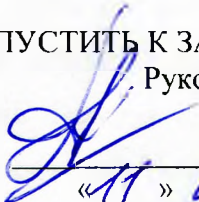


Министерство образования и науки Российской Федерации  
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (НИ ТГУ)  
Институт биологии, экологии, сельского и лесного хозяйства  
Кафедра зоологии позвоночных и экологии

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ В ГЭК

  
Руководитель ООП  
д-р биол. наук  
Д. С. Воробьев  
«11» июня 2019 г.


МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

СПОСОБЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ, ШТАММОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И  
АНТИБИОТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ БАЗИДИАЛЬНОГО ГРИБА *NEOLENTINUS LEPIDEUS*  
(FR.) REDHEAD & AMP; GINNS 1985)

на основной образовательной программе подготовки магистров

направление подготовки 06.04.01 – Биология  
Саксанова Марина Владимировна

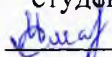
Научный руководитель ВКР  
канд. биол. наук, доцент

  
подпись О. Б. Вайшля

«11» июня 2019 г.

Автор работы

студент группы № 01313

  
подпись М. В. Саксанова

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение .....	4
1. Макромицеты фармацевтического назначения (Литературный обзор) .....	6
1.1 Этномикологический обзор .....	6
1.2 Систематика грибов .....	8
1.3 Таксономическое положение <i>N. leptideus</i> .....	10
1.4 Фунготерапия .....	11
1.5 Биохимический состав макромицетов .....	12
1.6 Клинические испытания .....	13
1.7 Использование высших грибов для создания лекарственных препаратов .....	16
1.8 Промышленное культивирование грибов .....	18
1.9 Биоразнообразие макромицетов Томской области .....	21
2. Лекарственные грибы Томской области .....	23
3. Материалы и методики .....	51
3.1 Метод сбора и идентификации плодовых тел по макропризнакам .....	51
3.2 Приготовление искусственных питательных сред .....	51
3.3 Метод поверхностного культивирования .....	53
3.3.1 Пересев исходной культуры на плотные питательные среды .....	53
3.4 Метод глубинного культивирования .....	54
3.5 Метод контроля маточных культур .....	54
3.6 Методика определения содержания водорастворимого белка .....	56
3.7 Микрометод определения редуцирующих сахаров .....	56
3.8 Метод метаболомного анализа .....	57

3.9 Определение ростового коэффициента и среднесуточной скорости роста.....	57
4. Результаты и обсуждение .....	59
4.1 Штаммовое разнообразие <i>N. lepidus</i> .....	59
4.2 Морфология штаммов <i>N. lepidus</i> .....	59
4.3 Анализ роста макромицета <i>N. Lepideus</i> в жидкой культуре.....	63
4.4 Отбор продуктивного штамма <i>N. lepidus</i> .....	65
4.5 Биохимический состав гриба <i>N. lepidus</i> .....	67
4.6 Контроль контаминации микофильными грибами .....	68
4.7 Антивирусная активность <i>N. lepidus</i> .....	71
ВЫВОДЫ .....	73
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	74

## ВВЕДЕНИЕ

Плодовые тела грибов, являясь важным источником белка, служат традиционной пищей для человека. Многие виды грибов, помимо пищевых целей, используются для производства различных лекарств и биологически активных препаратов [Миронов А. Д., 2001]. С каждым годом во всем мире возрастает интерес к разработке медикаментозных средств на основе природных соединений. Одним из перспективных источников получения лекарственных препаратов являются высшие грибы. Поиск и выделение новых видов и штаммов лекарственных грибов из природных местообитаний в культуру открывает перспективу пополнения коллекций активными продуцентами для развития медицинской биотехнологии [Косогова Т. А., 2013]. Коллекция чистых культур высших грибов имеет практическое значение для изучения, выделения биологически активных компонентов и отбора наиболее эффективных и продуктивных штаммов, на основе которых могут быть разработаны фармакологические препараты [Белова Н. В., 2004].

*Neolentinus lepideus* ((Fr.) Redhead & Ginns 1985) – пилолистник чешуйчатый, один из самых популярных съедобных грибов в Китае и Японии, является близким «родственником», издавна известного своими лекарственными свойствами, гриба шиитаке-*Lentinus edodes* (Berk.) Singer 1941. Шиитаке в народной медицине Востока считается пищей, которая «активирует кровь» и используется для лечения простуды, кори у детей, бронхитов, при желудочной и головной боли, общей слабости [Денисова Н. П., 1998]. На сегодняшний день проведены многочисленные исследования на биологическую активность соединений, выделенных из шиитаке, которые обладают иммуномодулирующим, противоопухолевым, антивирусным, гепатопротекторным, антибактериальным действием [Миронов А. Д., 2001; Л. Юй, 2009; Santoyo, S., 2012]. Преимуществом *N. lepideus* является то, что данный гриб произрастает на территории Томской области и имеет более крупные плодовые тела. В иностранных источниках имеется информация об иммуномодулирующем, антиоксидантном, антигиперлипидемическом, антибактериальном и противогрибковом действии [Jin, M., 2003; Yoon, K.N., 2011; Barranco, P.G., 2010; Castillo, T.A., 2017]. Но несмотря на немалый объем исследований, отсутствует информация об антибиотическом действии гриба *N. lepideus*.

Объектом исследования служил макромицет *Neolentinus lepideus*.

Целью работы являлось изучение штаммового разнообразия и антибиотического действия гриба *Neolentinus lepideus*.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Оптимизация питательной среды для культивирования *Neolentinus lepideus*;

2. Изучение морфологических характеристик штаммов *Neolentimus lepideus* при росте на плотных питательных средах;
3. Анализ динамики роста *Neolentimus lepideus* на жидких питательных средах
4. Получение чистых культур различных штаммов
5. Выявление антибиотического действия *Neolentimus lepideus*.

В данной работе впервые представлена таблица лекарственных грибов Томской области, созданная на основе списка микобиоты нашего региона. Также составлены морфологические описания колоний изученных штаммов при росте на пяти твердых питательных средах различного состава. Впервые проведена проверка *Neolentimus lepideus* на противовирусную активность.

Работа была выполнена на базе малого инновационного предприятия ТГУ «Микобакс» под руководством кандидата биологических наук, доцента Ольги Борисовны Вайшля.

По материалам выпускной квалификационной работы опубликовано два материала в сборнике «Старт в науку» [Смакотина М.В., 2016, 2017] и одна статья в сборнике тезисов Международной экологической студенческой конференции «Экология России и сопредельных территорий» [Смакотина М.В., 2017].

# 1 Макромицеты фармацевтического назначения (Литературный обзор)

## 1.1 Этномикологический обзор

Знания о макромицетах - грибах, образующих крупные плодовые тела, восходят к давним истокам развития человечества [Заикина Н. А., 2007].

Многие народы мира издревле традиционно используют грибы в пищу и применяют их для лечения различных заболеваний, при этом в разных регионах наблюдаются устойчивые особенности использования грибов, в том числе налицо явное предпочтение одних видов перед другими. Индейцы, как правило, не рассматривают грибы как пищевой продукт, но используют их в качестве лекарственных средств. Как универсальное кровоостанавливающее средство все индейские племена традиционно применяют дождевики (роды *Lycoperdon*, *Bovista*, *Calvatia*). На востоке Канады трутовик окаймленный (*Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst.) использовали в качестве кровоостанавливающего, а также как рвотное средство для очищения желудка.

На Африканском континенте местное население использует грибы для еды, «колдовства» и лечения. Наиболее популярны виды, привязанные к термитникам, они активно плодоносят после затяжных дождей и все относятся к роду *Termitomyces*. У крестьян Замбии и Заира грибы оказываются основной пищей (наряду с личинками насекомых) в «голодные» месяцы дождей. И здесь наиболее предпочтительными оказываются макромицеты из рода *Termitomyces*, хотя для еды используются и отдельные представители родов *Lactarius* (млечники), *Russula* (сыроежки), *Cantharellus* (лисички) и *Amanita* (мухоморы). Что касается лечебного применения грибов, то в Южной Африке XVIII в. использовали порошок подаксиса лестичного *Podaxis pistillaris* (L.) Fr. 1829 как средство против рака и лечения карциномных язв. Для аналогичных целей этот гриб использовали в Афганистане.

В Индии грибы как пищевой продукт не имеют такого значения, как в других странах Юго-Восточной Азии. Только в горных районах на севере Кашмира, в Гималаях, а также на западе Бенгали местные жители высоко ценят грибы из рода *Morchella* (сморчки). В Индии, по данным местных микологов, встречается около 300 видов съедобных грибов, но в пищу используются грибы только нескольких таксонов - *Termitomyces*, *Pleurotus* (вешенки), *Volvarellia*, *Agaricus* (шампиньоны), *Calvatia* (головачи), *Tricholoma* (рядовки), *Corpinus* (навозники), *Verpa* (шапочки), *Russula* (сыроежки) и др. Более цивилизованное, городское население Индии в гораздо меньшей степени знает и использует грибы в кулинарии, не

говоря уже о медицинском их применении. Такую непопулярность грибов в этих странах связывают с их долгим колониальным прошлым и сильным влиянием Британских традиций на культуру субконтинента [Денисова Н.П., 1998].

