

**EFFICIENCY SEPARATION IN THE CULTURE OF *STEREUM HIRSUTUM* –
PRODUCER OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES**
Kalko E.I. (Republic of Belarus) Email: Kalko51@scientifictext.ru

*Kalko Elena Ivanovna – Postgraduate Student,
BIOTECHNOLOGICAL FACULTY,
POLESSKY STATE UNIVERSITY, PINSK, REPUBLIC OF BELARUS*

Abstract: conservation of Basidiomycetes ex situ in culture collections is considered as a promising way of fungal preservation. The number of known fungal species in the world is increasing continuously as well as the number of fungal cultures maintaining in culture collections. Mushrooms *Stereum hirsutum* contain bioactive connections showing antioxidant action, antiviral and immunomodulating activities. Work on the allocation perspective in the medical purposes in culture of the species of mushrooms *Stereum hirsutum* and their preservation in the collection of cultures is started.

Keywords: basidiomycetes, medicinal mushrooms, fruit bodies, vitrification of fung, collection of cultures.

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВЫДЕЛЕНИЯ В КУЛЬТУРУ *STEREUM HIRSUTUM* –
ПРОДУЦЕНТА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ**
Калько Е.И. (Республика Беларусь)

*Калько Елена Ивановна – аспирант,
кафедра биотехнологии,
Полесский государственный университет, г. Пинск, Республика Беларусь*

Аннотация: перспективным способом сохранения грибов считается сохранение Basidiomycetes ex situ в коллекции культур. Количество известных видов грибов в мире постоянно растет, соответственно и количество культур грибов, сохраняемых в коллекциях культур. Грибы *Stereum hirsutum* содержат биологически активные соединения, проявляющие антиоксидантное действие, антивирусную и иммуномодулирующую активность. Проводится работа по выделению перспективных в лечебных целях видов грибов *Stereum hirsutum* в культуру и сохранению их в коллекции культур.

Ключевые слова: базидиальные грибы, лекарственные грибы, плодовые тела, витрификация грибов, коллекция культур.

УДК 60:582.284

Природные антиоксиданты являются интересным объектом исследования из-за их потенциальных терапевтических и пищевых эффектов. Постоянно возрастающий интерес к поиску естественной замены синтетических антиоксидантов приводит к необходимости оценки антиоксидантной активности высших грибов. Базидиомицеты содержат различные компоненты, многие из которых обладают антиоксидантной активностью [1-3]. По литературным данным одним из наиболее перспективных грибов рода *Stereum*, обладающим данным характером воздействия, является *Stereum hirsutum* [4, 5]. Благодаря присутствию широкой гаммы биологически активных соединений, гриб *S. hirsutum* может быть использован в качестве сырья для целенаправленного создания препаратов фармацевтического, косметического, пищевого и другого целевого назначения [6-8]. Изучение антиоксидантной активности *S. hirsutum* является важной научной и практической задачей. Это послужило предпосылкой для введения *S. hirsutum* в чистую культуру с дальнейшей разработкой технологий культивирования и применения для развития грибной промышленности Республики Беларусь.

В настоящее время стоит задача получения штамма *S. hirsutum* – продуцента биологически активных веществ, для более широкого его применения в составе лечебно-профилактических препаратов целевого назначения с антиоксидантными свойствами, которые являются востребованными как на территории Беларуси, так и в других регионах мира [4-6].

Таким образом, практическая необходимость исследований продиктована острой потребностью в создании лечебно-профилактических препаратов и новых видов кормовых добавок для животноводства на основе местного сырья с повышенной биологической активностью, что одновременно позволит исключить или значительно снизить использование синтетических антиоксидантов.

Чистая культура – важнейший источник для морфологических, физиологических, биохимических и генетических исследований, которые являются основой для развития фундаментальной и прикладной науки.

Одним из первостепенных приемов, предваряющих любые лабораторные исследования, связанные с микроорганизмами, является выделение и поддержание чистых культур, что подразумевает выделение в чистую мицелиальную культуру, создание и сохранение коллекции. Выращивание микроорганизмов в

чистой культуре гарантирует, что биомасса будет содержать ДНК только данной культуры. Для получения коллекции стволовых маточных культур необходимо выделить чистые мицелиальные культуры базидиомицетов из плодовых тел [9, 10]. Все вышеизложенное и определило актуальность нашей работы.

Целью настоящей работы явилось получение штамма *S. hirsutum*. (стереум жестковолосистый) – продуцента биологически активных веществ. В дальнейшем полученные штаммы применяются как объекты для научно-исследовательской работы.

Исследования выполнены в научно-исследовательской лаборатории прикладной и фундаментальной биотехнологии на базе УО «Полесский государственный университет». Для исследований был выбран гриб *S. hirsutum* (стереум жестковолосистый). 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 [9].

