

Московский Государственный Университет  
им. М.В. Ломоносова  
Биологический факультет  
Кафедра микологии и альгологии

# Контаминантная микобиота грибоводческих хозяйств разной специализации

Подготовила А.А. Сенькова  
Руководители: д.б.н., вед.н.с. А.В. Александрова  
ведущий инженер М.Ю. Дьяков

2018 г.

# Введение

На промышленных комплексах по культивированию грибов соблюдаются строгие санитарные предписания. Однако, присутствие микромицетов неизбежно. Они составляют контаминантную микобиоту хозяйства.

Присутствие микроскопических грибов часто приводит к потерям урожая, а заражение некоторыми видами существенно сказывается на качестве и количестве выпускаемой продукции.

Для успешного ведения хозяйства необходимы регулярные лабораторные исследования сырья на присутствие опасных контаминантов и паразитов и оценка чистоты помещений.

Сходная система устройства шампиньонного и вешенного хозяйств дает возможность посмотреть, в чем похоже и как отличается микромицетное сообщество контаминантов этих производств.



# Цель

Проведение сравнительного анализа микобиоты грибных производств разной специализации, а именно шампиньонного и вешенного.

# Задачи

1. выявить видовой состав микромицетов-контаминантов в образцах, отобранных на вешенном хозяйстве;
2. описать видовой состав микромицетов-контаминантов на разных технологических стадиях производства вешенки;
3. провести молекулярную идентификацию изолятов рода *Trichoderma*, выявленных в образцах;
4. провести сравнительный анализ сторонней микобиоты вешенного и шампиньонного хозяйств, а именно сравнить видовой состав, распределение видов между технологическими стадиями и общие тенденции к контаминации.

# Сбор материала

Сбор образцов на территории **шампиньонного** комплекса «Подмосковье» был проведен в два этапа 03.07.2015 и 17.07.2015 г.

Сбор образцов на территории **вешенного** хозяйства «Ростовское» – 13.10.2017 г. Позже 01.02.2018 г. с производства были доставлены дополнительные образцы

Всего было взято 64 образца четырех типов:

- **образцы субстрата – 10 образцов**  
шампиньонное хозяйство - 4, вешенное хозяйство - 6;
- **отпечатки с разных поверхностей внутри производственных помещений – 27 образцов**  
шампиньонное хозяйство - 8, вешенное хозяйство - 19;
- **образцы зараженного субстрата и загрязненных поверхностей – 16 образцов**  
шампиньонное хозяйство – 5, вешенное хозяйство - 11;
- **пробы воздуха – 11 образцов**  
шампиньонное хозяйство – 6, вешенное хозяйство - 5.

## Субстратная машина



## Система нагнетания избыточного давления



# Методы выделения культур

Выделение культур проводили на твердые питательные среды двух типов: сусло-агар и среда Чапека.

<u>Образец</u>	<u>Способ посева</u>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Покровная смесь</li><li>• Компост</li><li>• Соломенный субстрат</li><li>• Образцы загрязнения с поверхностей</li><li>• Заражение соломенного субстрата</li></ul>	Почвенный посев из 3-х разведений ( $10^{-3}$ - $10^{-5}$ ) на твердые среды (сусло-агар, среда Чапека)
Поверхность стен и стеллажей внутри помещений производств	Отпечаток на среду
Проба воздуха	Седиментация на среду (сусло-агар, среда Чапека)
<ul style="list-style-type: none"><li>• Пораженное плодовое тело</li><li>• Заражение покровной смеси</li></ul>	Непосредственный перенос видимого мицелия
<ul style="list-style-type: none"><li>• Зерновой посевной материал</li><li>• Образец загрязнения поверхности (пыль)</li></ul>	Перенесение на чашки Петри на твердые среды (сусло-агар, среда Чапека)

Определение изолятов рода *Trichoderma* проводилось в три этапа:

- по морфологическим признакам (культуральные и микроскопические);
- молекулярный анализ и идентификация;
- сопоставление полученных данных и окончательное отнесение к виду.

# Результаты

В результате проведенной работы на вешенном производстве **выявлено 52 вида** микроскопических грибов и один изолят стерильного мицелия, относящихся к 19-ти родам, 15 семействам, 8 порядкам, 5 классам, 3 отделам: 39 видов аскомицетов, 12 вида зигомицетов и один вид базидиомицетов.