В странах Юго- Восточной Азии, особенно в Китае и Японии, более 100 видов лекарственных грибов используются в народной медицине. До наших времен дошли старинные лечебники Китая, Монголии, Японии, Кореи, России и других стран Европы [Теплякова Т. В., 2014]. Большую популярность в Японии как лечебные и оздоровительные грибы имеют Reishi — «рейши» (*Ganoderma lucidum*), Mai-take (*Grifola frondosa*), Shii-take — «шиитаке» (*Lentinus edodes*). Правительство Японии включило рейши в официальный перечень вспомогательных растительных средств при лечении онкологических больных. Шиитаке в народной медицине Востока считается пищей, которая «активирует кровь» и используется для лечения простуды, кори у детей, бронхитов, при желудочной и головной боли, общей слабости, водянке, оспе, грибных отравлениях и др. [Денисова Н.П., 1998].

Сухие плодовые тела различных видов рода *Fomitopsis* использовались в народной медицине Дальневосточной Азии как гемостатики и противовоспалительные средства. Кроме того, *Fomitopsis pinicola* традиционно используется в качестве антидиабетического материала в корейской народной медицине [Н.-Т. Wu, 2014].

На Австралийском континенте, несмотря на его размеры и благоприятные условия для роста грибов, использование базидиомицетов населением крайне ограничено. Это объясняется, по-видимому, тем, что первые австралийские поселенцы были выходцами из Европы, воспитанные в англо-саксонской культуре, и они сохранили традиции невнимания к грибам как продукту питания. В Новой Зеландии аборигены традиционно использовали для еды несколько видов, а ряд видов рода *Auricularia* они в большом объеме выращивают для продажи Китаю [Денисова Н.П., 1998].

В восточно-европейских странах славянской культуры и в России грибы, наряду с другими «дарами природы», составляли значительную часть питания, особенно у крестьянства. Согласно сохранившимся документам, еще в XVI - XVII веках широко использовали гриб чагу (*Inonotus obliquus* (Fr.) Pilát 1942) как лечебное средство при злокачественных опухолях, а также для лечения желудочно-кишечных заболеваний. Население России и Польши употребляло настои чаги против рака [Денисова Н.П., 1998; Теплякова Т. В., 2014]. В странах же англо-саксонской и романской культуры — Англии, Германии, Франции, Италии, все растущие в лесу грибы долгое время считались «поганками». Английское "toadstool" в настоящее время обозначающее несъедобный гриб, поганку, в средние века обозначало гриб вообще. В западно-европейской мифологии грибы

тесно связаны с жабами, змеями, пауками, ведьмами — со всем тем, что несет опасность и зло. Во многих художественных произведениях, литературных памятниках древности и более близких к нам времен, можно почувствовать явное недоверие и антипатию к грибам.

В дошедших до нас литературных памятниках Древней Греции и Рима упоминаются многие виды базидиомицетов - в сочинениях Теофаста (III в. до н.э.), Диоскурида и Горация (I в. до н.э.), Марциала и Плиния Старшего (I в. н.э.), Галена (II в. н.э.), Афиная (III в. н.э.), Апиция (III-IV в. н.э.) и др.

Народы Восточной Европы можно отнести к давним поклонникам и ценителям грибной кухни. В России и других славянских странах Европы грибы традиционно занимали важное место в питании и лечении преимущественно сельского населения этих стран. В отличие от традиционно письменной медицины других этносов, у русского народа медицинские знания передавались из поколения в поколение устным путем [Денисова Н.П., 1998].

К сожалению, в настоящее время отмечается очень низкая культура потребления грибов в силу утери опыта их применения в народной медицине.

## 1.2 Систематика грибов

Первые классификации грибов и попытки определения их систематического положения предпринимались еще в IV веке до н. э. древнегреческим ученым Теофрастом и в I веке н. э. древнеримским натуралистом Плинием Старшим (Гай Плиний Секунд). Однако таксономическое положение грибов в системе организмов так и не поддавалось определению на протяжении почти двух тысячелетий. После очередной безуспешной попытки найти место грибам в системе организмов смотритель и демонстратор парижского ботанического сада Себастьян Вайян в 1718 г. охарактеризовал грибы как «дьявольское произведение, нарушающее общую гармонию природы». Он заявил, что «грибы созданы лукавым только для того, чтобы смущать самых талантливых исследователей и приводить в отчаяние ботаников».

Действительно, грибы, ведя прикрепленный образ жизни, имеют ряд общих признаков как с растениями, так и с животными [Саенко Г. М., 2009]. Основное отличие грибов от растений заключается в том, что зеленые растения- это автотрофные первичные продуценты, а грибы- гетеротрофные редуценты. Хитиновые оболочки клеток большинства грибов, некоторые черты углеводного и азотного обменов, в результате которых образуется гликоген, серотонин и мочевины- метаболиты, характерные для животной клетки; состав



стеролов- всё это также существенно отличает грибы от растений [Гарибова Л. В., 2005].

С другой стороны, клетка грибов как гетеротрофных организмов столь же существенно отличается и от живой клетки. Основные отличия клеток грибов от простейших- абсорбционный способ питания (всей поверхностью тела); размножение спорами; неподвижность тела. Только в середине XIX века Эрнстом Геккелем впервые было определено место грибов в системе живых организмов, которые наравне с бактериями, водорослями и одноклеточными животными были включены в новое царство Протистов или простейших [Саенко Г. М., 2009; Гарибова Л. В., 2005].

В 1969 г. Р. Г. Виттейкером была предложена более совершенная система живых организмов, состоящая из пяти царств. Из царства растений он впервые выделил грибы в самостоятельное царство.

В последние годы на смену системе деления организмов на пять царств приходит более совершенная система организмов из трех доменов — архей, бактерий и эукариот. Трех доменная структура природы, основана на различиях в высококонсервативной рибосомной РНК (рРНК), по состоящей из 1600 нуклеотидов 16S рРНК прокариот и состоящей приблизительно из 2500 нуклеотидов 18S рРНК эукариот (Рисунок 1).

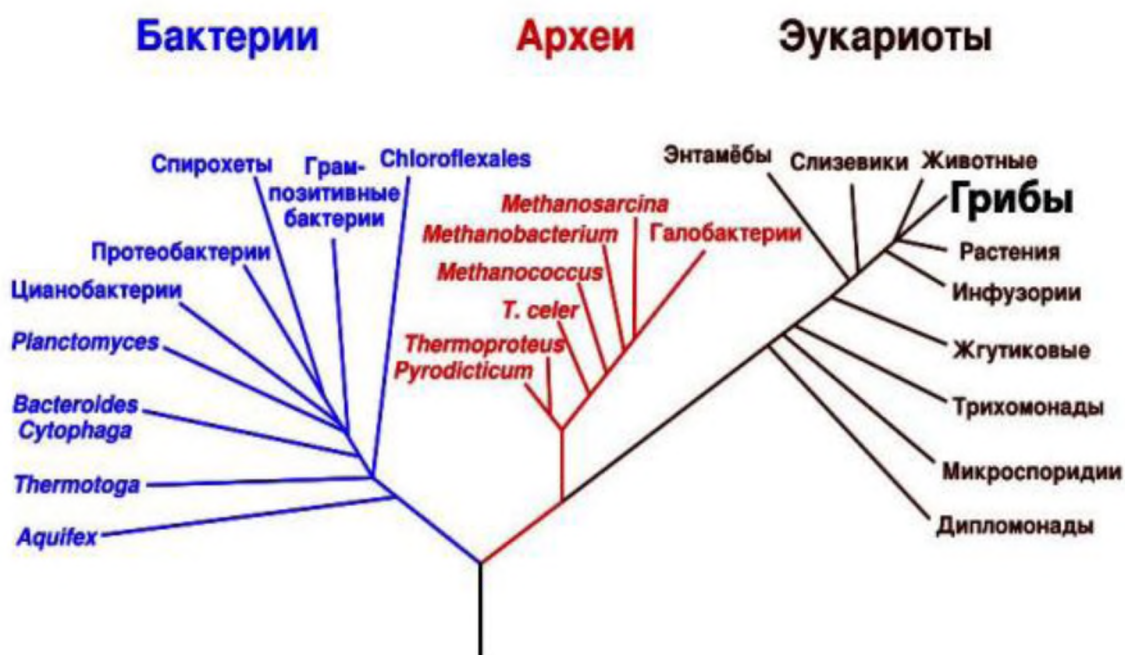


Рисунок 1 – Универсальная трехдоменная филогенетическая система живых организмов (цит. по [Саенко Г. М., 2009].)

Систематика грибов основана на особенностях их морфологии, физиологии, цитологии, экологии и других биологических свойствах. По мере накопления новых данных

о грибах принципы их систематики периодически пересматривались. В настоящее время существует множество систем грибов, авторами которых являются: С. Е. Bessey (1950); L. S. Olive (1975) в модификации Л. В. Гарибовой (1980); Н. Kriesel (1969, 1988); G. S. Ainsworth (1973); F. L. Hawksworth et al. (1983) and M. E. Barr (1987,1992); Т. Cavalier-Smith (1991); М. В. Горленко (1991); В. Kendrick (1992); L. Margulis (1993); D. Moore (1994); G. S. Ainsworth and G. R. Bisby (2001).

Длительное время одной из наиболее распространенных классификаций грибов была классификация М. В. Горленко (1991). В последнее время всё большее распространение в России приобретает система грибов G. S. Ainsworth и G. R. Bisby (2001) [Саенко Г. М., 2009].

Существующие системы грибов создавались с учетом данных, полученных с использованием наиболее современных методов исследования. Например, в основе систем грибов могут лежать данные, полученные с использованием электронной и сканирующей микроскопии. В более поздних системах в основу положены результаты, полученные при изучении морфологии определенных стадий онтогенеза грибов, а в последних системах преобладают результаты молекулярной биологии и геносистематики [Феофилова Е. П., 2013].

