

Л.П. ДЗИГУН

Національний технічний університет України  
«Київський політехнічний інститут»  
просп. Перемоги, 37, Київ, 03057, Україна

**КУЛЬТУРАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ  
ДЕРЕВОРУЙНІВНОГО ГРИБА  
*POLYPORUS SQUAMOSUS*  
(HUDS.) FR. (*BASIDIOMYCOTA*)**

---

*Ключові слова:* *Polyporus squamosus*, агаризовані середовища, температура, ростовий коефіцієнт, лінійна швидкість радіального росту, ферменти.

Вищі базидіальні гриби привертають увагу як унікальний об'єкт біотехнологій для отримання білків харчового призначення і ферментів різних класів, а також лікувальних речовин із противірусними, антибактеріальними, протипухлинними та імуномодуючими властивостями [2, 4, 18]. До таких грибів належать базидіальні макроміцети родини *Polyporaceae*, представником якої є *Polyporus squamosus* (Huds.) Fr. (трутовик лускатий). У літературі є повідомлення про дослідження цього гриба як продуцента ряду ферментів [6, 8, 13, 14, 16, 17, 20] і фармакологічних речовин [1, 2].

Для розробки будь-яких технологій дуже важливими є відомості про фізіолого-морфологічні особливості культури, що дає змогу створити сприятливі умови культивування та гарантувати чистоту культури в біосинтезі. На жаль, такі відомості щодо *P. squamosus* у літературі майже відсутні. Є лише публікація про умови проростання базидіоспор виду [12]. З урахуваннями вищезазначеного, наші дослідження мали на меті виявити культурально-морфологічні та фізіологічні особливості штамів *P. squamosus* на агаризованих середовищах, зокрема наявність у нього певних ферментів.

**Матеріал і методи досліджень**

Об'єктом дослідження були 10 штамів *Polyporus squamosus* (Huds.) Fr. (*Basidiomycota*). Штам 1758 ми одержали з колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, інший штам — з колекції культур базидіоміцетів Ботанічного інституту ім. В.Л. Комарова РАН (Санкт-Петербург) та ще один — з колекції грибів Донецького національного університету. Влітку 2003 р. ми виділили в культуру сім штамів з плодових тіл, що розвивались на стовбурах і пенях листяних дерев у насадженнях Києва. У чисту культуру гриби виділяли з плодових тіл методом вологих камер з подальшим перенесенням шматочка гриба на агаризоване середовище з додаванням антибіотиків пеніциліну та стрептоміцину в кількості 100–200 Од/мл [3, 5, 9, 10]. Усі нові штами передано в колекцію

культур шапинкових грибів Інституту ботаніки — у статті ми наводимо їх під номерами цієї колекції (1825—1830, 1832, 1841, 1842).

Для досліджень використовували агаризовані живильні середовища: натуральні — морквяне (МА) та пивне сусло з вмістом цукру 4 % (СА), комплексне — картопляно-глюкозне (КГА) і синтетичні — Норкранса (НА) та Чапека (ЧА) [3, 9, 19]. Ріст міцелію досліджували при температурах 4, 22, 28 і 37 °С протягом 30 діб.

Культуру гриба інокулювали агаровим диском діаметром 5 мм на середовище у центр чашки Петрі. Раз на 2 доби вимірювали діаметр колонії (мм) у двох взаємно перпендикулярних напрямках, а також висоту колонії (мм) та її щільність за трибальною системою: 1 — розріджена, 2 — середня, 3 — щільна [3]. Повторність досліджень була трикратною.

Ріст колонії характеризували за швидкістю радіального росту ( $V_r$ , мм/доба) та ростовим коефіцієнтом (РК) [3, 11].

Після повного заростання чашки Петрі проводили якісні кольорові реакції на наявність оксидаз (лакази, тирозинази та пероксидази) нанесенням краплі реактиву на поверхню колонії. Зміну забарвлення фіксували через 30 хв і 24 год. Лаказу виявляли реакцією з  $\alpha$ -нафтолом, тирозиназу — з *p*-крезолем, пероксидазу — з пірогалолом і перекисом водню [9, 10]. При позитивній реакції на лаказу спостерігали появу фіолетового забарвлення, на тирозиназу — жовтогарячого, на пероксидазу — морквяно-червоного.

