытов А1 и А2, в большей степени проявлялась способность штамма стимулировать рост *P. ostreatus* и наблюдалось увеличение биомассы относительно контроля на 13–23% (рис. 5, варианты PV-s2, PV-s2A2).

При инокуляции погруженной культуры вешенки устричной бактериями *A. brasilense* Sp245 эндофитный штамм способствовал более интенсивному, чем в контроле, росту мицелия *P. ostreatus* практически во всех вариантах опыта. Этот же штамм азоспирилл был намного более благоприятен для создания искусственной ассоциации с фламмулиной, способствовал максимальному в рамках эксперимента накоплению биомассы вегетативного мицелия (рис. 2, вариант III-A1). Замена среды III на V снимала ингибирующее влияние неоптимальной концентрации (вариант опыта А2) клеток бактериального инокулюма эпифитного штамма *A. brasilense* SR80 на культуру не только опенка зимнего (рис. 2, вариант V-s2), но и трутовика лакированного (рис. 5, вариант GV-s2) и вешенки устричной (рис. 5, варианты PV-s2 и PV-s2A2).

Использование сокультур для получения плодовых тел *P. ostreatus*

Культивирование ксилотрофных макромицетов – по сути биотехнологический процесс утилизации лигноцеллюлозных отходов, конверсируемых в пищу для человека или в высококачественные корма с достаточной эффективностью, высокой питательной ценностью, улучшенной биодоступностью [35, 36]. Выращивание съедобных и лекарственных базидиомицетов в искусственных условиях сопряжено с определенными трудностями, среди которых наиболее значительное место занимает низкая устойчивость посевного материала к посторонней микрофлоре. Выращивание грибов в двойной культуре с ростостимулирующими бактериями может оказаться эффективным биотехнологическим приемом для получения не только более быстрорастущего, но и устойчивого к заражению контаминирующими микроорганизмами посевного мицелия. При подборе микроорганизмов, подходящих для совместного культивирования с *P. ostreatus*, целесообразно в первую очередь рассматривать те, которые обладают способностью благоприятно воздействовать на рост вегетативного мицелия. По этим показателям эпифитный штамм азоспирилл (*A. brasilense* SR80) превосходил *A. brasilense* Sp245 при использовании сред, не благоприятствующих росту бинарных культур вешенки устричной (рис. 5, ПI-s2). Вышесказанное послужило предпосылкой использования двойной культуры *P. ostreatus*–*A. brasilense* SR80 в качестве посевного материала с предположительно высокими защитными свойствами благодаря увеличенной скорости освоения мицелием плотного питательного субстрата.

Получали посевную жидкую культуру на среде X с отваром пшеничной муки, а также на этой среде с введением культуры изучаемого штамма азоспирилл. В ряде случаев в лабораторных и производственных условиях в процессе роста базидиомицетов происходит контаминация зернового субстрата микромицетами и патогенными бактериями, что визуальнo детектируют при его встряхивании. Загрязнения посторонней микрофлорой нередко выявляют на последующих стадиях культивирования вешенки устричной – при использовании в качестве субстрата для получения плодовых тел лузги подсолнечника, доступного и активно используемого в промышленном грибоводстве субстрата. Для выявления преимуществ смешанной культуры в аспекте снижения контаминации мы искусственно создавали условия, благоприятствующие развитию посторонней микрофлоры, путем намеренного несоблюдения

стандартной технологии производства посевного мицелия и обработки лигноцеллюлозной субстанции для плодоношения. Для этого оказалось достаточно заменить дробное автоклавирование зернового субстрата на однократную процедуру или проводить пастеризацию лузги подсолнечника в течение более короткого времени. Затем зерновой субстрат инокулировали погруженной монокультурой *P. ostreatus* или бактериально-грибными культурами, выращенными на среде X. Выращивание плодовых тел проводили на лузге подсолнечника, инокулированной зерновым мицелием, как это описано выше.

Наибольшее благоприятное влияние культуры клеток азоспирилл на развитие гриба наблюдали при возрасте посевной совместной культуры 14 суток, что проявлялось в более быстрой колонизации субстрата грибом и полном подавлении заражения посторонней микрофлорой, в отличие от монокультуры *P. ostreatus*. В течение 3 недель с лигноцеллюлозного субстрата снимали плодовые тела и определяли их суммарную массу. В лабораторных условиях удалось получить 63 ± 13 г/кг субстрата плодовых тел *P. ostreatus* НК352 при внесении в инокулюм *A. brasilense* SR80 и только 29 ± 5 г/кг субстрата при использовании в качестве инокулюма монокультуры *P. ostreatus* НК352.