Большое количество систем грибов привело к тому, что сейчас не существует единой, общепринятой классификации грибов вследствие ежегодных корректировок и уточнений позиций отдельных таксонов различных рангов [Саенко Г. М., 2009].

### 1.3 Таксономическое положение *N. lepideus*

Пилолистник чешуйчатый в современной систематике занимает следующее положение:

Отдел BASIDIOMYCOTA

П/отдел AGARICOMYCETES

Порядок Polyporales

Семейство Polyporaceae

Род *Neolentimus*

*Neolentimus lepideus* ((Fr.) Redhead & Amp; Ginns 1985)

Справочник Ю. Г. Семенова описывает Пилолистник чешуйчатый следующим образом: растет на пнях, сухих хвойных деревьях и на обработанной древесине (столбах, шпалах, срубках), одиночно и группами.

Шляпка диаметром 3-10 (до 15) см, сначала выпуклая с замкнутым краем, позднее плосковдавленная, слабоворончатая, с тонким краем, сухая, мясистая, грязно-белая, светло-охряная с коричневыми или бурыми чешуйками (крупными в центре шляпки). Ножка длиной 2-5 (8) см и диаметром 1-2 см, центральная или эксцентричная, сильно суженная к основанию, часто изогнутая, сплошная, твердая, светло-охряная с буроватыми чешуйками. Мякоть твердая, упругая, светлая, в ноге деревянистая, позднее жесткая, сухая (Рисунок 2) [Семёнов Ю. Г., 2001].



Рисунок 2 - Пилолистник чешуйчатый (*Neolentinus lepideus*) (Электронный ресурс: <http://wikigrib.ru/pilolistnik-cheshujchatyj/>)

#### 1.4 Фунготерапия

Интерес науки к лекарственным грибам резко возрос благодаря открытию Александром Флемингом первого антибиотика - пенициллина, сделавшего революцию в медицине. Позже ученые начали исследовать и макромицеты. Установлено, что каждый вид грибов может продуцировать до десятка разных видов антибиотиков [Филиппова И. А., 2010].

Фунготерапия- это метод лечения различных заболеваний человека, основанный на использовании лекарственных грибов и комплексных препаратов на их основе. Методики переработки грибов для получения фунгопрепаратов ориентированы не на выделение химически чистого действующего вещества, а на сохранение всего комплекса активных веществ в наиболее простых и приближенных к естественным формам.

В данном методе лечения грибы используются в виде порошков и экстрактов. Экстракт любого растения по сути своей - это концентрированная вытяжка. Для приготовления экстрактов грибы подвергаются глубокой переработке, усиление их целебных свойств происходит за счет концентрирования. Но такой продукт перестает быть природным, потому что гриб подвергается химическому воздействию. Второй вариант — натуральная форма. Здесь полностью отсутствует химическое вмешательство в структуру гриба. Целебные грибы по специальной технологии перемалываются в порошок, который затем легко заваривается как чай. В таком виде грибы отдадут максимальное количество полезных веществ и сохраняют свой природный состав. Поэтому применение фунготерапии во всех формах обладает лечебным эффектом [Филиппова И. А., 2009].

Характеристика грибных экстрактов по содержанию групп БАВ также может иметь прогностическое значение их биологического действия, в том числе противовирусной активности. Максимальный терапевтический эффект может быть достигнут при сочетании суммы биологически активных веществ из разных грибов, т.е. при объединении БАВ из нескольких грибов в одном лекарственном препарате [Костина Н. Е., 2013].

### 1.5 Биохимический состав макромицетов

В последние годы внимание исследователей во многих странах направлено на изучение возможности использования грибов в качестве источника биологически активных и лечебных веществ.

В условиях биотехнологических производств из грибов возможно получение ферментов, антибиотиков, спиртов, стероидов, глицерина, органических кислот, полисахаридов и прочих ценных продуктов, которые в настоящее время получают в условиях опытных производств и в промышленных масштабах. В грибах содержатся все необходимые витамины и микроэлементы, а также антиоксиданты с высоко выраженной способностью к обрыву цепи свободного радикального окисления и вещества, предохраняющие мембраны клеток при стрессовых воздействиях [Огарков Б.Н., 2010].

Базидиальные грибы, как и растения, содержат бетаинсодержащие липиды, сахарозу, нециклические полиолы, холодовые стресс-белки дегидрины [Феофилова Е. П., 2004].

В грибах отсутствует гликоген или животный крахмал, но есть глюкоза, микола и ценные вещества: липиды и фосфатиды, эссенциальные жирные кислоты (важнейший элемент клеток и кишечных мембран), клетчатка. Установлено, что в грибах есть ферменты — амилаза, липаза, ореаза, цитаза. Они расщепляют жиры и углеводы, помогая лучше

усваивать пищу. Также в грибах присутствует высокое содержание фосфорной кислоты — составной части костной ткани и нервных волокон организма человека. Макромицеты представляют собой неисчерпаемый источник полисахаридов и полисахаридпротеиновых комплексов, большинство высших грибов содержат тритерпены, алкалоиды, лактоны. Целебные грибы богаты лецитином, нормализующим холестериновый обмен, нарушения которого приводят к атеросклерозу. Есть в их составе антикоагулянты — вещества, препятствующие сгущению крови. Также у высших базидиомицетов в плодовых телах и мицелии содержатся лектины. Они по биологической активности могут быть иммуномодулирующими, противоопухолевыми, сосудорасширяющими и обладать гипотензивным действием [Заикина Н. А., 2007; Л. Юй, 2009; Габриэль И., 2016].

Лечебные грибы содержат макро- и микроэлементы: фосфор, серу, калий, кальций, железо, магний, натрий, цинк, медь, йод, марганец. Фосфор входит в состав белков и создает правильный энергетический баланс в организме. Калий поддерживает кислотно-щелочное равновесие и регулирует содержание воды в клетках.

Лекарственные грибы содержат витамины: А, группа В, С, D, РР, Е и другие. Кроме того, в состав высших грибов входят иммуномодулирующие полисахариды, коэнзим Q-10 (убихинон). Убихинон — необходимое питательное вещество для нормального энергетического обмена, а также полноценного функционирования сердечно-сосудистой системы и дезинтоксикационной функции печени.

Вещества, которые вырабатывают грибы, — агроцибин, брзофиллин, немотин, биформин — аналогичны по действию современным антибиотикам [Л. Юй, 2009].

Многие базидиомицеты содержат антибиотические вещества, активные против бактерий и грибов: полиацетилены, фенольные соединения, сесквитерпены, кориолин, муцидин, иллуидины и др. [Заикина Н. А., 2007].

В настоящее время плодовые тела и культуральный мицелий многих видов служат сырьевым источником для получения препаратов, которые используются как адаптогены, иммуностимуляторы и терапевтические средства при лечении различных заболеваний. Их существенным достоинством является отсутствие токсичности и значительного побочного эффекта [Нагуманов Ш. З., 2014].

## 1.6 Клинические испытания

В связи с возросшим интересом к базидиомицетам перспективно всестороннее исследование представителей данного класса, особенно в условиях погруженного

культивирования, с целью получения на основе их мицелия профилактических и лечебных средств для поддержания иммунной системы в норме и при патологических состояниях [Кожемякина Н. В., 2010].

Ниже приведены примеры экспериментального использования макромицетов в терапевтических целях:

1. Из выращенных грибов — вешенки, шиитаке, рейши были произведены порошки, которые совместно со специалистами Одесского медуниверситета испытывались на добровольцах. Конкретные положительные результаты получены при применении порошка шиитаке в качестве профилактического противогриппозного средства. За 1,5 месяца до предполагаемой эпидемии более 30 человек получили порошок и рекомендации по его применению. Из них заболели гриппом три человека, причем проявление болезни слабое, без осложнений и с быстрым выздоровлением.

2. На основе выращенных плодовых тел трутовика лакированного (*Ganoderma lucidum*) сотрудниками Одесского медуниверситета был приготовлен порошок для использования в качестве чая. Применяли чай при нейродермите, atopическом дерматите. У 9 больных из 10 после 12 дней регулярного приема симптомы заболевания больше не проявлялись, одной больной продлили прием препарата до 21 дня, после чего наступило выздоровление. Дальнейшие наблюдения за больными показали, что рецидивов болезни не было [Бабаянц О. В., 2004].

3. Китайские ученые протестировали эффективность сочетания обычного противоопухолевого препарата «Цисплатина» с этанольным экстрактом трутовика окаймленного (*Fomitopsis pinicola*) для лечения мышей саркомы S-180. Они обнаружили, что использование этанольного экстракта *F. pinicola* в качестве монотерапии снижает жизнеспособность клеточной линии S-180. Объединение этанольного экстракта *F. pinicola* с «Цисплатином» давало синергетический эффект и было более эффективным, чем использование «Цисплатина» в качестве монотерапии. Их результаты показывают, что этанольный экстракт *F. pinicola* может быть потенциальным альтернативным противоопухолевым лекарственным средством [Н.-Т. Wu, 2014].

4. Введение концентрированного раствора трутовика лакированного (*Ganoderma lucidum*) в желудок мышам с экспериментально вызванным хроническим бронхитом может привести к воспроизводству эпидермальных клеток в бронхах. Инъекция спиртового экстракта мицелия или водного экстракта плодовых тел *G. lucidum* в брюшину оказывает успокаивающее воздействие на кашель и устраняет мокроту. В одном из исследований 2000

китайцев с хроническим бронхитом принимали в течение двух недель сироп из гриба, из них 60—90% отметили выраженное улучшение самочувствия [Л. Юй, 2009].