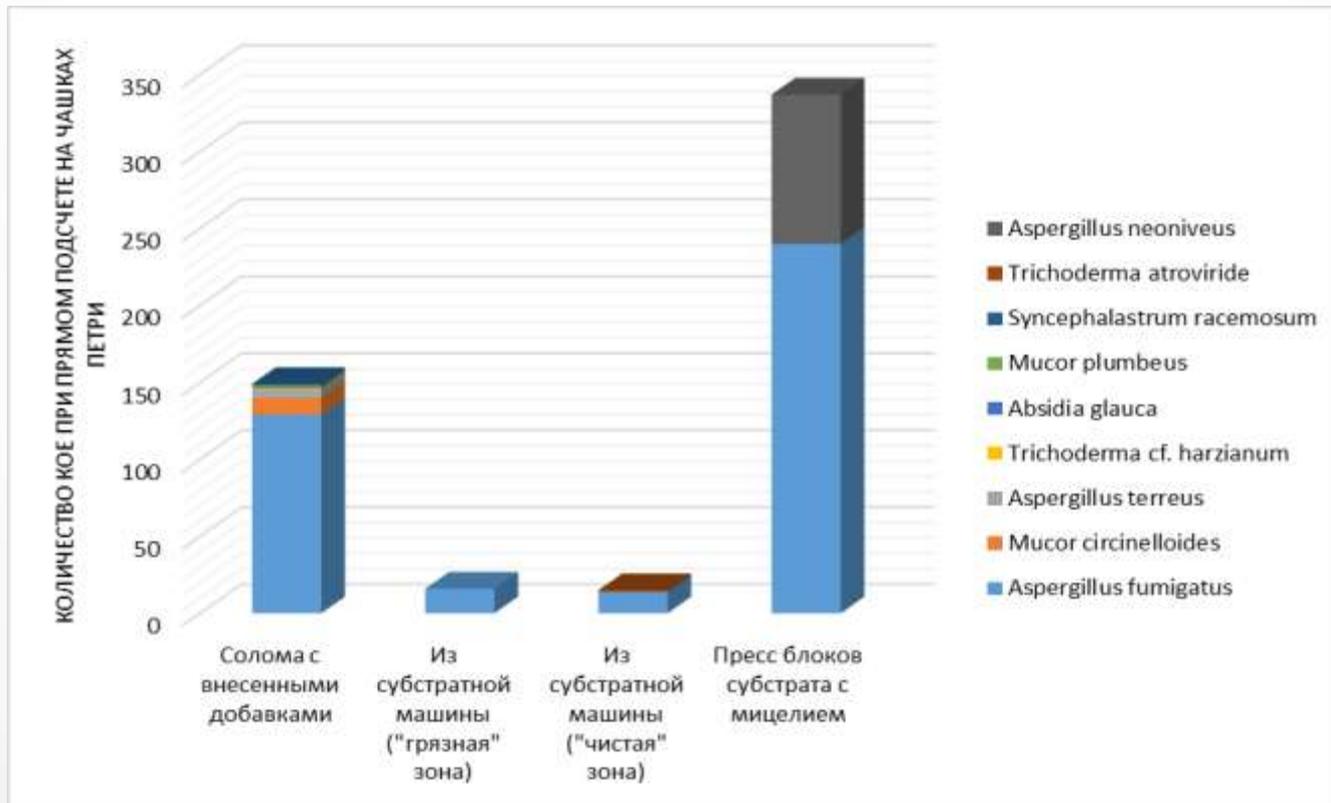
Наибольшее разнообразие отмечено для родов *Aspergillus* (11 видов) и *Penicillium* (8 видов), *Absidia* (5 видов) и *Trichoderma* (4 вида). Для остальных родов выявлены от одного до трех представителей.

Виды, выявленные на шампиньонном производстве, принадлежат 19 родам. Аналогично представлен и список видов на производстве вешенки. Из них **8 являются общими**.

# Результаты

## 1.1. Субстрат на разных этапах технологического производства

- В образцах соломенного и зернового субстратов выявлено 10 видов микромицетов.
- До использования в производстве в соломе присутствовали 7 видов. В образцах соломы из субстратной машины выявлено 2 вида. Далее по ходу формирования субстрата в блоки количество видов не возросло, но увеличилось количество **КОЕ** (колониеобразующих единиц).
- В образцах зернового посевного материала выявлен 1 вид.

