

ВЫРАЩИВАНИЕ ВЫСШЕГО ГРИБА *FLAMMULINA VELUTIPES* В ДВОЙНОЙ КУЛЬТУРЕ С *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*

О.М. Цивилева, А.Н. Шатерников, В.Е. Никитина

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

Мир высших грибов очень разнообразен с точки зрения практического использования, но многовековой опыт некоторых стран по культивированию грибных культур четко ориентирует на промышленное производство ряда наиболее ценных в этом плане базидиомицетов. Представители этого класса высших грибов интересуют биотехнологов не только в качестве источника ценных пищевых ингредиентов [1; 2], но и как основа для получения высокоэффективных лекарственных препаратов [3]. Достаточно давно проводятся оказавшиеся перспективными биомедицинские исследования субстанций из ксилотрофных грибов – представителей рода *Flammulina* [4], в особенности из *Flammulina velutipes* (Curtis, 1777: Fries, 1821) Singer, 1951 (опенок зимний, зимний гриб) [5, 6]. Иммуномодулирующий белок фламмулин с общепринятой аббревиатурой Fve [7], выделенный из *F. velutipes*, – полипептид, нековалентно-связанный гомодимер [8]. Считается, что этот белок с лектиновой активностью является триггером митогенной пролиферации Т-лимфоцитов и Th1 цитокиновой продукции, супрессором системных анафилактических реакций [9]. До настоящего времени продолжаются научные изыскания в интересах создания препаратов ветеринарного и медицинского назначения из этого гриба [10, 11].

Поэтому остаются актуальными исследования возможной оптимизации искусственного культивирования фламмулины. Биологические способы стимуляции роста мицелия позволили бы улучшить технологию выращивания, сократив время культивирования грибов и одновременно подавив рост контаминирующей микрофлоры. Одним из таких способов может стать выращивание базидиомицета в двойной культуре со стимулирующими рост бактериями, например, представителями условной несистематической группы «Plant growth promoting rhizobacteria» (PGPR), то есть ризобактериями, способствующими росту растений [напр., 12]. Бактерии рода *Azospirillum* – PGPR, грамотрицательные микроаэрофильные бактерии – вступают в ассоциации со многими растениями, в том числе и из умеренных климатических зон, и хорошо известны своими фитостимулирующими свойствами [напр., 13].

Важно выявление и исследование ростостимулирующих свойств разных штаммов азоспирилл в отношении съедобных и / или лекарственных высших грибов, а также свойств, стимулирующих подавление контаминантной микрофлоры в двойной культуре.

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 в связи с двойной культурой *Lentinula edodes* с *Azospirillum brasilense* Sp7 [14, 15]. Было изучено влияние *A. brasilense* Sp7 на рост и морфологические особенности *L. edodes* F-249 [16, 17], однако причины активизации развития мицелия оставались не выявлены. Необходимо также поиск наиболее эффективного штамма азоспирилл в отношении грибов разных систематических групп. Задачи такого рода поставлены в наших продолжающихся исследованиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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

Для выращивания культур использовали среды состава, описанного в табл. 1. Плотные среды получали, добавляя в питательные растворы 1,8–2 % (*m/v*) агара.

Таблица 1. Состав сред ко-культивирования *Flammulina velutipes* и *Azospirillum brasilense*

Условное обозначение	Состав, г/л
(I)	Сусло пивное 1,2 град по Баллингу
(II)	<i>D</i> -глюкоза – 9,0; <i>L</i> -аспарагин – 1,5
(III)	<i>D</i> -глюкоза – 4,5; <i>D</i> -фруктоза – 4,5; <i>L</i> -аспарагин – 1,5
(IV)	<i>D</i> -глюкоза – 9,0; <i>L</i> -аспарагин – 1,5; KH_2PO_4 – 1; K_2HPO_4 – 1; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,002; Fe(III) – нитрилотриацетат (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
(V)	<i>D</i> -глюкоза – 4,5; <i>D</i> -фруктоза – 4,5; <i>L</i> -аспарагин – 1,5; KH_2PO_4 – 1; K_2HPO_4 – 1; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,002; Fe(III) – нитрилотриацетат (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
(VI)	яблочная кислота – 3,76; дрожжевой экстракт – 0,1; KH_2PO_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
(VII)	<i>D</i> -глюкоза – 10; дрожжевой экстракт – 1
(VIII)	<i>D</i> -глюкоза – 2,5; дрожжевой экстракт – 2,5; пептон – 5
(IX)	<i>D</i> -глюкоза – 5; дрожжевой экстракт – 5; пептон – 10