5. Шесть экстрактов грибов *Agaricus blazei*, *Lentinus edodes*, *Grifola frondosa*, *Ganoderma lucidium*, *Trametes versicolor*, мицелий Кордицепса китайского (*Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 1878) были смешаны в единый состав, выпущены в виде таблеток и ежедневно давались пациентам совместно с лечением химиотерапией или лучевой терапией. Исследование проводилось у 56 больных раком, 30 из них получали смесь экстрактов лекарственных грибов, а 26 пациентов, в качестве контрольной группы, принимали разрешенный лекарственный препарат Polyactin-A. Исследование показало очевидные различия между экспериментальной и контрольной группами. В экспериментальной группе были значительные улучшения в лечебных показателях и показателях качества жизни, по сравнению с контрольной группой пациентов [R. Wang, 2001].

6. Сообщалось, что у мышей, страдающих гиперхолестеремией, регулярное, в течение 28 дней, промывание желудка горячим водным экстрактом мицелия кордицепса (*Ophiocordyceps sinensis*) может снизить уровень жира в крови, уменьшая содержание общего холестерина, триглицеридов, липопротеинного холестерина низкой плотности, повышая уровень липопротеинного холестерина высокой плотности [H.-T. Wu, 2014].

7. Водные экстракты и полисахаридные фракции из мицелия поверхностной культуры вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*) полностью подавляют инфекционную активность вируса герпеса 2 типа и вируса Западного Нила. При внутрибрюшинном введении мышам 0,4 мг водного экстракта вешенки обыкновенной за 24 часа до инфицирования животных вирусом гриппа 2 типа была выявлена их 100 % выживаемость [Теплякова Т. В., 2014].

8. Учеными Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» был проведен анализ на противовирусную активность водных экстрактов, полисахаридов, меланина из плодовых тел и биомассы чистых культур, выделенных из грибов, произрастающих в Западной Сибири. Ими был произведен отбор наиболее эффективных штаммов базидиальных грибов в отношении высокопатогенного штамма гриппа птиц (H5N1) и других вирусов. Таким образом, по мнению авторов, на основе наиболее эффективных продуцентов могут разрабатываться и производиться кормовые добавки и лекарственные препараты, имеющие лекарственное и профилактическое значение [Теплякова Т. В., 2017].

9. Эффект *Lentinus edodes* по уменьшению концентрации липидов в плазме крови был проверен самым тщательным способом. У животных, потребляющих пищу с 5 %

измельченного в порошок гриба, в течении 10 недель уровень холестерина в плазме крови уменьшился (до 20 - 25 %) по сравнению с контрольными животными. Подобный эффект, уменьшающий концентрацию холестерина также получен в экспериментах с людьми [Миронов А. Д., 2001].

Таким образом, опыт мировой практики использования лечебных свойств макромицетов доказывает необходимость дальнейшего поиска и изучения новых, фармакологически значимых видов.

### 1.7 Использование высших грибов для создания лекарственных препаратов

В Японии, Китае, Корее и других странах из плодовых тел дикорастущих и культивируемых грибов выпускают ряд препаратов, широко используемых при лечении различных заболеваний [Теплякова Т. В., 2014]. Для Китая отмечено свыше 270 видов грибов, имеющих медицинскую значимость, при этом макромицеты более чем 100 видов обычно используются в традиционной медицине. В последние годы в России тоже наблюдается заметный всплеск внимания к созданию на основе высших грибов и продуктов их метаболизма лекарственных препаратов [Л. Юй, 2009].

Ниже приводятся исследования зарубежных и отечественных ученых по созданию лекарственных средств и примеры существующих на сегодняшний день лекарственных препаратов, созданных на основе активных соединений макромицетов.

1. Ученые из Западной Африки изготовили препарат «Immune Assist 24/7» из нескольких видов грибов (*Agaricus blazei*, *Cordyceps sinensis*, *Grifola frondosa*, *Coriolus versicolor* (L.) Quél, *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*), он представляет по своей сути биологически активную добавку к пище. Оценивали влияние «Immune Assist 24/7», являющегося иммуномодулятором и противовирусным средством натурального происхождения, на 8 ВИЧ-инфицированных пациентов. Больным вводили по три таблетки 800 мг «Immune Assist 24/7» один раз в сутки, периферическую кровь для контроля забирали в начале исследования, на 30-й день и 6-й день. Установили, что «Immune Assist 24/7» можно использовать как единственное терапевтическое средство без дополнительных антиретровирусных препаратов. У всех пациентов значительно возросло количество Т-лимфоцитов. По мнению авторов, эти результаты указывают на потенциальную ценность дальнейших исследований этого средства на другие иммунные параметры и вирусную нагрузку у ВИЧ инфицированных пациентов [Теплякова Т. В., 2014].



2. В ООО «Микролек» (г. Москва) на основе базидиального гриба траметеса опушенного *Trametes pubescens* (Schumach.) Pilát 1939 разработана биологически активная добавка «Трамелан», обладающая общей иммуностропной и гемостимулирующей активностью, выраженными иммунокорректирующими свойствами [Теплякова Т. В., 2014].

3. У высших грибов в клеточной стенке содержится хитин- глюкановый комплекс. Его используют как пищевые волокна, которые сорбируют в желудочно-кишечном тракте канцерогенные вещества и ионы тяжелых и радиоактивных металлов. Таким действие обладает лекарственный препарат из базидиомицетов - «Микотон», содержащий 70 % хитина, 20 % глюканов и 10 % меланина и имеющий гастроэнтерологическую направленность [Феофилова Е. П., 2003].

4. На основе экстракта мицелия *Pleurotus ostreatus* создан препарат ОВО-Д<sup>®</sup>, который проявляет гиполипидемическое, противоопухолевое, антивирусное действие. В отличие от традиционных препаратов, применяемых для лечения дислипидемий и коронарного атеросклероза (статины, фибраты) ОВО-Д обладает выраженным гепатопротекторным действием. Помимо этого, препарат проявляет антиоксидантную, антиагрегатную, антитромбическую и противовоспалительную активность [Теплякова Т. В., 2014].

5. В Санкт- петербургской химико – фармацевтической академии разработан новый сердечно-сосудистый препарат «Эдодин» на основе гликопротеинового комплекса *Lentinus edodes*. Доклинические испытания показали, что препарат при пероральном введении обладает гипохолестеринемической активностью и протекторным действием на фазотонические показатели сократительной функции сердца [Заикина Н. А., 2009].

6. На основе чаги (*Inonotus obliquus*) в России разработаны препараты нового поколения Чаговит и Чагалюксс, которые могут применяться для профилактики и лечения онкологических, предопухолевых и хронических заболеваний, в том числе сахарного диабета 2 типа (Рисунок 3-4) [Теплякова Т. В., 2014].

	
<p>Рисунок 3 – Лекарственный препарат на основе <i>Inonotus obliquus</i> (Электронный ресурс: <a href="https://prom.ua/p63764797-chagovit-kapsuly.html">https://prom.ua/p63764797-chagovit-kapsuly.html</a>)</p>	<p>Рисунок 4 – Лекарственный препарат на основе <i>Inonotus obliquus</i> (Электронный ресурс: <a href="http://askosana.ru/apteka/naturalnye-preparaty/pishchevye-dobavki/chagalyuks/28689/">http://askosana.ru/apteka/naturalnye-preparaty/pishchevye-dobavki/chagalyuks/28689/</a>)</p>

Таким образом, макромицеты представляют собой большой, но ещё малоиспользуемый источник новых мощных фармацевтических продуктов.

### 1.8 Промышленное культивирование грибов

Промышленное производство съедобных грибов во многих странах мира выделилось в самостоятельную высокопроизводительную отрасль – грибоводство. Объем производства грибов в мире уже в 1986 г. достигал 1,2 млн тонн, в настоящее время эта цифра возросла в среднем в 3 – 4 раза [Феофилова Е. П., 2013].

Грибы как гетеротрофные организмы используют для роста и развития многообразные соединения в качестве источников углерода, азота, минеральных веществ. Для питания грибы активно используют ферменты и осмотрофный путь поглощения веществ из внешней среды.

Для культивирования грибов применяют различные по составу среды:

1. Природные (корнеплоды, зерно, листья, ткани животных).
2. Полусинтетические (комбинированные: картофельно-декстрозная среда, овсяно-глюкозная).
3. Синтетические (компоненты известного строения: глюкозо-нитратная среда, среда Чапека и др.) [Кожемякина Н. В., 2010].

Технологии выращивания грибов, независимо от вида, следуют одной и той же базовой схеме. В то время как два вида могут различаться по температурным требованиям, предпочтениям рН или субстрату, на котором они растут, шаги, ведущие к плодоношениям, по существу, одинаковы. Их можно резюмировать следующим образом:

1. Подготовка и заливка агаровых сред в чашки Петри.
2. Прорастание спор и выделение чистого грибного мицелия.
3. Рост массы мицелия на агаровых средах.
4. Приготовление зерновой среды.
5. Засев чистым мицелием зерновых сред.
6. Заращение инокулированных зерновых сред (мицелием).
7. Посев зернового мицелия на субстрат
8. Образование примордиев- понижение температуры, повышение влажности до 95%, увеличение циркуляции воздуха, уменьшение концентрации углекислого газа и / или введение света.
9. Сбор урожая – поддержание температуры, понижение влажности, поддержание циркуляции воздуха, углекислого газа и / или уровня освещенности [Stamets P., 1983].

