

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF STEREUM HIRSUTUM AND PLEUROTUS OSTREATUS IN VITRO IN ENRICHMENT WITH A NUTRIENT SOLUTION OF MANGANESE (II) CHLORIDE

Kalko E.I.¹, Zhuk O.N.² (Republic of Belarus) Email: Kalko339@scientifictext.ru

¹Kalko Elena Ivanovna – Postgraduate Student;

²Zhuk Olga Nikolaevna – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor,
BIOTECHNOLOGICAL FACULTY,
POLESSKY STATE UNIVERSITY,
PINSK, REPUBLIC OF BELARUS

Abstract: there is a large variety of basidiomycetes which pharmacological properties are scarcely studied. So they are a promising research object for biotechnology. The article studies the effect of nutrient solution composition on the cultivation of basidiomycetes on the example of *S. hirsutum*, *P. ostreatus*. The need for biosystems in microelements has its differences, but there are no data on the effect of manganese on the growth and development of fungi, particularly *S. hirsutum*. Based on the example of the main constituents of the nutrient solution elements, it has been shown that a change in the concentration of components allows obtaining higher biomass growth rates than in the control variant.

Keywords: manganese (II) chloride, nutrient solution, mushrooms, basidiomycetes, subsurface cultivation.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА *STEREUM HIRSUTUM* И *PLEUROTUS OSTREATUS* IN VITRO ПРИ ОБОГАЩЕНИИ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ХЛОРИДОМ МАРГАНЦА (II)

Калько Е.И.¹, Жук О.Н.² (Республика Беларусь)

¹Калько Елена Ивановна – аспирант;

²Жук Ольга Николаевна – кандидат биологических наук, доцент,
кафедра биотехнологии,
Полесский государственный университет,
г. Пинск, Республика Беларусь

Аннотация: в мире насчитывается большое разнообразие базидиальных грибов, которые являются малоизученными в отношении их фармакологических свойств и в результате являются перспективным объектом исследования для биотехнологии. Исследовано влияние состава питательных сред для культивирования базидиомицетов на примере *S. hirsutum*, *P. ostreatus*. Потребность биосистем в микроэлементах имеет свои отличия, однако данные о влиянии марганца на рост и развитие грибов, и в частности *S. hirsutum*, в литературе отсутствуют. На примере основных составляющих элементов питательной среды показано, что изменение концентрации компонентов позволяет получить более высокие показатели прироста биомассы, чем в контрольном варианте.

Ключевые слова: хлорид марганца (II), питательные среды, грибы, базидиомицеты, глубинное культивирование.

УДК 60:582.284

Законодательством Республики Беларусь грибы включены в состав возобновляемых лесных ресурсов, предназначенных для использования. Запасы грибных ресурсов не является постоянными во времени, а подвергаются возрастным изменениям вместе с фитоценозом и изменяются под влиянием деятельности человека [1-3]. Начало изучения запасов дикорастущих грибов в Беларуси относится к 1932 году [4]. Для планирования рационального использования и охраны грибов необходимо промышленное получение биомассы. Базидиомицеты обладают выраженными лекарственными свойствами, содержат полноценный комплекс биологически активных веществ: иммуномодулирующие и противоопухолевые полисахариды, коэнзим Q₁₀ (убихинон), β-каротин, токоферол, витамины группы В – вещества необходимые для жизнедеятельности организма. В состав высших грибов входят питательные белки, незаменимые аминокислоты, большая группа ферментов, микроэлементы, фосфолипиды и эссенциальные жирные кислоты. Из базидиомицетов выделены вещества, которые проявляют антиоксидантные, антивирусные, антибактериальные, гепатопротекторные, гиполипидемические, кардиотонические, иммуномодулирующие и противоопухолевые свойства [5-10].

Побочные эффекты и токсическое действие лечебных препаратов на основе грибов не выявлены, в связи с этим в последние годы проявляется особый интерес к базидиальным грибам, как источникам новых эффективных и безопасных биологически активных природных веществ [11]. Среди базидиомицетов грибы рода *Stereum* и грибы рода *Pleurotus* классифицируются как грибы, обладающие

хорошей антиоксидантной, антимикробной, противоопухолевой и иммуномодулирующей активностью [12-14].