Для транспортировки и предотвращения загрязнения плодовые тела *S. hirsutum* поместили в одноразовые пластиковые контейнеры. Для исследования взяли наиболее молодые неповрежденные плодовые тела, так как старые подвержены загрязнению бактериями и плесневелыми грибами (из плодовых тел с явными признаками разложения не удается получить культуру). Для того, чтобы в дальнейшем анализировать связи морфологических признаков с молекулярно-генетическими и культуральными признаками, выделенный в культуру образец дублировали в гербарий образцом засушенных плодовых тел, культуре и гербарному образцу присваивали единый инвентаризационный номер.

Базидиальные грибы быстро плесневеют, поэтому *S. hirsutum* слегка подсушили и поместили в холодильник с температурным режимом $4\pm 1^\circ\text{C}$ и хранили там до получения инокулюма. Если, невзирая на тщательную промывку инокулюма, при нескольких повторных выделениях наблюдается стойкое бактериальное загрязнение, то для устранения значительной части бактериальной инфекции требуется умеренное подсушивание *S. hirsutum* в холодильнике при температуре $4\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 7–10 дней. Перед выделением в культуру *in vitro* гриб необходимо выдержать при температуре $19\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 12 часов (в ходе четырехкратного эксперимента плодовые тела, извлеченные из холодильника непосредственно перед введением в культуру, роста не давали).

Перед выделением чистой мицелиальной культуры плодовое тело обтирали 70° этиловым спиртом, затем клали на фильтровальную бумагу, разламывали и из середины стерильным скальпелем отрезали фрагменты плодового тела размером 0,5–1 мм, содержащие среднюю часть или среднюю и гимениальную часть для уменьшения посторонних микробиологических загрязнений. Фрагменты складывали на дно металлического сита, переворачивали и омывали с разных сторон под сильной струей водопроводной воды в течение 3–5 мин, далее промывали дистиллированной водой, затем укладывали фрагменты в стерильную чашку Петри.

По литературным данным высшие базидиомицеты в культуре предпочитают дисахариды (сахароза, мальтоза, лактоза) и крахмал другим источникам углеводов [9, 10], поэтому в качестве питательной среды была выбрана картофельно-сахарозная среда, которая является хорошим доступным субстратом для выращивания *S. hirsutum in vitro* [11, 12].

Выделение гриба в культуру *in vitro* проводили в ламинарном боксе, в стерильных условиях, на чашках Петри с полноценной питательной средой, содержащей агар-агар. Для приготовления среды очищенные, нарезанные клубни картофеля отварили до готовности, отвар отфильтровали, объем фильтрата доводили дистиллированной водой до 1л, добавляли сахарозу и агар-агар (100 г/л картофельного отвара, 10 г/л сахарозы, 1,5% агар-агара), pH 5,0–6,0. Для картофельно-сахарозной среды использовали: картофель сорта «Скарб», пищевая сахароза ГОСТ 21–94, дистиллированная вода. Среду нагревали до полного растворения агар-агара. Приготовленную среду по 200–300 мл разливали в стерильные колбы объемом 500 мл (колбы заполняли на 2/3 объема). Среду в колбах с ватно-марлевыми пробками стерилизовали в автоклаве 112°C (0,5 атм.), в течение 40 мин, для предотвращения засева среды инородными микроорганизмами. Значение pH среды влияет на стойкость и усвояемость ряда составляющих, для грибов pH лежит в пределах от 5 до 7. Величину pH среды перед автоклавированием доводили до 6,5–7, так как в дальнейшем она немного уменьшается в результате образования сахарозных кислот во время автоклавирования.

На каждый изолят готовили по 2 стерильные чашки Петри, со средой в количестве 12 мл. Чашка Петри № 2 служит для промежуточной пересадки гриба, в качестве посредника между чашкой Петри № 1 с кусочками плодовых тел и пробиркой для закладки изолята на хранение. Для предотвращения загрязненности инокулюма бактериями в питательную среду добавляли антибиотик тетрациклин из расчета 30 мкг на 1 мл среды (можно добавлять стрептомицин – 40 мкг на 1 мл среды). Так как антибиотики не термостойки, их следует наносить на охлажденную, но еще не начавшую застывать среду в чашке Петри. Дозатором со сменным наконечником добавляли антибиотик из сток-раствора нужной концентрации и размешивали круговыми движениями чашки Петри.

Каждый кусочек плодового тела накалывали одноразовой стерильной иглой и опускали в 3% раствор перекиси водорода, затем осторожно, стерильным пинцетом переносили инокулом на поверхность плотной питательной среды в чашке Петри №1, в центр. Чашки Петри заклеили пленкой (это предохраняет кусочек плодового тела от высыхания), далее помещали в термостат, и выдерживали в течении 14 дней, в темноте, при температуре $25\pm 1^\circ\text{C}$, до появления молодого коврика мицелия вокруг инокулюма, $d \geq 1\text{ см}$, в процессе роста проводили микробиологический контроль.

Через 14 дней на дне чашки Петри №1 маркером поместили место ближе к краевой зоне, из которого пересадили на новую питательную среду (на чашку Петри №2) агаровый блок размером 2–5 мм с участком мицелиального коврика. Важно, чтобы при пересадке молодого мицелия *S. hirsutum* гифы проникли в агар-агар и закрепились в нем. На чашках Петри №2 с пересевом записывали дату инокуляции, штамм. Культивирование длилось в термостате при температуре $25\pm 1^\circ\text{C}$, в темноте, в течение 14 дней.