Опенки зимний (*F. velutipes*) выращивали погруженным способом в течение 21 сут в случае монокультур гриба, либо 7 сут до объединения с *A. brasilense* Sp245 или *A. brasilense* SR80, при температуре 28°C. После объединения бактериально-грибные культуры выращивали в течение 14 сут.

В качестве инокулята при посеве гриба использовали 14-сут культуры, выращенные на агаризованном пивном сусле (4 град по Баллингу). Глубинные посевные бактериальные культуры выращивали до экспоненциальной фазы роста при температуре +30 °C и величине pH 7.0 в течение 18 часов на модифицированной синтетической среде (VI). Смешанную культуру на жидких средах получали, подсевая *A. brasilense* к *F. velutipes* 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 по накоплению сухой биомассы в единицу времени в зависимости от продолжительности выращивания. Содержимое колб, для определения сухой биомассы при данном числе повторностей опыта на данные сутки наблюдения, 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, в качестве которых служили 3-х-часовые культуры.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор грибного объекта в настоящей работе обусловлен в том числе упомянутыми выше ценными свойствами культивируемых базидиомицетов, что в полной мере относится к фламмулине. Бактериальная деструкция лигнин-содержащих субстратов катализируется предположительно ферментами, аналогичными участвующим в трансформации лигнина высшими грибами [18]. Для совместного культивирования с ксилотрофными базидиомицетами выбрали два штамма – модельный объект изучения эндофитного симбиоза *A. brasilense* Sp245, а также эпифитный штамм SR80, у которых выявлена способность к деградации лигнина [19].

Прежде всего необходимо было решить задачу экспериментального подтверждения возможности выращивания двойной бактериально-грибной культуры для изучаемых биологических объектов. Подбирая условия совместного культивирования фламмулины и азоспирилл, использовали как описанные в литературе, так и модифицированные среды, перечисленные в разделе «Материалы и методы исследования», предположительно подходящие для оптимизации получения мицелия в погруженной культуре и / или бактериальных суспензий.

Попытку культивирования бактерий на пивном сусле (I) мы предприняли с учетом ранее полученных для *A. brasilense* Sp7 положительных результатов [16]. Однако в ходе экспериментов с монокультурами выяснилось, что среда (I) подходит только для выращивания базидиомицетов и характеризуется лишь незначительными признаками роста азоспирилл как при относительно высоких концентрациях углеводов в составе этой среды (4 град по Баллингу), так и в разбавленном ее состоянии (рис. 1).

Сбалансированный рост бактерий нарушается на субстрате, одновременно характеризующемся избыточным количеством углерода и лимитированном по эссенциальным для них питательным веществам [20]. По-видимому, пивное сусло как источник углерода используется азоспириллами для продукции энергетического резерва бактериальной клетки, биополимеров, оказывающих негативное влияние на рост гриба. Кроме того, развиваясь на данной избыточной по углероду жидкой среде, богатой разнообразными углеводами, азоспирилла продуцирует внеклеточные низкомолекулярные соединения, способные при образовании более или менее устойчивых ассоциатов с полисахаридами [21] препятствовать усвоению данного питательного субстрата макромицетом. Известны также низкомолекулярные метаболиты RGPB, тормозящие развитие мицелия низших грибов [22]. Снижение накопления биомассы при выращивании смешанных бактериально-грибных культур мы наблюдали не только у *F. velutipes*, но и у других базидиомицетов (рис. 1).