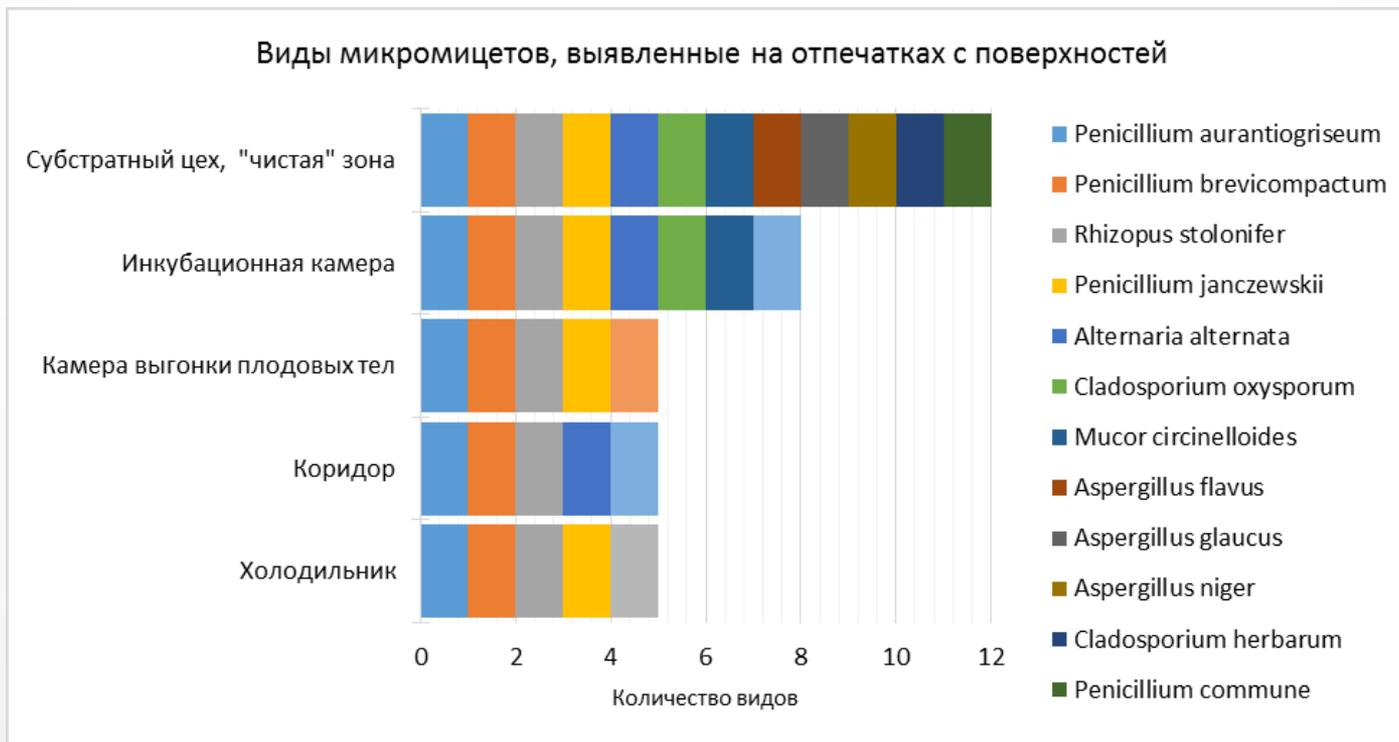


Количество КОЕ микромицетов в соломенном субстрате (подсчет колоний на чашках с разведением навески субстрата в 1'000 раз).