На глюкозо-пептонно-дріжджовому агаризованому середовищі (ГПДА) за методиками, модифікованими Моліторісом, визначали наявність амілази, протеїназ (желатинази та казеїнази), ліпази, целюлази, полігалактуронази і транселімінази, тобто ферментів, які характеризують здатність гриба засвоювати різні джерела вуглецю [15]. Наявність ферментів визначали після 14 діб росту колонії, деяких з них — за проявом реакції через 30 хв, 1, 12 і 24 год.

Усі отримані в ході експерименту дані обробляли статистично [7].

### Результати досліджень та їх обговорення

Ріст міцелію колоній досліджуваних штамів відбувався на всіх середовищах, крім 1841, який не давав росту на ЧА.

В усіх досліджуваних штамів і на всіх середовищах колонії мали біле забарвлення. Тип колонії здебільшого залежав від середовища культивування та в незначній мірі — від штаму. Найтиповіші колонії показано на рис. 1.

На СА колонія була ватоподібною. З віком вона набувала зонального типу, який поєднував корковий, ватний, пухнастий та лакунозний типи [5]. Інокулюм чітко виділявся з колонії: навколо нього утворювалась зона міцелію діаметром 15—20 мм, щільно притиснутого до субстрату, а на 5—7-му добу від початку росту культури інокулюм і зона навколо нього набували коркового типу. Міцелій краю колоній був занурений у субстрат.

Такі ознаки міцеліальної колонії спостерігали на КГА і МА, хоча на МА колонія була більш пухнастою.