Получение плодовых тел макромицетов происходит двумя путями: экстенсивным и интенсивным. Экстенсивный - это рост грибов в условиях, приближенных к естественным — на пнях и стволах деревьев. Лучшими субстратными растениями для грибов-сапрофитов европейской части России являются тополь, ива, бук, граб и дуб. Интенсивный способ — это получение плодовых тел грибов во время искусственного культивирования на питательных средах: субстратах естественного происхождения (зерновые культуры, солома злаков, лужга подсолнечника, кукурузные початки, опилки, стружка, костра льна, хлопковые очесы и др.) в помещениях культиваций с регулируемым микроклиматом [Кожемякина Н. В., 2010].

Технологии культивирования грибов:

Наиболее популярные культивируемые грибы — это шампиньоны (*Agaricus*) и вешенка (*Pleurotus*).

В настоящее время в шампиньоноводстве используются полусинтетические (приготовленные с небольшим добавлением конского навоза: 20-40%) и синтетические (вовсе не содержащие конского навоза) субстраты. Вместо конского часто используют свиной навоз, навоз крупного рогатого скота или птичий помет.

Компосты для шампиньонов получают путем твердофазного компостирования для эффективной жизнедеятельности термофильной микрофлоры, отвечающей за созревание субстратного компоста, необходимо чтобы входящие в состав компоста компоненты

обеспечивали в нем соотношение С и N = 20-25.

Экстенсивная технология приготовления компоста:

Процесс приготовления компоста представляет собой спонтанную ферментацию, т.е. неуправляемый биологический процесс, протекающий в результате саморазогревания влажной органической массы под воздействием термофильных микроорганизмов. При этом температура компостируемого бурта может достигать 65-73 °С. Компостирование длится около 3-4 недель. Через каждую неделю компостируемую кучу перебуртовывают и добавляют мел для нейтрализации кислотности (15 кг/т).

Интенсивные технологии получения компоста:

Две стадии

1. Управляемая ферментация

Субстрат на стадии ферментации помещают в специальные герметичные металлические барабаны, которые переворачиваясь, обеспечивают смеси периодическое перемешивание. Температура 50-55 °С, влажность - 70%. Это обеспечивает нормальное течение микробиологических процессов. Каждый барабан вмещает до 50 кг субстрата. При этом период подготовки сокращается до 7-10 дней.

2. Последующая пастеризация

После ферментации в барабанах, компост подвергают пастеризации при температуре +60-65 °С. Назначение пастеризации - завершение процесса разложения органической массы микроорганизмами с целью накопления питательных веществ для шампиньона. Пастеризация способствует получению однородной гомогенной структуры. В результате пастеризации уничтожаются все болезнетворные агенты и конкурирующие грибы (плесени, навозники). Также значительно снижает риск поражения шампиньона нематодой и грибной мухой.

Плодоношение шампиньона обычно начинается через 4-5 дней после нанесения покровной земли и длится 70-75 дней в виде 5-6 волн. Температура в шампиньоннице в этот период не должна превышать 15-17 °С. Влажность воздуха необходимо поддерживать на уровне 85-90% [Кожемякина Н. В., 2010].

Промышленное выращивание вешенки (*Pleurotus*)- безотходное производство с рациональным использованием природных ресурсов. Субстратом для культивирования грибов служат целлюлозосодержащие отходы растениеводства и различных отраслей перерабатывающей промышленности, а отработанный субстрат можно применять как белково-витаминную добавку к кормам крупного рогатого скота, свиней и птицы, как удобрение под овощные, ягодные и плодовые культуры и как среда для вермикультуры.

## Два варианта интенсивного выращивания вешенки

### 1. Стерильный

Увлажненную питательную среду помещают в автоклав, стерилизуют, а затем вводят в субстрат грибницу — конкурентные микроорганизмы погибают, а мицелий вешенки свободно развивается.

### 2. Нестерильный

В качестве субстратов для вешенки можно использовать солому злаковых культур (пшеницы, ржи, ячменя, овса, проса), стебли и кочерыжки кукурузы, мякину, опилки, стружки и др. Посадку мицелия вешенки производят после охлаждения субстрата до 25—28 °С на глубину 10—15 см из расчета 5—7 % от веса субстрата, так как при меньшем соотношении зарастание затягивается и возникает опасность распространения конкурирующих плесеней. Мицелий вешенки хорошо растет и развивается в помещении, где температура поддерживается в пределах 20—25 °С, а относительная влажность 90 %. Свет в это время не нужен [Заикина Н. А, 2009; Кожемякина Н. В., 2010].

## 1.9 Биоразнообразие макромицетов Томской области

Для территории Томской области, за 12-летний период исследований (2004 – 2015 гг.), собрано около 4900 образцов, которые находятся на хранении в частном коллекционном фонде «Mycota» при музейном комплексе ТГУ. Но все еще остаются неопределенными около 20- 25% сборов коллекционного фонда. Слабо изучены образцы таких крупных родов, как *Cortinarius*, *Clitocybe*, *Entoloma*, *Inocybe*, *Mycena*, *Psathyrella* [Кудашова Н. Н., 2013; Кудашова Н.Н., 2016].

Биота макромицетов Томской области к настоящему времени включает 1168 таксонов (виды, подвиды, разновидности, формы), относящихся к 27 порядкам, 96 семействам и 319 родам. Из них сумчатых (подотдел *Pezizomycotina*) - 76 таксонов из 11 порядков, 25 семейств и 49 родов. Видовая насыщенность сумчатых макромицетов максимальна в двух родах - *Peziza* и *Helvetia* (по 7 видов). Значительно выше биоразнообразие базидиальных макромицетов (класс *Agaricomycetes*), которые представлены 1092 видами, разновидностями и формами из 16 порядков, 71 семейства, 270 родов. Видовая насыщенность базидиальных грибов также максимальна в двух родах — *Russula* (56 видов) и *Cortinarius* (55 видов), вторую ступень занимают роды *Mycela* (36 видов) и *Lactarius* (35 видов), третью — *Tricholoma* (27 видов) и *Inocybe* (26 видов). Впервые выявлено 250 видов макромицетов (21.3 % от предварительного списка), из них 200 - новых для Томской области, 41 - для Западной

Сибири, 6 — для России и 3 предположительно - для науки [Кудашова Н. Н., 2013]. Сотрудниками Томского госуниверситета составлен список редких и охраняемых видов макромицетов Томской области. В данный перечень макромицетов, встречающихся в естественных условиях, входят 196 видов, относящихся к 14 порядкам, 53 семействам и 111 родам. Около 43% видов впервые обнаружены на территории области [Кудашова Н.Н., 2016]. Общее число зарегистрированных видов грибов составляет всего около 50 % от предполагаемого разнообразия макромицетов Томской области (экспертная оценка — около 3000 видов). На исследуемой территории закономерно представлены виды, связанные с таежными формациями. Однако область можно рассматривать и как часть зоны аккумуляции, поскольку на ее территории наблюдается проникновение как европейских (*Agaricus dulcidus*, *Amanita virosa*, *Coprinopsis extinctorius*, *Lactarius helvus*, *Limacella ochraceolutea*, *Pluteus roberlii* и др.), так и дальневосточных (*Polyporus ulmarius*, *Cyathus jiyuguanensis*, *Pluteus magnus*), и североамериканских (*Suillus intermedius*, *Russula brevipes*, *Poliota kodiakensis*) видов макромицетов [О. В. Vaishlya, 2017].

### 3 Материалы и методики

#### 3.1 Метод сбора и идентификации плодовых тел по макропризнакам и выделение чистых культур из плодовых тел

Сбор плодовых тел в природе лучше осуществлять в период их массового появления, в сухую погоду. При сборе грибов необходимо обязательно сохранять целиком ножку, аккуратно извлекая ее из субстрата - почвы, древесины и т. д. Для выделения культуры следует выбирать молодые, неповрежденные плодовые тела, так как они меньше инфицированы микроорганизмами. Выделение можно проводить в день сбора или хранить плодовые тела в течение 2-3 дней в холодильнике в полиэтиленовых мешочках. Перед выделением плодовое тело следует осторожно очистить от прилипших растительных остатков и соскоблить почву с ножки. Затем стерильным скальпелем сделать вертикальный надрез ножки и по надрезу разломить плодовое тело. Выделение производят из места перехода шляпки в ножку [Билай В. И., 1982].

#### 3.2 Приготовление искусственных питательных сред

Состав питательной среды является одним из определяющих факторов, влияющих на плодоношение высших базидиомицетов в условиях чистой культуры. Для получения плодоношения в чистой культуре питательные среды должны соответствовать определенным требованиям. Источник углерода в наиболее часто используемых для плодоношения средах вносится в виде углеводов (глюкозы, мальтозы, сахарозы, спирта). Азот в такие среды вносится в органической (в виде  $\alpha$ -аланина, аспарагина, других аминокислот) или минеральной форме. В последнем случае предпочтение отдается аммонийным солям. В питательной среде большое значение имеет отношение C:N. Обязательным компонентом питательных сред для плодоношения является тиамин [Бухало А. С., 1988].

Для посева мицелия использовали следующие среды из расчета на один литр дистиллированной воды:

Среда Худякова – Возняковской

Глюкоза	15 г
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1 г
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0,6 г

Гидролизат казеина	5 мл
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 г
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,5 г
NaCl	0,1 г
Агар	14 г
Автолизат дрожжей	0,2 г
Фолиевая кислота	1 табл.
FeCl <sub>3</sub>	1 мл
CuSO <sub>4</sub>	0,8 мл
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	0,5 мл
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,5 мл
MnSO <sub>4</sub>	0,5 мл
ZnSO <sub>4</sub>	0,5 мл
Рибофлавин (1%)	0,5 мл
Тиамин (5%)	0,1 мл
Пиридоксин	0,5 мл
Никотин	0,5 мл

Витамины добавляют после стерилизации.