# Результаты

## 1.2. Отпечатки с разных поверхностей внутри производственных помещений

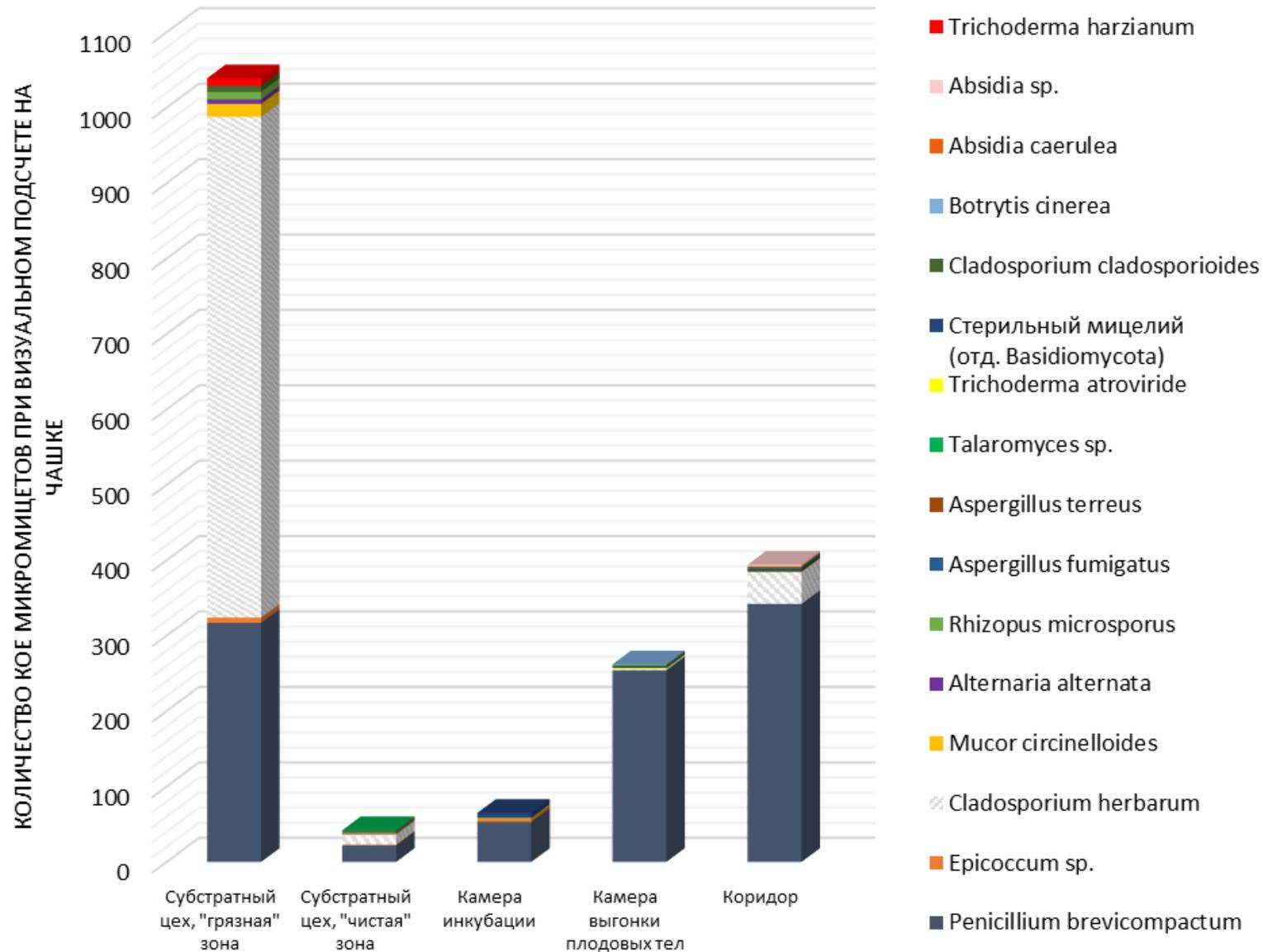
- На разных этапах производства выявлено 15 видов.
- Общими для всех образцов являются *Penicillium aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *Rhizopus stolonifer*.
- Наибольшее количество видов выявлено в «чистой» зоне субстратного цеха и инкубационной камере – 12 и 8 видов соответственно.



# Результаты

## 1.3. Проба воздуха

- Анализ пробы воздуха выявил 15 видов микроскопических грибов. Общим видом для всех образцов и доминантом в четырех из них является *Penicillium brevicompactum*.
- **Наибольшая** споровая нагрузка наблюдается в **«грязной» зоне** субстратного цеха: общее количество КОЕ на чашках составило 1039 единиц.  
**Наименьшая** споровая нагрузка наблюдается в **«чистой» зоне** субстратного цеха: общее количество КОЕ на чашках – 42 единицы.
- При этом **видовое разнообразие** микромицетов в «чистой» зоне субстратного цеха – 9 видов, в «грязной» зоне – 8 видов.
- В культивационных камерах споровая нагрузка воздушного пространства постепенно увеличивается.

