

А.В. Константинов, науч. сотр.;
А.С. Велюгина, маг., мл. науч. сотр.;
И.А. Хархасова, асп., мл. науч. сотр.;
С.А. Коваленко, зав. сектором, канд. с.-х. наук;
С.В. Пантелеев, зав. лабораторией, канд. биол. наук
(ГНУ «Институт леса НАН Беларуси», г. Гомель, Беларусь)

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИСЛОТНОСТИ СУБСТРАТОВ ПРИ ТВЕРДОФАЗНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НЕКОТОРЫХ САПРОТРОФНЫХ ГРИБОВ

Одним из важнейших факторов, регулирующих метаболизм и рост чистых культур высших базидиальных грибов, является рН питательной среды. Для большинства грибов оптимальные значения рН находятся в пределах 5–6, хотя многие из них способны расти при значительных изменениях показателей кислотности [1]. Различают два вида кислотности: актуальную и потенциальную, потенциальная при этом подразделяется на обменную и гидролитическую. Актуальная кислотность измеряется при взаимодействии субстрата с дистиллированной водой ($pH_{\text{водн.}}$). Она зависит от наличия в субстратном растворе свободных органических и минеральных кислот (главным образом, угольной кислоты). Обменная и гидролитическая кислотности обусловлены наличием обменных водорода и алюминия и определяются путем вытеснения ионов H^+ и Al^{3+} раствором нейтральной соли KCl или гидролитически щелочной соли [2].

Концентрация водородных ионов в субстрате оказывает существенное влияние на характер метаболических процессов. От уровня рН зависят поступление питательных веществ в клетку, активность ферментов, образование грибами пигментов, антибиотиков, а также половое и бесполое спороношение. Значение оптимального рН для развития высших грибов определяется соотношением углерода и азота в субстрате. Увеличение концентрации углеводов при постоянном содержании азота вызывает значительные отклонения в углеводном обмене грибов [3]. В связи с этим представляется необходимым предварительно установить те пределы рН, в которых происходит активный рост исследуемых штаммов. Учитывая при этом, что оптимальный рН среды будет различным на разных субстратах, зависеть от других условий культивирования и может быть точно определен лишь для конкретных условий проведения ферментационного процесса [4].

Кислотность субстрата может изменяться во время роста грибов, поскольку грибы выделяют органические кислоты (глюконовую, лимонную, яблочную, янтарную, фумаровую и др.). Также известно,

что рН клеточного сока плодовых тел шляпочных грибов колеблется в пределах 5,9–6,2 [1, 4, 5]. В связи с этим для приготовления субстратов существует необходимость учета буферных возможностей места обитания грибов [4].

Таким образом, значения рН среды, благоприятные для роста, специфичны и определяются физиологическими особенностями штамма и требуют измерения на различных этапах культивирования.

Целью эксперимента являлось оптимизация методики оценки уровня кислотности субстратов на основе листового опада после твердофазного культивирования сапротрофных грибов (на примере Сморчка и Навозника).

Исходным материалом для эксперимента являлись чистые культуры из коллекции штаммов грибов Института леса НАН Беларуси: штамм FIB-469 – Навозник рассеянный *Coprinellus disseminates* ((Pers.) J.E. Lange, 1938), штамм FIB-332 – Сморчок *Morchella importuna* (M.Kuo, O'Donnell, T.J.Volk, 2012, ранее комплекс видов *M. conica*). В коллекции штаммы поддерживаются при 4-6 °С методом субкультуры на косом агаре с использованием среды на основе сусла (4° по Баллингу) и микробиологического агара (20%).

Вегетативный рост штаммов изучался на чашках Петри: сусло-агаровая питательная среда (на 1 л пивного сусла 6-8° по Баллингу 20 г агара), рН 5,5-6,5. Инокулированные чашки Петри плотно оборачивали полиэтиленовой пленкой для предотвращения пересыхания, культивировали на протяжении двух недель при температуре 24 °С.

Морфолого-культуральные свойства чистых культур штаммов в коллекции оценивали в ходе периодического субкультивирования. Навозник рассеянный колония войлочная; воздушный мицелий ватобразный, свалывшийся; цвет наружной поверхности колонии белоснежный; поверхность колонии ровная; форма колонии по характеру развития воздушного мицелия неравномерная; отмечается наличие хохолка в центральной части; зона роста однородная; край колонии прижатый; внешняя линия гладкая; реверзум неизменный; плотность колонии 3 балла, высота 2 мм, ростовой коэффициент на 7-е сутки 48. Сморчок *M. importuna* формировал желтовато-белый войлочный мицелий. Рост колоний интенсивный, диаметр колоний до 100 мм к седьмым суткам. Профиль колоний плоский с каплевидным центром. Реверзум темноокрашенный. Плотность колонии 4 балла, высота колонии 2 мм, ростовой коэффициент на 7-е сутки – 48.