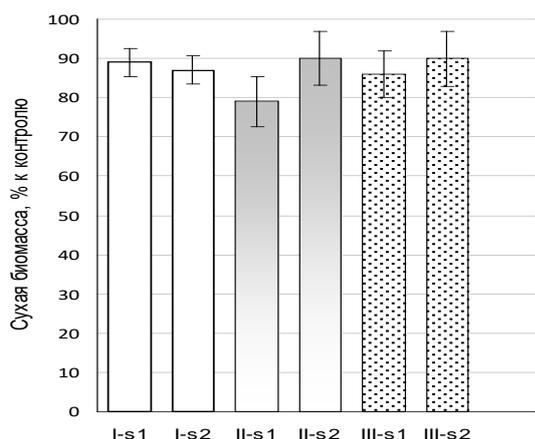


Рис. 1. Накопление биомассы погруженными кокультурами: I – *Flammulina velutipes* 0535; II – *Ganoderma lucidum* 1315; III – *Pleurotus ostreatus* НК352 с *Azospirillum brasilense* Sp245 (s1) или *A. brasilense* SR80 (s2) через 21 сут на среде с пивным суслом (1,2 град по Баллингу)

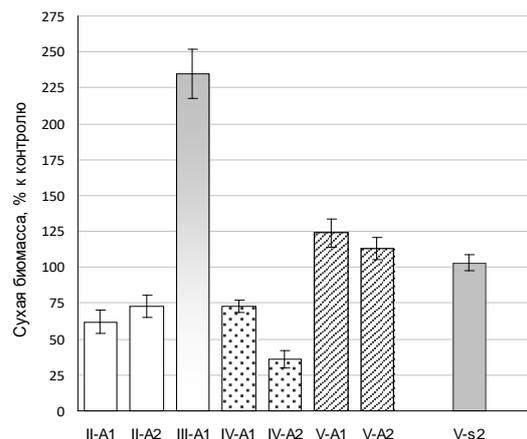


Рис. 2. Накопление биомассы глубинными кокультурами *Flammulina velutipes* 0535 с *Azospirillum brasilense* Sp245 или *A. brasilense* SR80 в вариантах опыта A1 и A2 через 21 сут на углеводно-аспарагиновых средах с Glc (II, IV), Glc + Fru (III, V). Обозначения в тексте

Наиболее благоприятными средами для нормального роста и грибных, и бактериальных штаммов явились углеводно-аспарагиновые (III) и (V), в меньшей степени – среда (VIII). Другие среды с дрожжевым экстрактом, а именно (VIII) и в меньшей степени (IX), характеризовались нормальным ростом культур обоих бактериальных штаммов. Модифицированная малатная среда (VI) была нами использована для получения посевных бактериальных суспензий.

Количественные характеристики ростовых процессов двойных культур *F. velutipes* с *A. brasilense* Sp245 или *A. brasilense* SR80 определяли на жидких химически детерминированных средах (II), (III), (IV), (V) (табл. 1). Величину оптического поглощения (при $\lambda = 600$ нм) бактериальной суспензии, использованной в качестве посевного материала, условно обозначали A1; A2; A4 при объеме 0,5; 1,0; 2,0 мл соответственно в расчете на 100 мл питательной среды бактериально-грибной культуры. Величина A_{600} исходной бактериальной суспензии, измеряемая в каждой серии независимых экспериментов, составляла около 1,0. Соответствующие данные для сред (II) – (V) представлены на рис. 2.

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).

Если в составе жидких питательных сред источник углерода был представлен только глюкозой при исключении фруктозы, но сохранении суммарного содержания углеводов (среды (II) и (IV), табл. 1), то при выращивании погруженной культуры зимнего гриба прослеживалось наиболее выраженное снижение накопления мицелиальной биомассы в кокультурах по сравнению с контрольными вариантами опыта (рис. 2).

Эксперимент с выращиванием фламмулины совместно с *A. brasilense* Sp245 в оптимальном варианте «*A. brasilense* Sp245, A1» (рис. 2) позволил получить 235 %-ное увеличение сухой биомассы 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 (табл. 1). При правильном дозировании бактериальной суспензии на среде (V) также наблюдали прирост биомассы до 24 %, и вновь при более низкой плотности посевной суспензии *A. brasilense* Sp245 (рис. 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в работе экспериментально подтверждена возможность и реализован начальный этап подбора условий совместного глубинного культивирования базидиомицета *Flammulina velutipes* с бактериями *Azospirillum brasilense*. Установлено, что биомасса мицелия совместной культуры по сравнению с монокультурой гриба в наибольшей степени увеличивается на углеводно-аспарагиновой среде (III) при выращивании фламмулины с бактериями *A. brasilense* Sp245.