Разливают в литровые колбы по 0,5 л. Стерилизуют автоклавированием в течении 30 минут. Горячую среду разливают в стерильные пластиковые чашки Петри диаметром 60 мм и 90 мм.

#### Среда Хагема

Солодовый экстракт	5 г
Сусло	100 г
Глюкоза	5 г
NH <sub>4</sub> Cl	0,5 г
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 г
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,5 г
FeCl <sub>3</sub> (1%)	0,5 мл

Разливают в литровые колбы по 0,5 л. Стерилизуют автоклавированием в течении 30 минут. Горячую среду разливают в стерильные пластиковые чашки Петри диаметром 60 мм и 90 мм.



### Среда Чапека

Сахар	30 г
KNO <sub>3</sub>	2 г
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 г
MgSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	0.5 г
KCl	0.5 г
FeSO <sub>4</sub>	0.01 г
Автолизат дрожжей	0,2 г

Разливают в литровые колбы по 0,5 л. Стерилизуют автоклавированием в течении 30 минут. Горячую среду разливают в стерильные пластиковые чашки Петри диаметром 60 мм и 90 мм.

### Сусло – агар

Сусло	200 мл
Вода	800 мл
Агар	15 г

Разливают в литровые колбы по 0,5 л. Стерилизуют автоклавированием в течении 30 минут. Горячую среду разливают в стерильные пластиковые чашки Петри диаметром 60 мм и 90 мм.

## 3.3 Метод поверхностного культивирования

Для выделения мицелиальных культур из плодовых тел последние тщательно очищают от растительных остатков и частиц почвы. Затем стерильным скальпелем делают вертикальный надрез ножки и по надрезу разламываем плодовое тело, выделение производится из места перехода шляпки в ножку. Части плодового тела помещаем на твердую питательную среду в чашки Петри и заклеиваем чашки лейкопластырем для предохранения от высыхания. Данная процедура проводится в асептических условиях [Заикина Н. А., 2007].

### 3.3.1 Пересев исходной культуры на твердую питательную среду

Колонию исходной культуры разрезают стерильным скальпелем на кусочки и переносят на агаризованную питательную среду на чашки Петри, в одну чашку помещают от одного до пяти кусочков. Пересев проводят в стерильных условиях в ламинарном боксе. Края чашек заклеивают изолянтной лентой. Засеянные чашки помещают в контейнеры. Контейнеры перед использованием моют моющим раствором, споласкивают и протирают спиртом. Затем культуры хранят при температуре плюс 25 – плюс 28 °С.

### 3.4 Метод глубинного культивирования

При глубинном методе культивирования мицелий погружен в жидкую аэрируемую питательную среду. Глубина погружения различна (0-10 м) и зависит от массообмена, вызываемого аэрацией, конструкции мешалки и других факторов.

Погруженное культивирование имеет ряд преимуществ по сравнению с поверхностным: для мицелия, растущего в толще питательной среды, создаются одинаковые условия (химические, физические); механическое перемешивание среды и непрерывная аэрация способствуют росту мицелия и накоплению продуктов обмена, так как во встряхиваемых культурах растворение и скорость диффузии кислорода выше, чем в стационарных; сокращается срок ферментации и увеличивается количество получаемого, продукта за счет увеличения объема жидкости и применения ферментеров различного типа, позволяющих регулировать ферментационный процесс.

Погруженное культивирование грибов с целью получения желаемых метаболитов проходит в строго определенных режимах, обусловливаемых физиологическими потребностями гриба, с соблюдением стерильности на всех этапах ферментационного процесса [Билай В. И., 1982].

### 3.5 Метод контроля маточных культур

Для идентификации посторонней микрофлоры и паразитов используют метод микрокопирования. Давленный препарат мицелия грибов на предметном стекле просматривается под микроскопом с разным увеличением, начиная с наименьшего. Одним из паразитов высших грибов являются микофилы – это микромицеты (есть некоторое число шляпочных макромицетов), произрастающие на других грибах.

В качестве субстрата микофилы используют плодовые тела, мицелий высших грибов. Видовой состав микофильных грибов на макромицетах значительно отличается от их состава

на микромицетах. Но имеются и общие виды, в основном, гифомицеты из родов *Acremonium*, *Aureobasidium*, *Botrytis*, *Calcarosporium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Monosporium*, *Mortierella*, *Mucor*, *Oospora*, *Penicillium*, *Rhizotrichum*, *Sepedonium*, *Sporotrichum*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Verticillium* [Рудаков О. Л., 1981].

Обнаружить данного паразита можно, если постоянно вести методы контроля маточных культур. Мицелий микофилов развивается внутри мицелия хозяина, либо обвивает вокруг (Рисунок 5).



Рисунок 5 – Микофильный гриб внутри мицелия макромицета [Теплякова Т. В., 2014].

Если паразит в препарате не был обнаружен, то такой мицелий можно использовать в производстве и для дальнейшего ведения маточной культуры. Если в препарате обнаружен паразит, то его необходимо подвергнуть процедуре очистки.

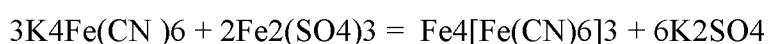
Для контроля культур на наличие микофилов можно использовать замораживание участков колоний с последующем высевом на питательные среды. Присутствующий в клетках базидиального гриба паразит обычно вырастает первым. Способом контроля и разделения грибов может служить глубинное культивирование, в условиях которого микофил может выйти из гифа хозяина и начать размножаться в виде обрывков мицелия или конидий, не типичных для базидиомицета. Одним из приемов очистки от микофила на плотных средах можно считать отсев части колонии с ее периферии на новые чашки [Теплякова Т. В., 2014].

### 3.6 Определение содержания водорастворимого белка

Проводили с помощью экспресс-метода по Брэдфорду. Использовали следующие реагенты: 100 мг G – 250 («Кумасси») растворяли в 50 мл 95% этанола, добавляли 100 мл фосфорной кислоты (85%). Полученный раствор доводили до 1 л дистиллированной водой. Раствор оставляли на сутки, а затем фильтровали через бумажный фильтр. Раствор хранили в темной посуде. Ход определения: в кювете смешивали 0,2 мл образца с белком и 2 мл реагента и через 5 – 10 минут смотрели на спектрофотометре Cary 60 с кюветой 1 см при  $\lambda = 470$  нм. В качестве контроля использовались 2 мл реагента и буфера, в котором растворен белок [Bradford M.M., 1976].

### 3.7 Микрометод определения редуцирующих сахаров

Использовали метод А.С.Швецова и Э.Х.Лукьяненко, основанный на восстановлении феррицианида калия редуцирующими сахарами в щелочной среде до феррицианида. Последний в присутствии желатина образует с серноокислым железом устойчивую синюю окраску:



Интенсивность синей окраски измеряли спектрофотометром Cary 60 в 1 см-кювете.

Реактивы:

5%-ные растворы HCl и NaOH;

Раствор феррицианида  $K_3Fe(CN)_6$  (навеску последнего массой 1,65 и 10 г  $\pm 0,1$  г  $Na_2CO_3$  растворяли в 1 дм<sup>3</sup> воды; раствор хорошо сохраняется в темной склянке);

Раствор серноокислого окисного железа: 1 г  $\pm 0,1$  г  $Fe_2(SO_4)_3$  растворяли в 10 см<sup>3</sup>  $H_2SO_4$  ( $\rho=1,84$ ), который в колбе вместимостью 1 дм<sup>3</sup> доводили водой до метки и 10%-ный раствор желатина; в день употребления готовили рабочий раствор, смешивая объемы обоих растворов в соотношении 20: 1;

4%-ная фосфорно-вольфрамовая кислота.

Ход анализа. Приготовили вытяжки сахаров и осадил белки и другие коллоиды фосфорно-вольфрамовой кислотой. Затем в пробирки, имеющие метки на 20 см<sup>3</sup>, приливали 2 см<sup>3</sup> вытяжки и по 2 см<sup>3</sup> щелочного раствора феррицианида и воды. После этого встряхивали и нагревали на кипящей водяной бане 15 минут. Для равномерного нагревания серии пробирок водяная баня снабжалась мешалкой. После нагревания пробирки охлаждали и приливали в каждую по 4 см<sup>3</sup> раствора серноокислого железа, перемешивали и доводили

дистиллированной водой объем до 20 см<sup>3</sup> – до метки. После хорошего перемешивания измеряли оптическую плотность портативным спектрофотометром с красным светофильтром. Интенсивность синей окраски сохранялась в течение 12 часов.

При суммарном определении сахаров после гидролиза в пробирки с 2 см<sup>3</sup> экстракта приливали 1 см<sup>3</sup> 5%-ной соляной кислоты, и нагревали в течение 5 минут при температуре плюс 70 °С. Затем пробирки охлаждались и нейтрализовались 5%-ной щелочью по лакмусовой бумажке. Далее поступали по описанной выше схеме [Ермаков А. И., 1972].

Вычисление результатов содержания сахаров производили по калибровочной кривой, составленной по раствору глюкозы различной концентрации.