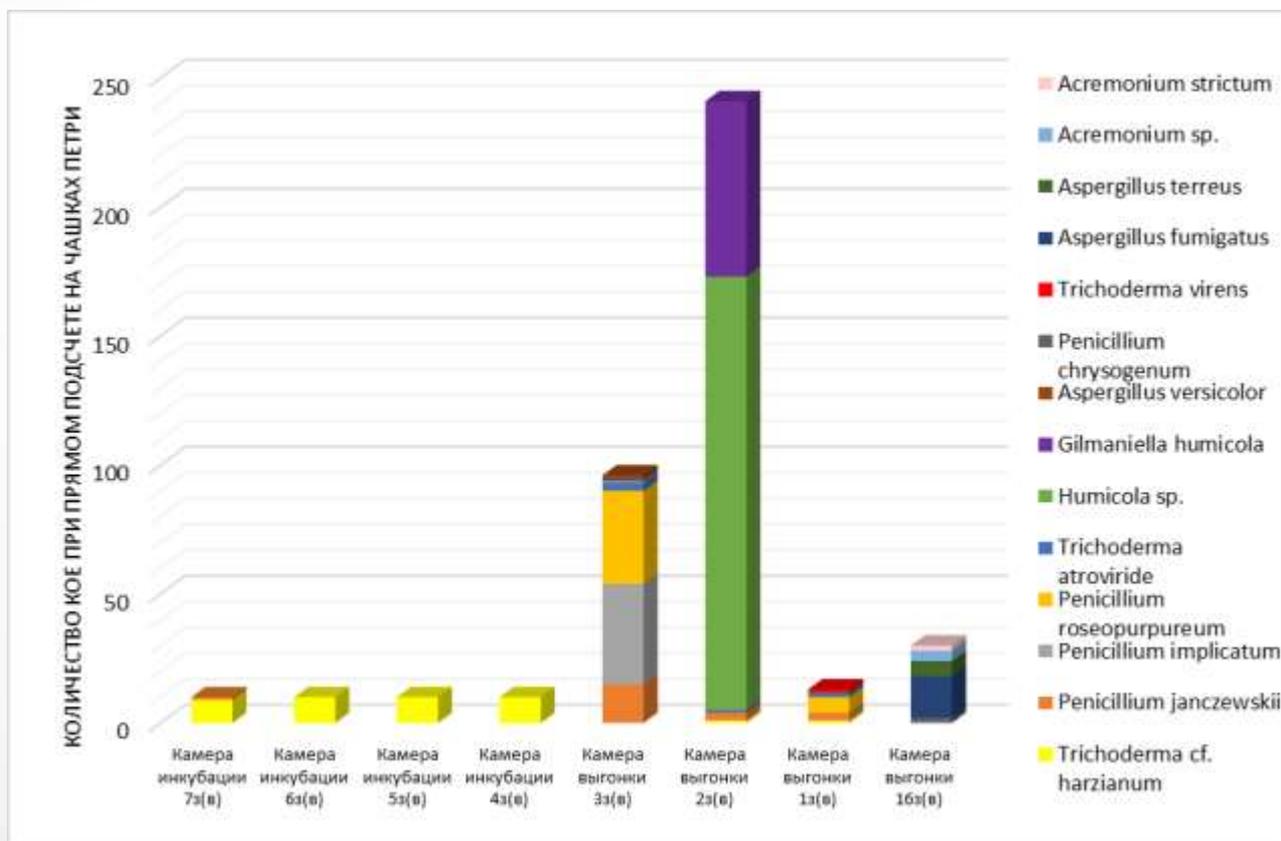


Количество КОЕ микромицетов в пробах воздуха, отобранных в разных помещениях производства

# Результаты

## 1.4. Заражение субстрата контаминантами

- Анализ образцов заражения субстрата выявил 14 видов.
- Во всех помещениях выявлен вид *Trichoderma* cf. *harzianum*
- На стадии инкубации количество микромицетов в образцах составляет 60 – 180 тыс/г, на стадии выгонки плодовых тел – 120 – 2370 тыс/г.