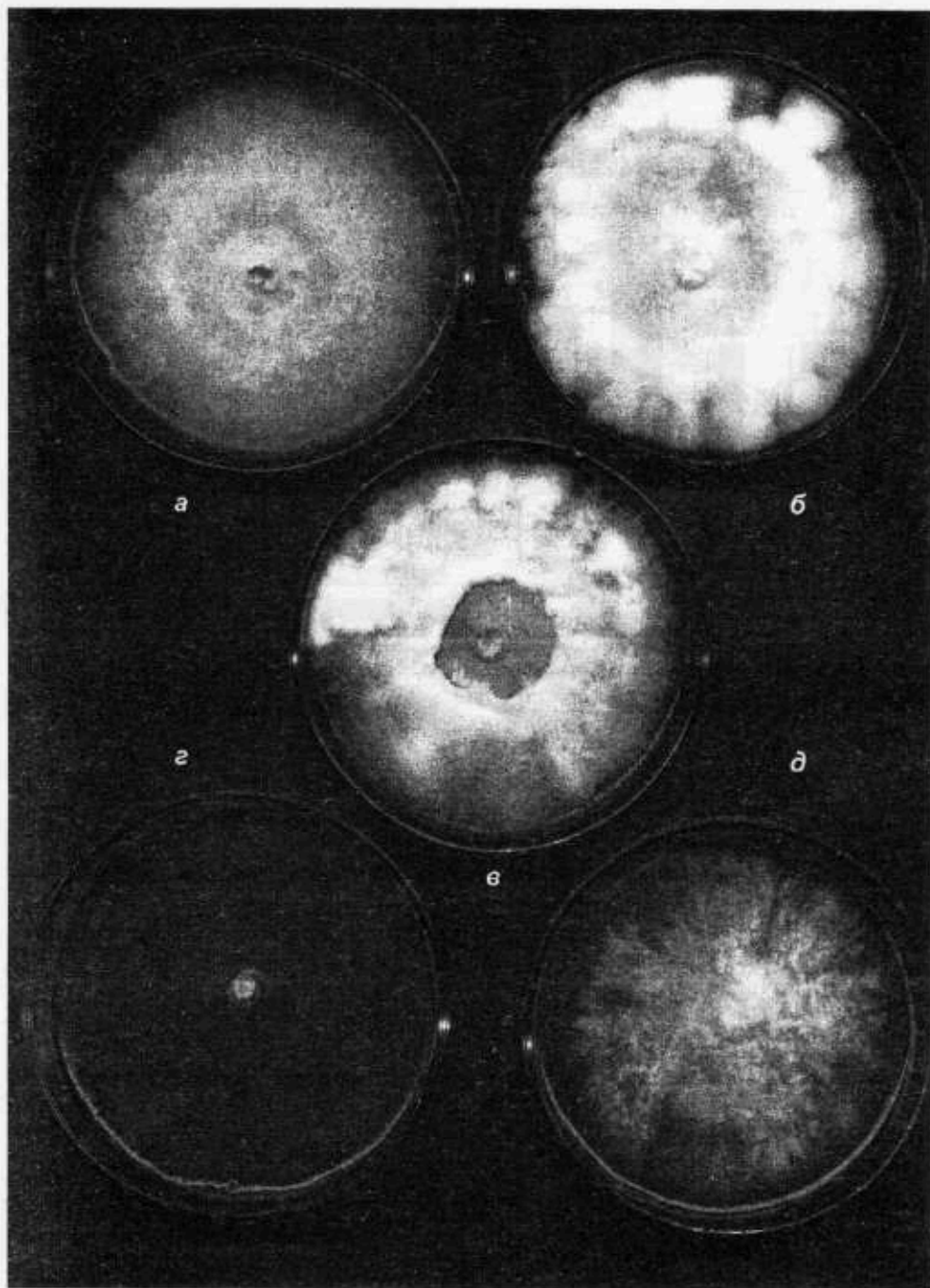


Рис. 1. Колонії *Polyporus squamosus* (Huds.) Fr. (шт. 1827) на агаризованих середовищах різного складу: а — морквяний агар (МА), б — картопляно-глюкозний агар (КГА), в — агаризоване пивне сусло (СА), г — середовище Чапека (ЧА), д — середовище Норкранса (НА)

Fig. 1. Colonies of *Polyporus squamosus* (Huds.) Fr. (strain 1827) on agar medium: а — carrot agar (CA), б — potato-glucose agar (PGA), в — beer wort agar (BWA), г — Czapek's medium (CzA), д — Norkrans's medium (NA)

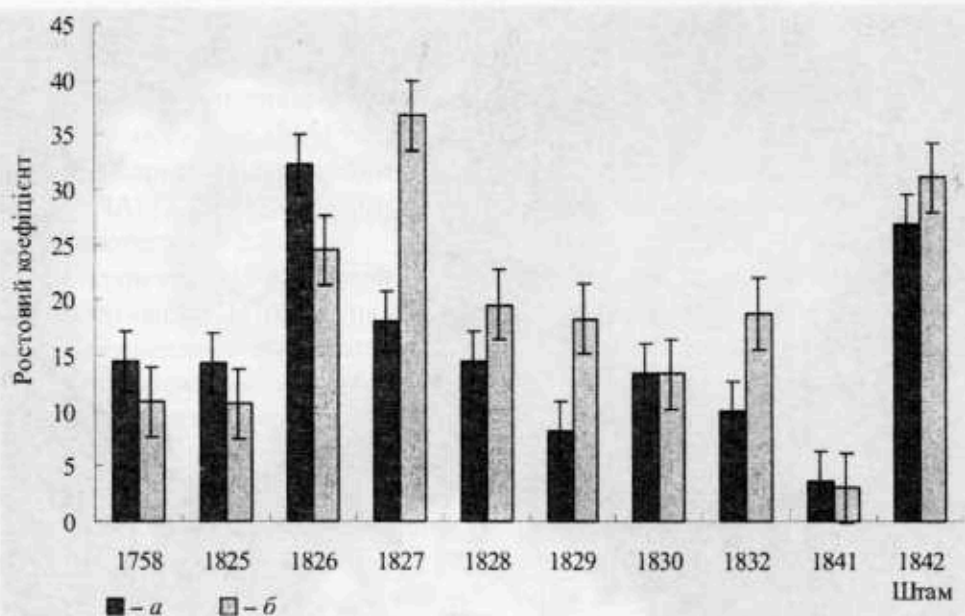


Рис. 2. Діаграма ростового коефіцієнта штамів *P. squamosus* на агаризованому пивному суслі: а — 22 °С, б — 28 °С

Fig. 2. The diagram of growth rate *P. squamosus* strains beer wort agar: a — 22 °C, б — 28 °C

Штам 1841 мав занурений тип колонії на МА, СА та КГА. Лише з віком, після повного обростання субстрату, з'являвся тонкий шар повітряного міцелію і колонія набувала бархатистого типу. Подібний ріст цього гриба може бути пов'язаний з тривалим періодом перебування гриба в умовах культури — на відміну від інших штамів.