Таким образом, в работе экспериментально подтверждена возможность и подобраны условия совместного глубинного культивирования базидиомицетов *Flammulina velutipes*, *Ganoderma lucidum* и *Pleurotus ostreatus* с бактериями *Azospirillum brasilense*. Установлено, что биомасса мицелия совместной культуры трутовика лакированного или вешенки устричной по сравнению с монокультурами грибов в наибольшей степени увеличилась на углеводно-аспарагиновой среде V при выращивании *P. ostreatus* с бактериями *A. brasilense* Sp245. Культура этого эндофитного штамма сохраняла жизнеспособность даже в условиях жидкой среды, которая оказалась неблагоприятна для эпифитного штамма *A. brasilense* SR80 при его совместном культивировании с *G. lucidum*. Биомасса мицелия совместной культуры *F. velutipes* по сравнению с монокультурой гриба в наибольшей степени увеличивалась на углеводно-аспарагиновой среде III при выращивании фламмулины с бактериями *A. brasilense* Sp245. При погруженном культивировании оценка зимнего и трутовика лакированного с азоспириллами обнаружено угнетение роста эпифитного штамма, что подчеркивает необходимость тщательного подбора состава среды и дозирования бактериальной суспензии.

Преимущества бактериально-грибных культур следует учитывать при искусственном выращивании ксилотрофных грибов. Наибольшей эффективностью по параметрам накопления биомассы погруженного мицелия обладали инокулюмы на основе сокультур *P. ostreatus* с *A. brasilense* SR80. Использование зернового мицелия, полученного на основе промежуточной совместной культуры *P. ostreatus* НК352 с *A. brasilense* SR80, для выращивания плодовых тел приводило к увеличению урожайности вешенки устричной.

Работа выполнена в рамках темы № АААА-А17-117102740098-8.