Культивирование грибов – это биотехнологический метод, позволяющий получить генетически идентичные исходному объекту грибы в условиях *in vitro* [15, 16]. **Целью** настоящей работы явилось сравнение особенностей развития *S. hirsutum* и *P. ostreatus in vitro* в условиях обогащения питательной среды хлоридом марганца (II). Исследования были проведены в научно-исследовательской лаборатории прикладной и фундаментальной биотехнологии на базе УО «Полесский государственный университет». Для исследований был выбран гриб стереум жестковолосистый (*Stereum hirsutum*). Материал для введения в культуру (гриб *S. hirsutum*) отобран из природы в начале апреля 2017 года. Место отбора – город Пинск. Отобранный материал вводили в культуру *in vitro* по методике [16, 17].

Во всем мире большое распространение получила культура грибов рода *Pleurotus*, впервые о выращивании монокультуры *P. ostreatus* в глубинной культуре сообщается в 1948 году [18]. Много методик по выделению в культуру, разработано именно на этом грибе [19]. Поэтому в нашей работе для сравнения используется «дикий» штамм *P. ostreatus*, выделенный в 2014 г из плодовых тел, растущих на культурном тополе (*Populus sp.*) в городе Минске.

Изучения потребности в микроэлементах сыграли исследования на модели *Aspergillus niger* в 1919 году [20] и научно-исследовательская работа продолжается до сих пор [21-23]. Марганец нужен грибам в небольшом количестве, он играет существенную роль в обмене как кофактор шавелевоуксусной и шавелевоянтарной карбоксилазы – фермента, участвующего в основной реакции усвоения CO₂ у гетеротрофов путем присоединения ее к энолпировиноградной кислоте. Общее число обнаруженных у грибов ферментов, где марганец является кофактором (таблица 1) невелико, и они главным образом участвуют в трансформации органических кислот цикла Кребса [24, с.49].

Таблица 1. Ферменты, где марганец является кофактором у грибов

Фермент	Реакция
Изоцитратдегидрогеназа	L-изоцитрат + НАД = 2-оксиглутарат + CO ₂ + НАДН ₂ L-изоцитрат + НАД = 2-оксиглутарат + CO ₂ + НАДФН ₂ (декарбоксилирует также оксалсукцинат)
Гидроксиламинредуктаза	NH ₃ + акцептор ↔ NH ₂ ОН + восстановленный акцептор (доноры водорода флавины)
Имидазолглицерофосфатдегидратаза	D-эритроимидазолглицерофосфат = имидазолацетол-фосфат + H ₂ O
Оксалацетаза (оксалацетатлиаза)	Оксалацетат + H ₂ O ↔ оксалат + ацетат

Однако сведения о влиянии марганца на рост и развитие базидиомицетов фрагментарны, поэтому в данной работе исследовали особенности развития *S. hirsutum in vitro* и проводили сравнение с культурой *P. ostreatus* при добавлении в питательную среду хлорида марганца (II).

Материалы и методы исследования. Объектами исследования служили два штамма грибов *S. hirsutum* и *P. ostreatus*, выращивали в глубинной культуре на картофельно-сахарозной среде (КСС) [16, с. 97; 25, 26] при температуре 27±1°C в термостате, с использованием механического перемешивания на качалке при 70 об./мин., в течение 21 дня [15, 17, 27]. В нашей работе при глубинном культивировании добавляли в питательную среду MnCl₂ в концентрациях 0,025 мг/л, 0,1 мг/л, 0,5 мг/л, 2,5 мг/л, 10,0 мг/л, 20,0 мг/л, 30,0 мг/л, 40,0 мг/л. Эксперименты выполнены четырехкратно.

По окончанию культивирования производили визуальную оценку морфологических особенностей мицелия *S. hirsutum* и *P. ostreatus* отделив его биомассу из каждой повторности от культуральной жидкости, подсчитывали количество мицелиальных клубочков и измеряли их диаметр, по методике [15, с. 230]. Анализ сравнения основан на отличии морфологических признаков: «количество и размеры образовавшихся клубочков и тяжей мицелия *S. hirsutum in vitro* в условиях с обогащением среды хлоридом марганца (II) и без добавления хлорида марганца (II)» и «количество и размеры образовавшихся клубочков и тяжей мицелия *P. ostreatus in vitro* в условиях с обогащением среды хлоридом марганца (II) и без добавления хлорида марганца (II)».

Результаты и их обсуждение. В таблице 2 представлены результаты о количестве образовавшихся мицелиальных клубочков, их размерах в зависимости от концентрации хлорида марганца (II) в питательной среде.