На противагу натуральним і комплексному середовищам, на обох синтетичних середовищах колонія мала занурений тип, повітряний міцелій був відсутній. Лише для штамів 1828 на НА та 1826 на ЧА колонія з часом набувала пластівчастого типу. Міцелій колоній на НА та ЧА був дуже різним: на НА — досить щільним і чітко виділявся у товщі середовища, на ЧА це були майже прозорі і ледь помітні в товщі агарової пластинки тонкі міцеліальні нитки, досить відокремлені одна від одної. Така різниця значною мірою може пояснюватися різним складом цих середовищ, зокрема джерелом азотного живлення: для НА — це амоній виннокислий, для ЧА — натрій азотнокислий.

На всіх середовищах інокулюм чітко виділявся з колонії: навколо нього утворювалась зона щільно притиснутого до субстрату міцелію діаметром 15—20 мм. Міцелій краю колоній незалежно від складу середовища був занурений у субстрат.

На СА, КГА та МА через 7—10 діб після повного обростання чашки Петрі з'являлися зачатки примордіїв.

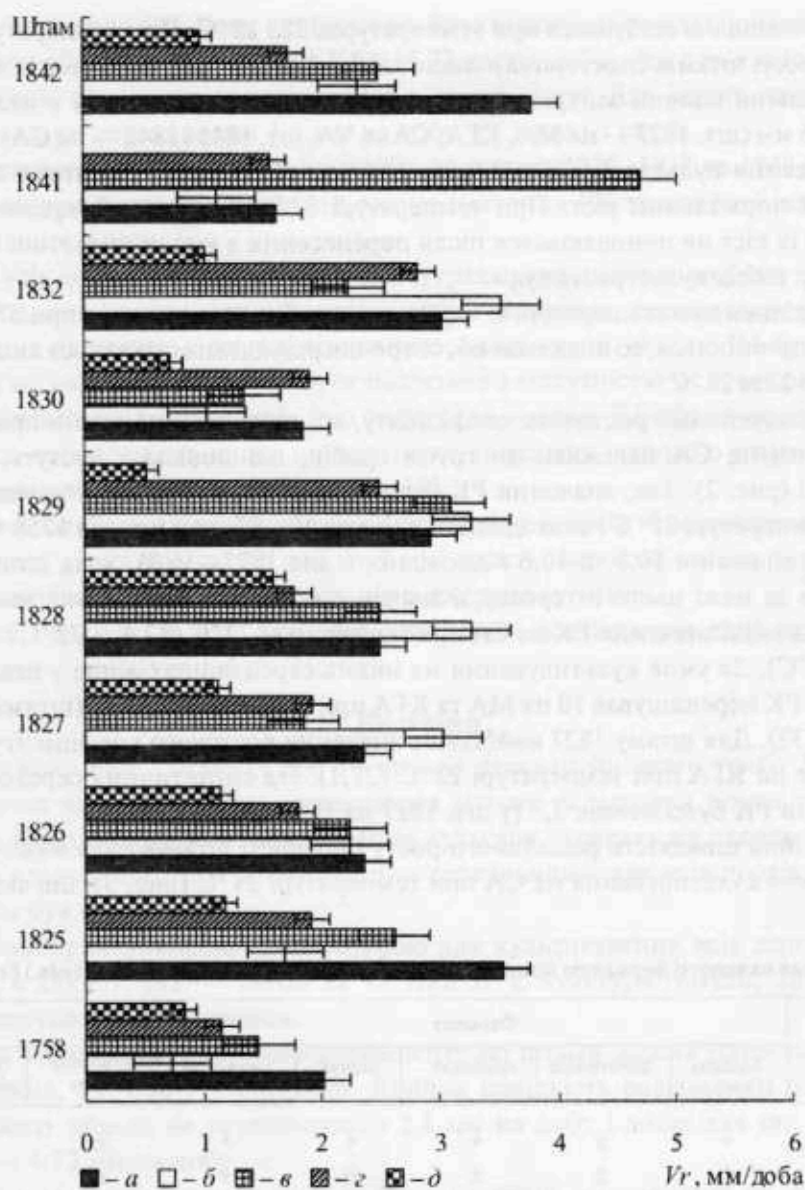


Рис. 3. Діаграма лінійної швидкості радіального росту штамів *P. squamosus* на агаризованих середовищах різного складу при температурі 28°C: 1 – СА, 2 – МА, 3 – КГА, 4 – НА, 5 – ЧА  
 Fig. 3. The diagram of linear speed of radial growth *P. squamosus* strains on agar medium of different composition at temperature 28°C: 1 – BWA, 2 – CA, 3 – PGA, 4 – NA, 5 – CzA

Мицелій колонії був вологий на дотик і мав свіжий, злегка солодкуватий аромат, притаманний і плодовим тілам цього гриба.

Слід зазначити, що для *P. squamosus* є характерним період адаптації до середовища. Так, на СА, КГА та МА ріст мицелію починався на 4–6 добу після інюляції, а на синтетичних середовищах – на 4–10 добу.