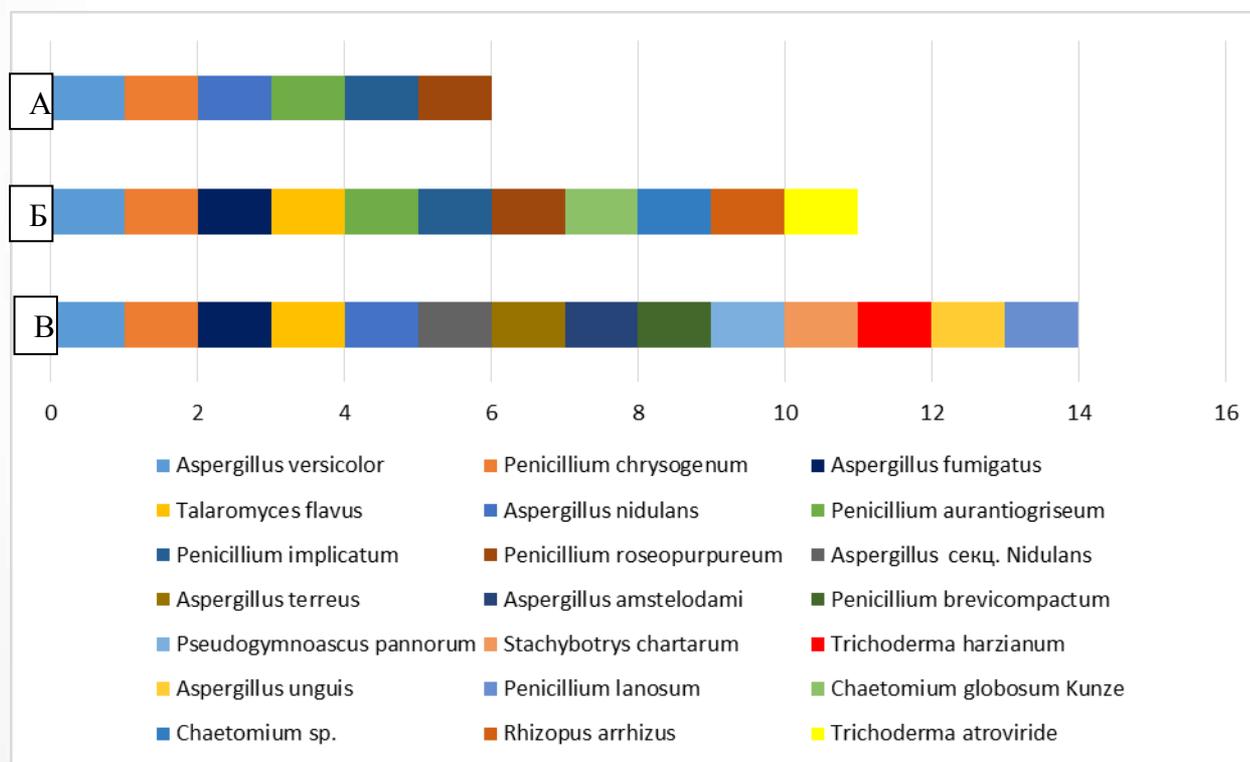


Количество КОЕ микромицетов в образцах заражения субстрата при прямом подсчете на чашках Петри, разведение образцов в 100 000 раз

# Результаты

## 1.5. Материал загрязненных поверхностей

- Из образцов материала загрязнений поверхностей выделено 23 вида. Среди них выявлены виды-доминанты *Aspergillus fumigatus* и *A. versicolor*,
- Типичными видами являются, *A. nidulans*, *A. terreus*, *A. sect. nidulans*, *Trichoderma harzianum*, *Penicillium chrysogenum*, *Talaromyces flavus*.



Виды микромицетов, выявленные в материале загрязненных поверхностей: А – рабочие поверхности «чистой» зоны, Б – система избыт.давления, до фильтра, В – поверхность субстратной машины («грязная» зона)

# Результаты

## 2. Сравнение контаминантной микобиоты двух хозяйств

На основании материалов и результатов, полученных при подготовке дипломной работы на тему «Контаминанты и паразитические грибы грибоводческих хозяйств. Структура рода *Trichoderma* на разных этапах производственного процесса», и материалов данной работы был проведен сравнительный анализ контаминантной микобиоты шампиньонного и вешенного хозяйств.



# Результаты

## 2. Сравнение контаминантной микобиоты двух хозяйств

Виды, выявленные на шампиньонном производстве, принадлежат 19 родам. Аналогично представлен и список видов на производстве вешенки. Из них 8 являются общими:

***Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Penicillium* и *Trichoderma*.**

Основной вклад в различие микобиоты вносит факт использования разных субстратов для культивирования. В целом же на обоих производствах выявленные микромицеты являются типичными контаминантами соломенного субстрата, почвы и помещений.