При погруженном культивировании гриба с азоспириллами обнаружено угнетение роста эпифитного штамма, необходимость тщательного подбора состава среды и дозирования бактериальной суспензии. Исследования по эффективному получению мицелиальной биомассы и биологически активных веществ, источниками которых служат представители культивируемых базидиомицетов, обладают не только фундаментально-научной, но и практической значимостью, способствуя развитию биотехнологии получения ценных продуктов грибного происхождения.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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. *International Journal of Food Science & Technology*, 2019, 54(6): 2277–2287.
2. 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-Journal of Food*, 2019, 17(1): 455–462.
3. 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 Technology and Biotechnology*, 2019, 57(1): 105–112.
4. Wasser S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, 60: 258–274.
5. Wasser S.P., Weis A.L. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives: Review. *Int. J. Med. Mushrooms*, 1999, 1: 31–62.
6. Wasser S.P., Weis A.L. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Crit. Rev. Immunol.*, 1999, 19(1): 65–96.
7. Jong S.C., Donovan R. Antitumor and antiviral substances from fungi. *Adv. Appl. Microbiol.*, 1989, 34: 183–262.
8. Seow S.V., Kuo I.C., Paaventhana P., Kolatkar P.R., Chua K.Y. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies on the fungal immunomodulatory protein Fve from the golden needle mushroom (*Flammulina velutipes*). *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 2003, 59(8): 1487–1489.
9. Paaventhana P., Joseph J.S., Seow S.V., Vaday S., Robinson H., Chua K.Y., Kolatkar P.R. A 1.7 Å structure of Fve, a member of the new fungal immunomodulatory protein family. *J. Mol. Biol.*, 2003, 332(2): 461–470.
10. 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. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2019, 99(2): 703–710.
11. 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. *Journal of Functional Foods*, 2019, 56: 255–264.
12. Kumar A., Patel J.S., Meena V.S., Ramteke P.W. Plant growth-promoting rhizobacteria: strategies to improve abiotic stresses under sustainable agriculture. *Journal of Plant Nutrition*. 2019. 42(11–12): 1402–1415.
13. Fukami J., Cerezini P., Hungria M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Express*. 2018. 8(1): 73. 12 pp.

14. Никитина В.Е., Цивилева О.М., Лощина Е.А. Взаимоотношения ксилотрофных базидиомицетов и почвенных азотфиксирующих бактерий рода *Azospirillum* // Успехи медицинской микологии. Том VII / Под общей научной редакцией акад. РАЕН Ю.В. Сергеева. М.: Национальная академия микологии, 2006. С. 293–294.

15. Tsivileva O.M., Pankratov A.N., Nikitina V.E. Extracellular protein production and morphogenesis of *Lentinula edodes* in submerged culture // Mycological Progress. 2010. V. 9, № 2. P. 157–167.

16. Лощина 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* // Вестник СГАУ. 2006. № 6, вып. 2. С. 24–26.

17. 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 brasiliense* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2012. № 2 (3). С. 64–67.

18. Janusz G., Pawlik A., Sulej J., Świdorska-Burek U., Jarosz-Wilkolażka A., Paszczyński A. Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution // FEMS Microbiology Reviews. 2017. V. 41, № 6. P. 941–962.

19. Купряшина М.А., Петров С.В., Пономарева Е.Г., Никитина В.Е. Лигнинолитическая активность бактерий родов *Azospirillum* и *Niveispirillum* // Микробиология. 2015. Т. 84, № 6. С. 691–696.

20. 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. *Industrial Biotechnology*, 2017, 13(4): 192–208.

21. Palacios O.A., Lopez B.R., Bashan Y., de-Bashan L.E. Early Changes in Nutritional Conditions Affect Formation of Synthetic Mutualism Between *Chlorella sorokiniana* and the Bacterium *Azospirillum brasiliense*. *Microbial Ecology*, 2019, 77(4): 980–992.

22. 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. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1477, 11 pp.