Ріст міцелію відбувався при температурах 22 і 28 °С. При температурі 4 °С у більшості штамів спостерігали лише слабкий ріст міцелію на інокулюмі або міцеліальної колонії зануреного типу, розміри якої коливалися в межах від 15 до 25 мм (шт. 1827 — на МА, КГА, СА та ЧА, шт. 1841 і 1842 — на СА). Після перенесення культур в умови з температурою 22 та 28 °С всі штами поновлювали нормальний ріст. При температурі 37 °С культури *P. squamosus* не росли і їх ріст не поновлювався після перенесення в умови кімнатної температури, тобто культури гинули.

Оскільки при температурі 4 °С ріст культур був незначним, а при 37 °С він взагалі припинявся, то подальше обговорення результатів стосується лише температур 22 та 28 °С.

За значеннями ростового коефіцієнту, всі досліджувані штами при культивуванні на СА належали до групи грибів, що повільно ростуть, тобто  $RK < 50$  (рис. 2). Так, значення  $RK$  були найбільшими при культивуванні на СА і температурі 28 °С і знаходилися в межах 10–37 (для штамів 1758 та 1825  $RK$  має значення 10,8 та 10,6 відповідно, а для 1827–36,8), хоча штам 1841 вийшов за межі цього інтервалу зі значенням  $RK$  3,0. Зауважимо, що штам 1826 мав вищі значення  $RK$  на СА при температурі 22 °С (32,4 — 22 °С і 24,5 — при 28 °С). За умов культивування на інших середовищах лише у декількох штамів  $RK$  перевищував 10 на МА та КГА при температурі 28 °С (штами 1827, 1828, 1832). Для штаму 1827 найбільше значення ростового коефіцієнту встановлене на КГА при температурі 22 °С (27,1). На синтетичних середовищах значення  $RK$  було менше 3,5 (у шт. 1827 на НА — 3,3).

Лінійна швидкість радіального росту більшості штамів була максимальна за умов культивування на СА при температурі 28 °С (рис. 3), що значною

#### Визначення наявності ферментів різних класів у культурі *Polyporus squamosus* (Huds.) Fr.

Штам	Фермент						
	амітаза	желатиназа	казеїназа	ліпаза	целюлаза	полігалакту-роназа	транс-ліміназа
1758	+	±	+	+	+	±	+
1825	±	±	±	+	+	±	+
1826	+	±	++	+	++	±	+
1827	+	±	+	+	±	±	+
1828	+	±	±	+	++	±	+
1829	+	±	++	+	+++	±	+
1830	+	±	+	+	+	±	+
1832	+	±	++	+	+	±	+
1841	+	±	+	+	±	±	+
1842	+	±	++	+	++	±	+

Умовні позначення реакції: «±» — не чітко виражена; «+» — слабка; «++» — помірна; «+++» — сильна.