Таблица 2. Характер роста глубинных культур *S. hirsutum* и *P. ostreatus* в зависимости от добавления в питательную среду MnCl₂ в концентрациях 0,025 мг/л, 0,1 мг/л, 0,5 мг/л, 2,5 мг/л, 10,0 мг/л, 20,0 мг/л, 30,0 мг/л, 40,0 мг/л

Концентрация	Сравнительная характеристика количество клубочков мицелия по
--------------	--

MnCl ₂ мг/л	классам диаметра (см)							
	0,3-0,5		0,6-2,0		2,1-3,0		3,1-7,5	
	<i>S. hir.</i>	<i>P. ost.</i>	<i>S. hir.</i>	<i>P. ost.</i>	<i>S. hir.</i>	<i>P. ost.</i>	<i>S. hir.</i>	<i>P. ost.</i>
Контроль (0 мг/л)	6-50	20-88	1-10	3-8	1	0-2	2	0-1
Вариант 1 (0,025 мг/л)	3-12	15-132	2-9	3-9	1	0-1	2	0-1
Вариант 2 (0,1 мг/л)	10-69	0-30	1-10	0-8	0	0-1	2	0-1
Вариант 3 (0,5 мг/л)	3-20	0-50	1-10	3-12	1	0-1	4	0-1
Вариант 4 (2,5 мг/л)	4-30	1-34	1-10	1-11	2	0-7	3	0-1
Вариант 5 (10 мг/л)	1-100	5-30	1	3-12	0	0-1	2	0-1
Вариант 6 (20 мг/л)	10-28	1-30	2-20	0-9	1	0-1	1	0-1
Вариант 7 (30 мг/л)	1-100	18-49	1	1-10	1	0-2	1	0-1
Вариант 8 (40 мг/л)	1-45	3-180	2-16	0-7	0	0-3	1	0-1

В таблице 2 возможно проследить особенности влияния MnCl₂ в концентрациях 0,025 мг/л, 0,1 мг/л, 0,5 мг/л, 2,5 мг/л, 10,0 мг/л, 20,0 мг/л, 30,0 мг/л, 40,0 мг/л в питательной среде на количество и размер образовавшихся клубочков мицелия глубинной культуры *S. hirsutum* и *P. ostreatus*. Во всех вариантах эксперимента из инокулома развивались клубочки разного диаметра от 0,3 до 7,5 см. Также в процессе культивирования образовывались вторичные, мелкие клубочки. При росте в питательной среде, содержащей MnCl₂, наблюдалось образование большего количества клубочков укрупненного размера по сравнению с контролем, что свидетельствует о влиянии MnCl₂ на рост *S. hirsutum* и *P. ostreatus in vitro*. Однако у *S. hirsutum* наблюдалось больше крупных клубочков диаметром от 3,1 до 7,5 см, а у *P. ostreatus* больше мелких клубочков диаметром от 0,3 до 0,5 см. Во всех вариантах эксперимента клубочки *S. hirsutum* плотные, гладкие и студенистые, неопушенные, цвета слоновой кости, а у *P. ostreatus* клубочки рыхлые, ворсисто-лучистые, молочно-белого цвета. При глубинном культивировании для *S. hirsutum* характерен метанольный запах, а для *P. ostreatus* был присущ грибной аромат.

Клубочки глубинной культуры *S. hirsutum* в контроле, а также в колбах с MnCl₂ при концентрации 0,025 мг/л, 0,1 мг/л, 0,5 мг/л, 2,5 мг/л – рыхлые и гладкие, в колбах с концентрацией 10,0 мг/л, 20,0 мг/л, 30,0 мг/л, 40,0 мг/л – более плотные. Самые крупные клубочки образовывались в колбах с MnCl₂ при концентрации 0,5 мг/л. Множество мелких клубочков наблюдали в колбах с MnCl₂ при концентрации 10,0 мг/л и 30,0 мг/л.

Во всех вариантах эксперимента с глубинной культурой *P. ostreatus* наблюдали рост мицелия в виде клубочков, покрытых лучистыми выростами. В контроле, а также в колбах с MnCl₂ при концентрации 0,025 мг/л, 0,1 мг/л, 0,5 мг/л, 2,5 мг/л клубочки мицелия были рыхлые, ворсисто-лучистые. Длина лучистых выростов во всех колбах, в которых присутствовал MnCl₂, визуальнo больше, чем в контрольных колбах без MnCl₂. В колбах с MnCl₂ при концентрации 10,0 мг/л, 20,0 мг/л, 30,0 мг/л, 40,0 мг/л наблюдали более плотные клубочки и менее лучистые по сравнению с контролем.