### 3.8 Метод метаболомного анализа

Метаболомный анализ мицелия и плодовых тел осуществляли, используя газовую хромато-масс-спектрометрию. Для получения метаболомного профиля, поверхностный и погруженный мицелий, плодовые тела мацерируют и центрифугируют в режиме 15000 об/мин в течение 10 минут, далее метанольные и хлороформные экстракты используют для метаболомного анализа. Для повышения летучести определяемых веществ к пробам добавляют бистриметилсилилтрифторацетамид. Хроматограммы получают на масс-спектрометре при входном давлении газа 0,61 кПа. Анализ соединений проводили на газовом хроматографе Agilent Technologies 7820A GC Sistem с масс - селективным детектором Agilent 5975 VL. В работе использовали специализированные программные средства: пакет программ AMDIS и пакет программ UniChrom. “ЮниХром” является системой регистрации, обработки и хранения хроматографической информации [Черепица С. В., 2001; Белова Н. В., 2015].

### 3.9 Определение ростового коэффициента и среднесуточной скорости роста

Ростовой коэффициент (РК) вычисляли по формуле:

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

где d – диаметр колонии, мм;

h – высота колонии, мм;

q – плотность колонии, баллы;

t – возраст колонии, сут.

Плотность колонии отмечалась по трехбальной системе (1 – редкая, 2 – средняя, 3 – плотная).

Вычисление скорости линейного роста колонии проводили по формуле:

$$V = (D-d)/t,$$

где  $D$  – диаметр колонии, мм;

$d$  – диаметр инокуляционного блока, мм;

$t$  – продолжительность культивирования, сутки.

По скорости роста колонии условно делили на три группы: быстрорастущие (5,1 мм/сут. и более), растущие со средней скоростью (2,6–5,0 мм/сут.) и медленно растущие (до 2,5 мм/сут.) [Трухоновец, В. В., 2015].

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью программы Microsoft Office Excel с надстройками пакета анализа данных. В таблицах приведены средние арифметические из 6-8 измерений. Достоверность отличий между изученными вариантами оценивалась по  $t$ -критерию Стьюдента.

## ВЫВОДЫ

1. Среда Хагема является оптимальной для культивирования *Neolentinus lepideus*.
2. В культуре всех семи штаммов, выделенных из плодовых тел, присутствовали микофильные грибы.
3. Штамм NL-12 *Neolentinus lepideus* является перспективным для глубинного и поверхностного промышленного культивирования, так как обладает высокой скоростью роста и антивирусной активностью к вирусу гриппа A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1).

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1 Агафонова Н. Н. Макромицеты Томской области (Западная Сибирь). 2. Афиллофоровые грибы / Н. Н. Агафонова [и др.] // Новости систематики низших растений. - 2007. - Т. 41. - С. 92-101.

2 Актуальность разработки препаратов на основе грибов для профилактики и лечения вирусных болезней домашней и сельскохозяйственной птицы / Т. В. Теплякова [и др.] // Современная микология в России. – 2017. – Т. 7, вып. 10. – С. 425-427.

3 Бабаянц О. В. Фунготерапия – основа медицины XXI века / О. В. Бабаянц, М. А. Бушулян, М. А. Залогина // Успехи медицинской микологии. – 2004. – Т. 3, вып. 3. – С. 196-197.

4 Белова Н. В. Метаболомный анализ мицелия и плодовых тел *Mycetinis alliaceus* (Jacq.) Earle ex A.W.Wilson & Desjardin / Н. В. Белова, К. В. Сазанова, А. Л. Шаварда // Микология и фитопатология. 2015. Том 49, вып. 5. С. 305–312.

5 Белова Н. В. Перспективы использования биологически активных соединений высших базидиомицетов в России // Микология и фитопатология. – 2004. – Т. 38. – Вып. 2. – С. 1- 7.

6 Билай В.И. Методы экспериментальной микологии / В. И. Билай. – К. : Наукова думка, 1982. – 550 с.

7 Бухало А. С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. Киев: Наукова думка, 1988. – 144 с.

8 Выделение, характеристика и противовирусные свойства биологически активных веществ из высших грибов Западной Сибири / Н. Е. Костина [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – С. 1-8.

9 Высшие грибы Западной Сибири – перспективные объекты для биотехнологии лекарственных препаратов / Т. В. Теплякова, Т. А. Косогова. – Новосибирск, 2014. – 298 с.

10 Гарибова Л. В. Основы микологии. Морфология и систематика грибов и грибоподобных организмов / Л. В. Гарибова, С. Н. Лекомцева. – М. : Т-во научных изданий КМК, 2005. – 220 с.

11 Горовой Л. Ф. Шляпочные грибы- перспективный источник лечебных препаратов и биологически активных добавок // Успехи медицинской микологии. – 2004. – Т. 3, вып. 3. – С. 212-215.

12 Денисова Н.П. Лечебные свойства грибов. Этномикологический очерк. – СПб.: Изд. СПбГМУ, 1998. – 59 с.

13 Жукович, Е. Н. Тетрациклические тритерпены чаги, *Inonotus obliquus* (pers.) Pil., произрастающей в России / Е. Н. Жукович, М. Ю. Семенова, Л. А. Шарикова, Т. Ф.



Прибыткова // Химико-фармацевтический журнал – 2010. – Т. 44. № 9. – С. 495-496.

14 Кожемякина Н. В. Состав и биологическая активность углеводных компонентов мицелия некоторых базидиомицетов: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Н. В. Кожемякина. – СПб., 2010. – 22 с.

15 Кудашова Н.Н. Дополнительные данные к списку макромицетов Томской области / Н. Н. Кудашова, С. И. Гашков, О. Б. Вайшля // Систематические заметки по материалам гербария им. П.Н. Крылова Томского государственного университета. – Томск: Изд-во Томск. гос. ун-та, 2016. – № 114. – С. 49–60.

16 Кудашова Н. Н. Предварительный список макромицетов Томской области: подотдел Pezizomycotina (Ascomycota) и класс Agaricomycetes (Basidiomycota) / Н. Н. Кудашова, С. И. Пашков, Н. П. Кутафьева // Систематические заметки по материалам Гербария им. П.Н. Крылова Томского государственного университета. - Томск, 2013. - № 107. - С. 22-70.

17 Кудашова Н.Н. Редкие и охраняемые виды грибов Томской области / Н. Н. Кудашова, С. И. Гашков, О. Б. Вайшля // Вестн. Том. гос. ун-та. Биология. – 2016. – № 4 (36). – С. 79–109.

18 Лекарственные грибы в традиционной китайской медицине и современных биотехнологиях / Л. Юй [и др.] ; под ред. В. А. Сысуева. – Киров: О-Краткое, 2009. – 320 с.

19 Макромицеты: лекарственные свойства и биологические особенности. Т.2. / Под ред. проф. И. Габриэля. – К.: Наш формат, 2016. - 261 с.

20 Методы биохимического исследования растений / А. И. Ермаков [и др.] ; под ред. А. И. Ермакова. – Л. : Колос, 1972. – 456 с.

21 Миронов А. Д. Грибы шиитаке. Пищевая ценность и лекарственные свойства. Интенсивные технологии культивирования / А. Д. Миронов. – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2001. – 56 с.

22 Нагуманов Ш. З. Ресурсы лекарственных грибов, применяемых в ветеринарии // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2014. – Т. 218. – № 2. – С. 183-188.

23 Огарков Б.Н. Микро- и макромицеты как основа биотехнологических препаратов / Б.Н. Огарков, Г.Р. Огаркова, Л.В. Самусенок // Изв. Иркутского государственного университета. Сер. Биол., экол. – 2010. - Т. 3, № 2. – С. 75-86.

24 Основы биотехнологии высших грибов: учеб, пособие / Н. А. Заикина [и др.]. – СПб.: Проспект науки, 2007. – 336 с.

25 Промышленная микология: Учебное пособие / В. А. Галынкин [и др.]. – СПб. :

Изд-во СПХФА, 2003. – 220 с.

26 Противовирусная активность базидиальных грибов. Обзор литературы / Т. В. Теплякова [и др.] // Проблемы медицинской микологии. – 2014. – Т. 16. - № 2. – С. 15-27  
Противоопухолевая активность ксиломаннана — нового полисахарида из мицелия *Ganoderma lucidum* / Л. М. Краснопольская [и др.] // Изучение грибов в биогеоценозах: сб. материалов V Междунар. конференции. Пермь, 7-13 сентября 2009 г. – Пермь, 2009. – С. 105-108.

27 Регламент по ведению и хранению коллекционных культур грибов

28 Ресурсы лекарственных грибов на юге Западной Сибири / И. А. Горбунова [и др.] // Хвойные бореальные зоны. – 2009. – XXVI. - № 1. – С. 12-21.

29 Рудаков О. Л. Микофильные грибы, их биология и практическое значение. – М. : Наука, 1981. – 158 с

30 Саенко Г. М. Царство грибов в системе организмов и современное определение вида *Masophomina phaseolina* (Tassi) Gold / Г. М. Саенко, С. В. Зеленцов. В. Т. Пивень // Масличные культуры. Научно- исследовательский бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. - Краснодар, 2009. – № 140. — С. 105-113

31 Семёнов Ю. Г. Полный иллюстрированный справочник грибника / Ю. Г. Семёнов. – М. : Издательский Дом МСП, 2001. – 576 с.

32 Смакотина М. В. Микобиота лесных экосистем Томской области // Экология России и сопредельных территорий: материалы XXI Междунар. экол. студенческой конф. – Новосибирск, 2016. – С. 83.

33 Смакотина М.В. Сохранение макромицетов сосняков и кедровников Томской области в коллекции *in vitro* // Материалы LXVI научной студенческой конференции Биологического института «Старт в науку». – Томск, 2017. – С. 121.