мірою корелює з РК. Хоча найбільшою була швидкість радіального росту шт. 1841 при обох температурах на КГА (4,72 мм на добу), що пов'язано з павутичастим обростанням середовища в чашці Петрі. Для інших штамів цей показник не перевищував 3,8 мм на добу, як видно з рис 3.

Для подальших досліджень відібрано штами 1826, 1827 та 1842 як такі, що водночас показали достатньо високі значення РК та лінійної швидкості радіального росту.

В усіх досліджуваних штаммах на натуральних середовищах були виявлені всі оксидази, на синтетичних середовищах реакція на пероксидазу була нечіткою, а на лаказу — взагалі відсутньою, і лише у шт. 1832 на ЧА була реакція на всі оксидази. Це може бути пов'язано з відсутністю у складі синтетичних середовищ компонентів, що індують лаказу. Подібний прояв оксидаз для всіх досліджуваних штамів може вважатися видовою ознакою, яка описана в літературних джерелах [3, 10].

Результати дослідження інших ферментів у штамів *P. squamosus* наведені в таблиці, з якої видно, що цей гриб має досить широкий спектр ферментів, які дозволяють йому засвоювати різні джерела вуглецю.

Всі отримані в ході експериментального дослідження дані перевірені методами математичної статистики.

### Висновки

Досліджено ріст і морфологію 10 штамів дереворуйнівного гриба *Polyporus squamosus* на агаризованих середовищах різного складу при різних температурах. Показано, що ріст і морфологія культури залежать від складу живильного середовища. Найсприятливішим середовищем для всіх досліджуваних штамів був сусло-агар.

Найсприятливішою температурою для культивування всіх штамів була 28 °С, а для шт. 1827 — також 22 °С. При 37 °С культури гинули, при 4 °С їх ріст значно уповільнювався.

За значеннями ростового коефіцієнту всі штами можна віднести до групи грибів, що ростуть повільно. Лінійна швидкість радіального росту для більшості штамів не перевищувала 3,8 мм на добу і лише для шт. 1841 на КГА — 4,72 мм на добу.

В усіх досліджуваних штамів були виявлені всі оксидази та ферменти різних класів, що дають грибу змогу використовувати різні джерела вуглецю.

1. Бабахин А.А., Ведеников А.А., Бабахин А.А. и др. Иммуносупрессивная активность экстракта высшего мицелиального гриба *Polyporus squamosus* // Иммунология. — 1999. — № 4. — С. 47–51.
2. Бадалян С.М. Основные группы и терапевтическая значимость биоактивных метаболитов, образуемых макромицетами // Проблемы медицинской микологии. — 2000. — 3, № 1. — С. 16–23.
3. Бухало А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре / Отв. ред. Дудка И.А. — Киев: Наук. думка, 1988. — 144 с.