ЛИТЕРАТУРА

- Su A., Ma G., Xie M., Ji Y., Li X., Zhao L., Hu Q. Characteristic of polysaccharides from *Flammulina velutipes* *in vitro* digestion under salivary, simulated gastric and small intestinal conditions and fermentation by human gut microbiota. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2019, 54(6), 2277–2287. doi: 10.1111/ijfs.14142
- Nie Y., Jin Y., Deng C., Xu L., Yu M., Yang W., Li B., Zhao R. Rheological and microstructural properties of wheat dough supplemented with *Flammulina velutipes* (mushroom) powder and soluble polysaccharides. *CyTA J. Food*, 2019, 17(1), 455–462. doi: 10.1080/19476337.2019.1596986
- Huang L.H., Lin H.Y., Lyu Y.T., Gung C.L., Huang C.T. Development of a transgenic *Flammulina velutipes* oral vaccine for hepatitis B. *Food Technol. Biotechnol.*, 2019, 57(1), 105–112. doi: 10.17113/ftb.57.01.19.5865
- Mahfuz S., Song H., Miao Y., Liu Z. Dietary inclusion of mushroom (*Flammulina velutipes*) stem waste on growth performance and immune responses in growing layer hens. *J. Sci. Food Agric.*, 2019, 99(2), 703–710. doi: 10.1002/jsfa.9236
- Zhao R., Hu Q., Ma G., Su A., Xie M., Li X., Chen G., Zhao L. Effects of *Flammulina velutipes* polysaccharide on immune response and intestinal microbiota in mice. *J. Funct. Foods*, 2019, 56, 255–264. doi: 10.1016/j.jff.2019.03.031
- Majesty D., Ijeoma E., Winner K., Prince O. Nutritional, anti-nutritional and biochemical studies on the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *EC Nutrition*, 2019, 14(1), 36–59.
- Vetvicka V., Gover O., Karpovsky M., Hayby H., Danay O., Ezov N., Hadar Y., Schwartz B. Immune-modulating activities of glucans extracted from *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*. *J. Funct. Foods*, 2019, 54, 81–91. doi: 10.1016/j.jff.2018.12.034
- Zhu B., Li Y., Hu T., Zhang Y. The hepatoprotective effect of polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* on carbon tetrachloride-induced acute liver injury rats. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2019, 131, 1–9. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.043
- Noman E., Al-Gheethi A., Mohamed R.M.S.R., Talip B.A. Myco-remediation of xenobiotic organic compounds for a sustainable environment: a critical review. *Top. Curr. Chem. (Cham.)*, 2019, 377(3), 17. doi: 10.1007/s41061-019-0241-8
- Bamigboye C.O., Oloke J.K., Dames J.F., Burton M., Lateef A. Process optimization for production of biomass and exopolysaccharide by king tuber oyster mushroom, *Pleurotus tuber-regium* (Agaricomycetes) for biotechnological applications. *Int. J. Med. Mushrooms*, 2019, 21(4), 311–322. doi: 10.1615/IntJMedMushrooms.2019030357
- Zhang W.R., Liu S.R., Kuang Y.B., Zheng S.Z. Development of a novel spawn (block spawn) of an edible mushroom, *Pleurotus ostreatus*, in liquid culture and its cultivation evaluation. *Mycobiology*, 2019, 47(1), 97–104. doi: 10.1080/12298093.2018.1552648
- Kumar A., Patel J.S., Meena V.S., Ramteke P.W. Plant growth-promoting rhizobacteria: strategies to improve abiotic stresses under sustainable agriculture. *J. Plant Nutr.*, 2019, 42(11–12), 1402–1415. doi: 10.1080/01904167.2019.1616757
- Bhat M.A., Rasool R., Ramzan S. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for sustainable and eco-friendly agriculture. *Acta Sci. Agric.*, 2019, 3(1), 23–25.
- Fukami J., Cerezini P., Hungria M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Express*, 2018, 8(1), 73. 12 pp. doi: 10.1186/s13568-018-0608-1
- Zhang X., Ye L., Kang Z., Zou J., Zhang X., Li X. Mycorrhization of *Quercus acutissima* with Chinese black truffle significantly altered the host physiology and root-associated microbiomes. *Peer J*, 2019, 7, e6421. doi: 10.7717/peerj.6421
- Obase K. Bacterial community on ectomycorrhizal roots of *Laccaria laccata* in a chestnut plantation. *Mycoscience*, 2019, 60(1), 40–44. doi: 10.1016/j.myc.2018.08.002
- Cho Y.S., Kim J.S., Crowley D.E., Cho B.G. Growth promotion of the edible fungus *Pleurotus ostreatus* by fluorescent pseudomonads. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2003, 218(2), 271–276. doi: 10.1016/S0378-1097(02)01144-8
- Jayasinghearachchi H.S., Seneviratae G. A mushroom-fungus helps improve endophytic colonization of tomato by *Pseudomonas fluorescens* through iofilms formation. *Res. J. Microbiol.*, 2010, 5(7), 689–695.
- Никитина В.Е., Цивилева О.М., Лощинина Е.А. Взаимоотношения ксилотрофных базидиомицетов и почвенных азотфиксирующих бактерий рода *Azospirillum*. *Усп. мед. микол.*, 2006, 7, 293–294.
- Лощинина Е.А., Никитина В.Е., Цивилева О.М., Степанова Л.В., Пономарева Е.Г., Шелудько А.В. Морфолого-культуральные характеристики базидиомицета *Lentinus edodes* при совместном культивировании с бактериями рода *Azospirillum*. *Вестн. СГАУ*, 2006, 6(2), 24–26.
- Stepanova L.V., Schelud'ko A.V., Katsy E.I., Ponomareva E.G., Nikitina V.E. The role of lectin-carbohydrate biospecific interactions between medicinal Basidiomycetes mushroom *Grifola frondosa* (Dicks.: Fr.) S.F. Gray and *Azospirillum brasilense* during their co-cultivation. *Int. J. Med. Mushrooms*, 2008, 10(1), 65–72. doi: 10.1615/IntJMedMushr.v10.i1.80
- Методы экспериментальной микологии. Под ред. В.И. Билай. Киев, Украина: Наукова думка, 1982, 550.
- Никитина В.Е., Цивилева О.М., Гарибова Л.В. Стимуляторы лектиновой активности *Lentinus edodes* на синтетических агаризованных средах. *Биотехнология*, 2004, 3, 49–54.