Соответственно, при глубинном культивировании для увеличения количества и размеров мицелиальных клубочков оптимальной оказалась концентрация MnCl₂ 0,5 мг/л для *S. hirsutum* и для *P. ostreatus*, а при концентрации MnCl₂ превышающей 10,0 мг/л наблюдается интенсивное формирование мелких клубочков у обеих культур.

У выросших в ходе трех недельной инкубации культур наблюдается нарастания мицелия на стенках сосудов в виде тяжей над уровнем питательной среды [15, с. 258]. В таблице 3 можно проследить особенности влияния MnCl₂ в концентрациях 0,025 мг/л, 0,1 мг/л, 0,5 мг/л, 2,5 мг/л, 10,0 мг/л, 20,0 мг/л, 30,0 мг/л, 40,0 мг/л в питательной среде на количество и размер образовавшихся мицелиальных тяжей глубинных культур *S. hirsutum* и *P. ostreatus*.

Таблица 3. Образование мицелиальных тяжей глубинных культур *S. hirsutum* и *P. ostreatus* в зависимости от добавления в питательную среду MnCl₂ в концентрациях 0,025 мг/л, 0,1 мг/л, 0,5 мг/л, 2,5 мг/л, 10,0 мг/л, 20,0 мг/л, 30,0 мг/л, 40,0 мг/л

Концентрация MnCl ₂ мг/л	Сравнительная характеристика количество тяжей мицелия по классам (см)			
	Ширина 0,3-0,5	Ширина 0,6-2,0	Ширина 2,1-3,0	Ширина 3,1-7,5
	Длина	Длина	Длина	Длина

	1-10 (см)		11-20 (см)		21-30 (см)		21-30 (см)	
	<i>S. hir.</i>	<i>P. ost.</i>						
Контроль (0 мг/л)	1	0	2	1	0	0	0	0
Вариант 1 (0,025 мг/л)	0	1	3	1	1	0	0	0
Вариант 2 (0,1 мг/л)	1	1	1	1	1	0	1	0
Вариант 3 (0,5 мг/л)	0	0	1	2	2	0	0	0
Вариант 4 (2,5 мг/л)	0	1	2	2	0	0	1	0
Вариант 5 (10 мг/л)	1	1	1	1	1	0	0	0
Вариант 6 (20 мг/л)	1	2	3	2	0	0	1	0
Вариант 7 (30 мг/л)	1	1	1	1	1	0	1	0
Вариант 8 (40 мг/л)	1	1	2	2	2	0	0	0

Разительны отличия образования мицелиальных тяжей, у глубинной культуры *S. hirsutum* при обогащении $MnCl_2$ питательной среды ширина тяжей составляла от 0,3 до 7,5 см, а у *P. ostreatus* от 0,3 до 2,0 см, тяжести ширины которых составляла от 2,1 до 7,5 см отсутствовали.

Цвет биомассы *S. hirsutum* и *P. ostreatus in vitro* изменялся по мере увеличения концентрации $MnCl_2$ в питательной среде. В контроле и при добавлении $MnCl_2$ в концентрации 0,025 мг/л клубочки и тяжести у *S. hirsutum in vitro* были бледно-желтые, при концентрации 0,1 мг/л, 0,5 мг/л и 2,5 мг/л – светло-желтые, при концентрации 10,0 мг/л, 20,0 мг/л, 30,0 мг/л, 40,0 мг/л – темно-желтые. На поверхности клубочков и тяжей, которые росли в среде с $MnCl_2$ в концентрациях 10,0 мг/л, 20,0 мг/л, 30,0 мг/л наблюдались небольшие потемнения, светло-коричневые пятна, при концентрации $MnCl_2$ 40,0 мг/л – коричневые пятна.