4. Бухало А.С., Соломко Е.Ф., Митропольська Н.Ю. Базидіальні макроміцети з лікарськими властивостями // Укр. ботан. журн. — 1996. — 53, № 3. — С. 192—201.
5. Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубинной культуре / Бисько Н.А., Бухало А.С., Вассер С.П. и др. Под общ. ред. Дудки И.А. — Киев: Наук. думка, 1983. — 312 с.
6. Дудченко Л.Г., Мельничук Г.Г. Дослідження мішливості ізоферментів естераз у культуральному міцелії базидіальних грибів. // Укр. ботан. журн. — 1979. — XXXVI, № 5. — С. 401—407.
7. Зайцев Г.Н. Математическая статистика в экспериментальной биологии. — М.: Наука, 1984. — 424 с.
8. Мельничук Г.Г. Ізоферментні спектри розчинних і структурно-зв'язаних амілаз деяких видів вищих базидіальних грибів // Укр. ботан. журн. — 1979. — XXXV, № 1. — С. 6—9.
9. Методы экспериментальной микологии: Справочник / Под ред. В.И.Билай. — Киев: Наук. думка, 1982. — 550 с.
10. Рипачек В. Биология дереворазрушающих грибов. — М.: Лесн. пром., 1967. — 276 с.
11. Соломко Е.Ф., Ломберг М.Л., Митропольська Н.Ю., Чоловська О.В. Ріст окремих видів лікарських макроміцетів на поживних середовищах різного складу // Укр. ботан. журн. — 2000. — 57, № 2. — С. 119—126.
12. Сухомлин М.Н. Изучение условий прорастания спор базидиомицетов для получения моноспоровых культур // Микробиол. журн. — 2000. — 62, № 3. — С. 3—7.
13. Antov M.G., Pericin D.M., Dimic G.R. Cultivation of *Polyporus squamosus* for pectinase production in aqueous two-phase system containing sugar beet extraction waste // J. Biotechnol. — 2001. — 91, N 1. — P. 83—7.
14. Antov M. G., Pericin D. M. Production of pectinases by *Polyporus squamosus* in aqueous two-phase system // Enzyme and Microbial Technology. — 2001. — 28, Issue 4—5. — P. 467—472.
15. Molitoris H. Peter Methods for determination of enzymatic activities of marine fungi // Czech mycology. — 2000. — 52, № 2. — S. 97—124.
16. Pericin D., Kevresan S., Banka L., Antov M., Skrinjar M. Separation of the components of pectinolytic complex produced by *Polyporus squamosus* in submerged culture // Biotechnol. Lett. — 1992. — 14, N 2. — P. 127—130.
17. Pericin D., Antov M, Dimic N. and Vujicic B. Rapid method for detecting low basal activity of exo-pectinase of *Polyporus squamosus* // Biotechnology Techniques. — 1997. — 11, N 11. — P. 833—836.
18. Stamets P. Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms, 3<sup>rd</sup> Edition. — 2000. — 574 p.
19. Solomko E.F., Buchalo A.S., Wasser S.P., Weis A.L., Mitropolska N.Yu., Grigansky A.Ph. Investigations on *Omphalotus olearius* (DC.: Fr.) Fay. (Agaricales s. l.) in pure culture. // Ukr. Botan. Journ. — 1998. — 55, N 6 — P. 596—605.
20. Vargic T., Mrsa V. Detection of exo-beta-1,3-glucanase activity in polyacrylamide gels after electrophoresis under denaturing or nondenaturing condition // Electroforesis. — 1994. — 15, N 7. — P. 903—906.

Л.П. Дзыгун

Национальный технический университет Украины  
«Киевский политехнический институт»

#### КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ДЕРЕВОРАЗРУШАЮЩЕГО ГРИБА *POLYPORUS SQUAMOSUS* (HUDS.) FR. (*BASIDIOMYCOTA*)

Культуральные особенности десяти штаммов *Polyporus squamosus* исследовали на натуральных, комплексной и синтетических питательных средах (СА, МА КГА, НА и ЧА) при различных температурах (4, 22, 28 и 37 °С). Определены морфологические особенности грибной колонии и скорость радиального роста мицелия различных штаммов *P. squamosus*. Наиболее оптимальной температурой для роста мицелия *P. squamosus* была 28 °С. При помощи качественных цветных реакций установлено наличие оксидаз, а также амилолитических, протеолитических, целлюлолитических и пектолитических ферментов. Полученные дан-



ные позволяют обеспечить оптимальные условия и чистоту культуры при дальнейшем использовании гриба в создании технологий.

*L.P. Dzygoon*

National Technical University of Ukraine «Kiev polytechnical institute»

**CULTURAL PECULIARITIES OF WOOD-DESTROYING MUSHROOM  
*POLYPORUS SQUAMOSUS* (HUDS.) FR. (*BASIDIOMYCOTA*)**

Natural complex and synthetic nutritive media (MA, CA, PGA, NA, CzA) were used for the investigation of cultural peculiarities of 10 *Polyporus squamosus* strains at various temperatures (4, 22, 28 and 37 °C). The morphological features of mushroom colonies and rate of radial mycelium growth in different strains of *P. squamosus* were established. The better temperature for *P. squamosus* radial mycelium growth was determined as 28 °C. The presence of several oxydases and amilolytic, proteolytic, lipolytic, cellulolytic and pectolytic enzymes were revealed by the method of qualitative reactions. Obtain data give possibility to guarantee the purity of the culture in the further use of this mushroom in creation of technology.