Для изучения отдельных аспектов дальнейшего практического использования отобранных штаммов макромицетов на примере *C. disseminatus* и *M. importuna* осуществляли изучение кислотности суб-

стратов после твердофазного культивирования и поиск наиболее подходящей методики определения водородного показателя. В связи с тем, что ряд естественных субстратов (на основе зерна, отрубей, опилок и др.) не в полной мере пригодны для наработки мицелия нами был поставлен эксперимент по культивированию изучаемых штаммов грибов на субстратах из листового опада (ЛО) и его смеси с верховым торфом (ЛО+Т). Для оценки ростовых показателей мицелия микоризообразующих грибов при твердофазном культивировании, выращивании на различных субстратах на 20-е сутки после посева маточного мицелия на субстраты проводили оценку индекса, выражаемого в баллах: 1 балл – мицелий занимал до 20% объема субстрата, 2 балла – более 20 до 40%, 3 балла – более 40 до 60%, 4 балла – более 60 до 80%, 5 баллов – более 80 до 100%.

По результатам исследования *C. disseminatus* образовывал плотный бело-серый мицелий и на субстрате из листового опада развивался в разы интенсивнее, чем на его смеси с верховым торфом (4 и 1 балл соответственно). В то же время, штамм *M. importuna* характеризовался сходными высокими показателями роста вне зависимости от состава апробированных субстратов, достигая в конце периода культивирования 85% и 100% объема субстрата соответственно. Менее интенсивное развитие мицелия изучаемых штаммов в случае смешивания листового опада с торфом может быть связано как с меньшей влажностью субстрата, так и с пониженной доступностью питательных веществ в указанном субстрате в результате неподходящей реакции среды или иными его физико-химическими свойствами.

Исходя из полученных данных, требуется двадцатичасовое выдерживание образцов субстратов в 1Н КСl или дистиллированной воде для более качественного определения водородного показателя. Установлено, что кислотность солевой вытяжки субстратов, освоенных мицелием, находится в узком диапазоне 5,7-6,0 для *C. disseminatus* и 6,4-6,6 для *M. importuna*. Значения, полученных при анализе общей кислотной водной вытяжки незначительно различались в отношении вариантов с культивированием *M. importuna* на 0,3 в большую сторону и 0,2 в меньшую для вариантов субстратов «листовой опад» и «листовой опад+верховой торф», соответственно. При этом различия показателей общей кислотности водной вытяжки для указанных вариантов субстрата в случае культивирования более выражены: на 1,1 выше и на 0,7 выше соответственно. Общая кислотность водной вытяжки обусловлена содержанием свободной углекислоты, органических кислот и их ненасыщенных соединений, что при анализе образцов субстратов дает более информативный результат, учитывающий содержание в них элементов питания, различных при-

месей, а также, в случае субстратов с наработанным мицелием, комплекс вторичных метаболитов. Результаты измерения рН субстратов на основе листового опада и его смеси с верховым торфом после 20-и суток выращивания мицелия приведены в таблице.

Таблица – Водородный показатель естественных субстратов после наработки мицелия навозника и сморчка

Состав субстрата	рН _{КСl}		рН _{водн.}	
	6 ч	24 ч	6 ч	24 ч
<i>Coprinellus disseminatus</i>				
ЛО	5,7	5,7	6,2	6,8
ЛО+Т	6,1	6,0	6,7	6,7
<i>Morchella importuna</i>				
ЛО	6,4	6,4	6,8	6,7
ЛО+Т	6,6	6,6	7,1	6,4

Таким образом, изученные субстраты можно применять для периодического культивирования с целью поддержания ферментативной активности штаммов и сохранения их потенциала к росту на различном органическом материале. В качестве экспресс метода измерения рН субстратов можно использовать методику с использованием 1N КСl. По результатам исследования достаточно 6 часов выдерживания субстрата в солевом растворе, после чего значения кислотности не меняются. При использовании водной вытяжки стабильное значение достигается только после выдерживания образца в течении 24 ч.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abubakar A., Suberu H.A., Bello I.M. et al. Effect of pH on mycelial growth and sporulation of *Aspergillus parasiticus*. Journal of Plant Sciences, 2013. Vol. 1(№ 4). P. 64–67.
2. Апарин Б.Ф. Почвоведение: учебник для образовательных учреждений среднего профессионального образования. М.: Издательский центр «Академия», 2012. 256 с.
3. Мудрецова-Висс К.А., Дедюхина В.П., Масленникова Е.В. Основы микробиологии: учебник. Владивостокский университет экономики и сервиса. 5-е изд., испр. и доп. М.: ИНФРА-М, 2014. – 354 с.
4. Tyagi S., Paudel R. Effect of different pH on the growth and sporulation of *Fusarium oxysporum*: The causal organism of wilt disease of Tomato. International Journal of Basic and Applied Biology (IJBAB), 2014. Vol. 2 (№ 1). P. 103–106.
5. Беккер З.Э. Физиология и биохимия грибов. М.: Издательство Московского университета, 1988. 230 с.