У *P. ostreatus in vitro* в контроле и при добавлении $MnCl_2$ в концентрации 0,025 мг/л клубочки и тяжести были беловато-молочные, при концентрации 0,1 мг/л и 0,5 мг/л – светло-желтые, при концентрации 2,5 мг/л – темно-желтые, а при концентрации 10,0 мг/л, 20,0 мг/л, 30,0 мг/л, 40,0 мг/л – светло-коричневые. На клубочках и тяжях мицелия, выросших в среде с $MnCl_2$ при концентрации 10,0 мг/л, 20,0 мг/л, 30,0 мг/л, 40,0 мг/л имелись темно-коричневые пятна, на поверхности клубочков *P. ostreatus*, которые росли в среде с $MnCl_2$ при концентрации 2,5 мг/л, также были обнаружены небольшие потемнения, однако в гораздо меньшем количестве, по сравнению с колбами с $MnCl_2$ при концентрации 10,0 мг/л, 20,0 мг/л, 30,0 мг/л, 40,0 мг/л.

По наблюдению за изменением цвета биомассы глубинной культуры, можно судить о том, что культура *S. hirsutum* более стабильна к повышению концентраций $MnCl_2$, темно-коричневые пятна при $MnCl_2$ – 40 мг/л, а у *P. ostreatus in vitro* при $MnCl_2$ – 2,5 мг/л.

Вывод. Таким образом, добавление в питательную среду $MnCl_2$ в исследуемых концентрациях 0,025 мг/л, 0,1 мг/л, 0,5 мг/л, 2,5 мг/л, 10,0 мг/л, 20,0 мг/л, 30,0 мг/л, 40,0 мг/л влияет на развитие глубинной культуры *S. hirsutum* и *P. ostreatus*. На этапе глубинного культивирования *S. hirsutum* обладает наиболее высоким и стабильным потенциалом к увеличению количества и размеров мицелиальных клубочков по сравнению с *P. ostreatus*. Увеличение клубочкообразования связано с правильно подобранной питательной средой на основе КСС для глубинного культивирования *S. hirsutum* и *P. ostreatus* и обогащение питательной среды $MnCl_2$.

Список литературы / References

1. Гапиевко О.С., Кобзарь Н.Н. Научно-практические рекомендации по сохранению и использованию грибных ресурсов Гродненской области. Минск, 1998. 30 с.
2. Гримашевич В.В. Ресурсы основных видов лесных ягодных растений и съедобных грибов Беларуси // Природные ресурсы: межведомственный бюллетень, 2005. № 3. С. 85–95.
3. Малый Л.П. Запасы съестных грибов в Беларуси и возможности их эффективного использования // Растительные ресурсы, 1987. Т. 23. № 4. С. 532–536.
4. Захарич Ф.Ф. под ред. Дорожкина Н.А. Пищевые грибы Беларуси. Минск: Гос. изд-во БССР. Ред. науч.-техн. лит., 1950. 84 с.