34 Смакотина М.В. Фармакологически значимые макромицеты лесных экосистем Томской области // Материалы LXV научной студенческой конференции Биологического института «Старт в науку». – Томск, 2016. – С. 121.

35 Трухоновец, В. В. Морфолого-культуральная характеристика и рост съедобных и лекарственных базидиальных грибов в культуре / В. В. Трухоновец // Проблемы лесной фитопатологии и микологии. – 2015. – № 1. – С. 218–221.

36 Феофилова Е. П. Достижения и проблемы новой отрасли биотехнологии: получение медицинских препаратов на основе биологически активных веществ мицелиальных грибов / Е. П. Феофилова, В. М. Терешина, А. С. Меморская // Успехи медицинской микологии. – 2003. – Т. 1, вып. 1. – С. 254-255.

- 37 Феофилова Е. П. Мицелиальные грибы как источники получения новых лекарственных препаратов с иммуномодулирующей, противоопухолевой и ранозаживляющей активностями // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2004. - № 1. – С. 27-32.
- 38 Филиппова И. А. Высшие грибы – перспективные источники биологически активных веществ // Международный вестник ветеринарии. – 2010. - № 3.- С. 49-53.
- 39 Филиппова И. А. Популярная фунготерапия: лечение лекарственными грибами / И. А. Филиппова. – СПб. : Диля, 2009. – 128с.
- 40 Фундаментальные основы микологии и создание лекарственных препаратов из мицелиальных грибов / Е. П. Феофилова [и др.]. – М. : Национальная академия микологии, 2013. – 152 с.
- 41 Черепица С. В. Экспертная компьютерная система автоматизации хроматографических измерений и обработки данных «Юнихром-97». Приборы и системы. Управление, контроль, диагностика. – 2001. - №3.- С. 68-75.
- 42 Activation of selective transcription factors and cytokines by water-soluble extract from *Lentinus lepideus* / Jin, M., Jung, H.J., Choi, J.J., et al. // *Experimental Biology and Medicine*. – 2003. - 228 (6). – P. 749-758.
- 43 Antioxidant and Antityrosinase Activities of Various Extracts from the Fruiting Bodies of *Lentinus lepideus* / K. N. Yoon, N. Alam, K. R. Lee et al. // *Molecules*. – 2011. – V. 16. – P. 2334-2347.
- 44 Antiviral activities of *Boletus edulis*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes* extracts and polysaccharide fractions against Herpes simplex virus type 1 / Santoyo, S., Ramírez-Anguiano, A.C., Aldars-García, L., et al. // *Journal of Food and Nutrition Research*. – 2012. – 51 (4). – P. 225-235.
- 45 Appraisal of antihyperlipidemic activities of *Lentinus lepideus* in hypercholesterolemic rats / Yoon, K.N., Lee, J.S., Kim, H.Y., et al. // *Mycobiology*. – 2011. - 39 (4). – P. 283-289.
- 46 Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the Quantitation of microgram Quantities of Protein Utiliting the principle of Protein – dye binding// *Analytical Biochemistry*, 1976. – № 72. – P. 248–254.
- 47 Clinical trial of a mixture of six medicinal mushroom extracts [Electronic version] / R. Wang, Y. Xu, P. Ji et al. – 2001. – URL: [http://alohamedicinals.com/clinical\\_trials.htm](http://alohamedicinals.com/clinical_trials.htm) (дата обращения: 20.05.2017).

48 Eburicoic Acid, an Active Triterpenoid from the Fruiting Bodies of Basswood Cultivated *Antrodia cinnamomea*, Induces ER Stress-Mediated Autophagy in Human Hepatoma Cells / Su Y.C., Liu C.T. et al. // *J Tradit Complement Med* / - 2012. – V. 2(4). – P. 312-322.

49 Evaluation of antioxidant, immunomodulating, cytotoxic and antimicrobial properties of different strains of basidiomycetes from Northeastern Mexico / Barranco, P.G., Ocanas, L.G., Cabrera, L.V., et al. // *Journal of Medicinal Plants Research*. – 2010. – 4 (17). – P. 1762-1769.

50 In Vitro Antileishmanial Activity of Sterols from *Trametes versicolor* (Bres. Rivarden) / V. Leliebre-Lara, L. Monzote Fidalgo, E. M. Pferschy-Wenzig et al. // *Molecules*. – 2016. – V. 21. – P. 1045-1054.

51 In Vivo and In Vitro Anti-Tumor Effects of Fungal Extracts / H.-T. Wu, F.-H. Lu, Y.-C. Su et al. // *Molecules*. – 2014. – V. 19. – P. 2546-2556.

52 Mycelial growth and antimicrobial activity of species of genus *lentinus* (Agaricomycetes) from Brail / Castillo, T.A., Pereira, J.R.G., Alves, J.M.A., et al. // *International Journal of Medicinal Mushrooms*. – 2017. – 19 (12). – P. 1135-1143.

53 Stamets P., Chilton J.S. *The Mushroom Cultivator: A Practical Guide to Growing Mushrooms at home*. Agarikon Press, Olympia, 1983.

54 First List of Macromycetes Forming Ectomycorrhizas in Cedar and Pine Forests of Tomsk Region of West Siberia / O. B. Vaishlya, N. N. Kudashova, C. I. Gashkov, I. A. Bakhtinskaya // *International Journal of Environmental Studies* – 2017.

# Отчет о проверке на заимствования №1



Автор: [smakotinam@gmail.com](mailto:smakotinam@gmail.com) / ID: 4481331

Проверяющий: [smakotinam@gmail.com](mailto:smakotinam@gmail.com) / ID: 4481331

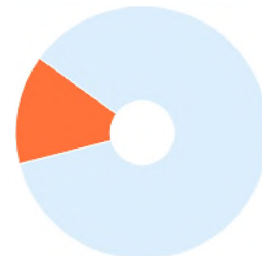
Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат»- <http://users.antiplagiat.ru>

## ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 8  
 Начало загрузки: 13.06.2019 12:46:41  
 Длительность загрузки: 00:00:04  
 Имя исходного файла: Саксанова  
 маг.дис.2019  
 Размер текста: 1795 кБ  
 Символов в тексте: 152084  
 Слов в тексте: 18124  
 Число предложений: 3331

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Последний готовый отчет (ред.)  
 Начало проверки: 13.06.2019 12:46:45  
 Длительность проверки: 00:00:07  
 Комментарии: не указано  
 Модули поиска: Модуль поиска Интернет



**ЗАИМСТВОВАНИЯ** 13,77%  **ЦИТИРОВАНИЯ** 0%  **ОРИГИНАЛЬНОСТЬ** 86,23% 

Заимствования — доля всех найденных текстовых пересечений, за исключением тех, которые система отнесла к цитированиям, по отношению к общему объему документа.  
 Цитирования — доля текстовых пересечений, которые не являются авторскими, но система посчитала их использование корректным, по отношению к общему объему документа. Сюда относятся оформленные по ГОСТу цитаты; общеупотребительные выражения; фрагменты текста, найденные в источниках из коллекций нормативно-правовой документации.

Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.

Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.

Оригинальность — доля фрагментов текста проверяемого документа, не обнаруженных ни в одном источнике, по которым шла проверка, по отношению к общему объему документа.

Заимствования, цитирования и оригинальность являются отдельными показателями и в сумме дают 100%, что соответствует всему тексту проверяемого документа.

Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые пересечения проверяемого документа с проиндексированными в системе текстовыми источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности заимствований или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

№	Доля в отчете	Доля в тексте	Источник	Ссылка	Актуален на	Модуль поиска	Блоков в отчете	Блоков в тексте
[01]	2,19%	2,27%	European medicinal polypore...	<a href="https://doi.org">https://doi.org</a>	01 Сен 2018	Модуль поиска Интернет	23	24
[02]	1,47%	1,47%	Скачать полнотекстовую ве...	<a href="http://journals.tsu.ru">http://journals.tsu.ru</a>	23 Ноя 2016	Модуль поиска Интернет	14	14
[03]	1,28%	1,38%	<a href="http://eprints.maynoothunive...">http://eprints.maynoothunive...</a>	<a href="http://eprints.maynoothuniversity.ac.uk">http://eprints.maynoothuniversity.ac.uk</a>	03 Янв 2017	Модуль поиска Интернет	13	15

Еще источников: 17

Еще заимствований: 8,83%

Руководителю ООП магистратуры  
по направлению 06.04.01 Биология ТГУ  
д-ру биол. наук Д. С. Воробьеву  
от студентки 2 курса М. В. Саксановой

### СЛУЖЕБНАЯ ЗАПИСКА

Прошу разрешить размещение текста моей выпускной квалификационной работы магистра «Способы культивирования, штаммовое разнообразие и антибиотическое действие базидиального гриба *Neolentinus Lepideus* ((Fr.) Redhead & Ginns 1985)» выполненной на базе кафедры Зоологии позвоночных и экологии БИ ТГУ (научный руководитель – доцент О. Б. Вайшля), в электронной библиотеке (репозитарии) ТГУ с изъятием следующих разделов, поскольку они содержат сведения, представляющие интеллектуальную собственность кафедры: «Список лекарственных грибов Томской области», «Результаты и обсуждение».

Научный руководитель К.Б.Н.  
О.Б. Вайшля  
*Вайшля*

11.06.2019 г

*Саксанова*

М. В. Саксанова

*Воробьев*

ДИРЕКТОР БИ  
Воробьев Д.С.