Роды, уникальные для шампиньонного хозяйства:

- Aureobasidium*
- Chromelosporium*
- Cladobotryum*
- Gongronella*
- Leptodontidium*
- Mycogone*
- Paecilomyces*
- Paraconiothyrium*
- Trichosporiella*
- Trichosporon*
- Ulocladium*
- Umbelopsis*

Роды, уникальные для вешенного хозяйства:

- Absidia*
- Acremonium*
- Alternaria*
- Botrytis*
- Chaetomium*
- Epicoccum*
- Gilmaniella*
- Humicola*
- Lichtheimia*
- Pseudogymnoascus*
- Rhizopus*
- Stachybotrys*
- Syncephalastrum*
- Talaromyces*

# Результаты

## 2. Сравнение контаминантной микобиоты двух хозяйств

Наблюдается аналогичная схема распределения микроскопических грибов на двух хозяйствах в течение производственного процесса.

- На шампиньонном хозяйстве основным источником загрязнения была предположена покровная смесь.
- На вешенном выделить одну гипотезу не представляется возможным.

Патогенные микромицеты, паразитирующие на культуре, выявлены только на шампиньонном хозяйстве: *Mucogone* sp., *Cladobotryum musophilum*.

Среди видов вешенного хозяйства чаще других выявляется вид *Aspergillus fumigatus*, который часто выступает как аллерген.

# Заключение

Для всех изученных образцов характерна смена видового состава по мере прохождения технологических этапов. Также наблюдается и изменение численности грибов.

Для двух хозяйств проведено сравнение контаминантного сообщества. В целом, наблюдается аналогичная схема распределения микроскопических грибов в течение производственного процесса.

На обоих производствах основная часть выявленных микромицетов является типичными контаминантами соломенного субстрата, почвы и помещений.

# Выводы

1. Из 37-ми образцов, которые были отобраны на внешнем производстве, были выявлены 52 вида микроскопических грибов, относящихся к 19-ти родам. Наибольшее разнообразие отмечено для родов *Aspergillus* (11 видов) и *Penicillium* (8 видов), *Absidia* (5 видов) и *Trichoderma* (4 вида). Для остальных родов выявлены от одного до трех представителей. Патогенные виды микромицетов не выявлены.
2. На разных этапах производственного процесса видовой состав и количество присутствующих видов микромицетов хозяйства изменяется. В образцах соломенного и зернового субстрата – 10 видов, заражений субстрата контаминантами – 14 видов, в материале загрязненных поверхностей – 23 вида, на отпечатках с технологических поверхностей – 15 видов, в пробе воздуха – 15 видов.
3. В исходном соломенном субстрате выявлены 7 видов, после прохождения ферментации – 2 вида, после внесения зернового посевного материала – 2 вида. Во всех образцах *Aspergillus fumigatus* является доминирующим. Виды рода *Trichoderma* присутствуют как в исходной соломе, так и в материале из субстратной машины.

## Выводы

4. Образцы отпечатков с поверхностей производственных помещений на разных этапах производства показали присутствие 15 видов. Во всех образцах были выявлены *Penicillium aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *Rhizopus stolonifer*. Виды рода *Penicillium* представляют наиболее разнообразную и доминирующую группу.
5. Анализ пробы воздуха внутри производственных помещений выявил 15 видов микроскопических грибов. Общим видом для всех образцов и доминантом в 4 из них является *Penicillium brevicompactum*. Наибольшая контаминация характерна для «грязной» зоны субстратного цеха.
6. В образцах разрастания контаминантов на субстрате выявлено 14 видов. Во всех помещениях выявлен вид *Trichoderma cf. harzianum*.
7. Из образцов материала загрязнений поверхностей выделено 23 вида. Среди них выявлены виды-доминанты *Aspergillus fumigatus* и *A. versicolor*, присутствующие во всех пробах.
8. В образцах, отобранных на шампиньонном и вешенном производствах, было выявлено по 19 видов микромицетов, из них 8 являются общими. Сходные изменения в видовом составе и количестве по ходу технологических этапов характерны для всех образцов, кроме образца отпечатков с поверхностей (в культивационных камерах

**Спасибо за внимание!**