5. *Wasser S.P.* Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides // *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 2002. Nov. 60 (3). P. 258–274.
6. *Zaidman B.Z., Yassin M., Mahajna J., Wasser S.P.* Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics // *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 2005. Jun; Nov. 67 (4). P. 453–468.
7. *Бабицкая В.Г., Пучкова Т.А., Щерба В.В., Осадчая О.В.* Ксилотрофный базидиомицет *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. – продуцент биологически активных веществ // *Вестник Фонда фундаментальных исследований (Минск)*, 2005. № 4 (34). С. 40–49.
8. *Shlyakhovenko V., Kosak V., Olishovsky S.* Application of DNA from mushroom *Pleurotus ostreatus* for cancer biotherapy: a pilot Study // *Experimental oncology*, 2006. Vol. 28. № 2. P. 132–135.
9. *Калько Е.И.* под ред. Вальцева С.В. и др. Тестирование антиоксидантной активности культуральной жидкости *Pleurotus ostreatus*, с использованием липосомной модели // *Научные исследования: ключевые проблемы III тысячелетия: материалы XX Международной научно-практической конференции*, Москва, 25 октября 2017 г. / *Научно-практический журнал «Научные исследования»*. Москва, 2017. № 9 (20). С. 5–9.
10. *Borchers A.T., Stern J.S., Hackman R.M., Keen C.L., Gershwin M.E.* Mushrooms, tumors, and immunity // *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1999. Vol. 221. № 4. P. 281–293.
11. *Deepalakshmi K., Mirunalini S.* Toxicological assessment of *Pleurotus ostreatus* in Sprague Dawley rats // *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, 2014. Vol. 4. Issue 3. P. 139–145.
12. *Qin H. et al.* Cell factories of higher fungi for useful metabolite production // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol*, 2016. Vol. 155. P. 199–235.
13. *Yun B. S. et al.* Sterins A and B new antioxidative compounds from *Stereum hirsutum* // *J. Antibiot*, 2002. Vol. 55. P. 208–210.
14. *Бабицкая В.Г., Пучкова Т.А., Щерба В.В., Осадчая О.В.* Ксилотрофный базидиомицет *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. – продуцент биологически активных веществ // *Вестник Фонда фундаментальных исследований (Минск)*, 2005. № 4(34). С. 40–49.
15. *Бисько Н.А., Бухало А.С., Вассер С.П. и др.* под ред. Дудки И.А. Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубинной культуре. Киев: Наукова думка, 1983. 312 с.
16. *Бухало А.С.* Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. Киев: Наукова думка, 1988. 144 с.
17. *Калько Е.И.* Экология и грибная биотехнология / *Ecology and fungal biotechnology // International scientific review of problems and prospects of modern Science and education : XLII International scientific and practical conference : collection of scientific articles*, Boston, USA, 25-26 February 2018. Boston: Massachusetts printed in the United States of America, 2018. Vol. 2 (44). P. 16–22.
18. *Sziucs J.* Method of growing mushroom mycelium and the resulting products. Patent US2850841. Patented Sept. 9, 1958. Application April 19, 1948.
19. *Бисько И.А., Дудка И.А.* Биология и культивирование съедобных грибов рода вешенка: монография. Киев: Наукова думка, 1987. 148 с.
20. *Steinberg R.A.* Relation of accessory substance and amine requirements to the carbon nutrition of *Aspergillus niger* // *Proc. Third. Int. Congr. Microbiol.* 1939. 491 p.
21. *Жук О.Н., Бокова О.А., Сакович В.В., Никандров В.В.* Особенности роста и развития культуры гриба вешенка обыкновенная (*Pleurotus ostreatus*) в присутствии ионов марганца (II) // *Вестник Палесскага дзяржаўнага ўніверсітэта. Серыя прыродазнаўчых навук*. 2017 № 2. С. 43-50.
22. *Жук О.Н., Ильючик И.А., Кругавеня А.Д., Никандров В.В.* Влияние хлорида марганца (II) на протеолитическую активность гриба вешенка обыкновенная (*Pleurotus ostreatus*) при глубинном культивировании // *Вестник Палесскага дзяржаўнага ўніверсітэта. Серыя прыродазнаўчых навук*, 2017. № 2. С. 62–68.
23. *Калько Е.И.* Особенности роста *Stereum hirsutum in vitro* при обогащении среды марганцем / *The growth characteristics of Stereum hirsutum in vitro enrichment of the medium with manganese // International scientific review of the problems of natural sciences and medicine: I International scientific specialized conference: collection of scientific articles*, Boston, USA, 29-30 March, 2018. Boston: Massachusetts printed in the United States of America, 2018. Vol. 3. P. 12–14.
24. *Беккер З.Э.* Физиология и биохимия грибов: монография. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1988. 230 с.
25. *Чугай А.С., Гришан Е.С., Коломацкая Н.С.;* науч. руков. Е.О. Юрченко. Апробация питательных сред на основе корнеплодов для глубинного культивирования вешенки обыкновенной // *Научный потенциал молодежи – будущему Беларуси: материалы X международной молодежной научно-практической конференции*, УО «Полесский государственный университет». г. Пинск, 15 апреля 2016 г. Ч. 1. / *Министерство образования Республики Беларусь [и др.]; редкол.: К.К. Шебеко [и др.]*, Пинск: ПолесГУ, 2016. С. 520–522.
26. *Калько Е.И., Жук О.Н.* Сравнительная характеристика выращивания *Stereum hirsutum* и *Pleurotus ostreatus in vitro* // *Биотехнология: достижения и перспективы развития: материалы II международной научно-практической конференции*, УО «Полесский государственный университет»

г. Пинск, 7-8 декабря 2017 г. / Министерство образования Республики Беларусь [и др.]; редкол.: К.К. Шебеко [и др.], Пинск: ПолесГУ, 2017. С. 15–16.

27. Калько Е.И. Влияние питательных сред и условий глубинного культивирования на эффективность выращивания стереума жестковолосистого (*Stereum hirsutum*) // Научные исследования: ключевые проблемы III тысячелетия: материалы XXIV международной научно-практической конференции, Москва, 1-2 апреля, 2018 года. / Научно-практический журнал «Научные исследования». Москва, 2018. № 4 (24). С. 12–15.