24. Day J.M., Döbereiner J. Physiological aspects of N-fixation by a *Spirillum* from *Digitaria* roots. *Soil Biol. Biochem.*, 1976, 8(1), 45–50. doi: 10.1016/0038-0717(76)90020-1
25. Roozen N.J.M., Van Vuurde J.W.L. Development of a semi-selective medium and an immunofluorescence colony-staining procedure for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in cattle manure slurry. *Neth. J. Plant Pathol.*, 1991, 97(5), 321–334. doi: 10.1007/BF01974227
26. Florack D.E., Visser B., De Vries P.M., Van Vuurde J.W.L., Stiekema W.J. Analysis of the toxicity of purthionins and hordothionins for plant pathogenic bacteria. *Neth. J. Plant Pathol.*, 1993, 99(5–6), 259–268. doi: 10.1007/BF01974307
27. Diehle D.A., Roysse D.J. Shiitake cultivation on sawdust: evaluation of selected genotypes for biological efficiency and mushroom size. *Mycologia*, 1986, 78(6), 929–933. doi: 10.1080/00275514.1986.12025352
28. Tsivileva O.M., Pankratov A.N., Nikitina V.E. Extracellular protein production and morphogenesis of *Lentinula edodes* in submerged culture. *Mycol. Prog.*, 2010, 9(2), 157–167. doi: 10.1007/s11557-009-0614-4
29. Лощина Е.А., Цивилева О.М., Макаров О.Е., Никитина В.Е. Изменения углеводного и жирнокислотного состава мицелия *Lentinus edodes* при совместном культивировании с *Azospirillum brasilense*. *Изв. вузов. Прикл. химия и биотехнология*, 2012, 2–3, 64–67.
30. Купряшина М.А., Петров С.В., Пономарева Е.Г., Никитина В.Е. Лигнинолитическая активность бактерий родов *Azospirillum* и *Niveispirillum*. *Микробиология*, 2015, 84(6), 691–696. doi: 10.7868/S0026365615060051
31. Alves M.I., Macagnan K.L., Rodrigues A.A., de Assis D.A., Torres M.M., de Oliveira P., Furlan L., Vendruscolo C.T., Moreira A.D.S. Poly (3-hydroxybutyrate)-P (3HB): review of production process technology. *Ind. Biotechnol.*, 2017, 13(4), 192–208. doi: 10.1089/ind.2017.0013
32. Naureen Z., Rehman N.U., Hussain H., Hussain J., Gilani S.A., Al Housni S.K., Mabood F., Khan A.L., Farooq S., Abbas G., Harrasi A.A. Exploring the potentials of *Lysinibacillus sphaericus* ZA9 for plant growth promotion and biocontrol activities against phytopathogenic fungi. *Front. Microbiol.*, 2017, 8, 1477. doi: 10.3389/fmicb.2017.01477
33. Лойко Н.Г., Кряжевских Н.А., Сузина Н.Е., Демкина Е.В., Муратова А.Ю., Турковская О.В., Козлова А.Н., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Покоящиеся формы *Sinorhizobium meliloti*. *Микробиология*, 2011, 80(4), 465–476. doi: 10.1134/S0026261711040126
34. Иванчина Н.В., Гарипова С.Р., Шавалеева Д.В., Уразбахтина Н.А., Захарова Р.Ш., Хайруллин Р.М. Влияние штаммов *Bacillus subtilis* на продуктивность растений гороха при автономной и совместной инокуляции со штаммом *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 1078. *Агрехимия*, 2008, 10, 34–39.
35. Guo L.-Q., Lin J.-Y., Lin J.-F. Non-volatile components of several novel species of edible fungi in China. *Food Chemistr.* 2007, 100(2), 643–649. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.09.087
36. Akyüz M., Kirbağ S. Effect of various agro-residues on nutritive value of *Pleurotus eryngii* (DC. ex Fr.) Quel. var. *ferulae* Lanzi. *J. Agric. Sci.*, 2010, 16, 83–88.

Bacteria of the *Azospirillum* Genus for the Optimization of the Artificial Culture of Xylotrophic Mushrooms

O. M. TSIVILEVA^{1,*}, A. N. SHATERNIKOV¹, V. E. NIKITINA¹

¹*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms (IBPPM), Russian Academy of Sciences, Saratov, 410049 Russia*

*e-mail: tsivileva@ibppm.ru

Received August 30, 2019

Revised January 16, 2020

Accepted March 24, 2020

Abstract—The possibility of submerged co-cultivation of the basidiomycetes *Flammulina velutipes*, *Ganoderma lucidum* and *Pleurotus ostreatus* with the bacteria *Azospirillum brasilense* was demonstrated, and optimal conditions for the process were selected. The azospirilla strains under study had active mobility and formed clusters near mushroom hyphae in liquid co-cultures optimized both in medium composition and bacterial inoculum concentration. The concentration of bacterial cells, ceteris paribus, had a significant effect on the growth of binary cultures. Co-cultivation of *F. velutipes* with *A. brasilense* Sp245 at the optimal bacteria concentration (0.5% v/v) in the inoculum ($A_{600} = 1.0$) made it possible to obtain 2.35 times more dry biomass than in the control. The intensive growth of the mixed culture of mushrooms with the studied azospirilla was promoted by the medium based on Glc and Fru (in mass proportion 1:1), and Asn. The characteristics of the development of *P. ostreatus* fruit bodies and the reduction of contamination in the presence of azospirillum were evaluated. Mixed bacterial-fungal cultures of *P. ostreatus* with *A. brasilense* SR80 which were used as seeding material were most efficient in the accumulation of submerged mycelial biomass, the rate of grain substrate colonization and intensity of fruit-body formation. Data obtained allow us to judge the high potential of using binary mushroom-bacterial cultures for the efficient production of mycelial biomass and fruiting of basidiomycetes.

Key words: *Flammulina*, *Ganoderma*, *Pleurotus*, *Azospirillum*, co-culture, submerged culture, fruiting

Funding—The work was funded on the theme AAAA-A17-117102740098-8.

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-2-16-25