Морфологические особенности мицелия *S. hirsutum* анализировали с помощью микроскопа *Olympus CX41*. В капле дистиллированной воды готовили микроскопический препарат мицелия, вырезанного стерильным скальпелем, чтобы убедиться, что растет целевой объект. Мицелий *S. hirsutum in vitro* имел характерные для него морфологические особенности: редкие пряжки, расположенные в мутовках, и коричневатую-желтоватую пигментацию мицелия. Диагностические признаки мицелия *S. hirsutum in vitro*: широкие гифы с редкими пряжками в мутовках по 2–3; гифы среднего диаметра с редкими одиночными пряжками; слаборазветвленные тонкие гифы (рисунок 1).

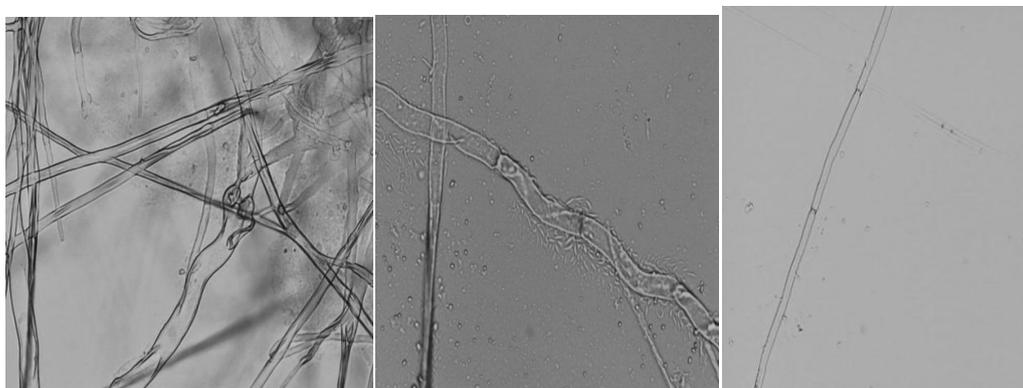


Рис. 1. Морфологические особенности мицелия *S. hirsutum in vitro*

В результате исследований удалось выделить в чистую мицелиальную культуру *S. hirsutum*.

Для получения ствольных маточных культур через 14 дней готовили плотную питательную среду (100 г/л картофельного отвара, 10 г/л сахарозы, 1,2% агар-агара) и разливали в стерильные стеклянные пробирки (20x200 мл) по 15 мл, закрывали пробирки ватно-марлевыми пробками и стерилизовали в автоклаве 112°C (0,5 атм.) в течение 40 мин. После этого пробирки с расплавленной средой доставали из автоклава и укладывали в наклонном положении с таким расчетом, чтобы среда не заходила за 2/3 объема пробирки, иначе произойдет смачивание пробки, что недопустимо. После застывания среды пробирки ставили вертикально и давали стечь конденсату. Соблюдая условия стерильности из чашек Петри № 2, ближе к краевой зоне, брали инокулом в виде фрагментов ковра мицелия площадью 1 см^2 , вырезаемый вместе с тонким слоем среды около 1 мм толщиной и пересевали в пробирку с питательной средой. Края пробирки и пробки проводили через пламя горелки для стерилизации, и пробирку с культурой закрывали пробкой. Пересейные культуры поместили в термостат при температуре $25\pm 1^\circ\text{C}$ на 14 дней (поверхность косяка покроеется мицелием). На пробирке с пересевом отметили: вид гриба, тип изолята (из плодового тела), номер соответствующего гербарного образца, место сбора, растение-хозяин, автор выделения, год выделения, дату инокуляции [13, с. 230].

Основные принципы хранения, предотвращающие мутации штамма при хранении культур: оптимизация питательных сред, используемых для хранения; использование обедненных питательных сред; сокращение частоты пассажей; соблюдение условий хранения, максимально замедляющих процессы роста и метаболизма; использование питательных сред одного состава при каждом очередном пассаже культуры; многолинейность хранения. Влажность культуры должна быть такова, чтобы в течение года не делать пересевов из-за ее пересыхания. Одним из важных параметров хранения является его длительность, чем реже коллекция пересевается, тем меньше создается возможностей для мутации исходной культуры. Количество единиц каждого хранения одного штамма должно хватать минимум на год, чаще пересевать культуру не рекомендуется, чем реже происходит пересев коллекции, тем меньше клеточных делений претерпевает культура и тем ближе она по своим свойствам к исходному изоляту.

Поэтому, чтобы избежать частых пересевов, количество единиц хранения должно быть таким, чтобы не пришлось делать дополнительных пассажей в течение срока, на который культура заложена на хранение.

Наиболее доступным методом хранения чистых культур является метод вегетативных пассажей. Чистые культуры хранятся в пробирках на агаризованных питательных средах. Для поддержания культур и сохранения коллекции в лаборатории проводят пересев мицелия на свежие питательные среды. Благодаря проведению периодических пересевов культура постоянно находится в работе, при этом контролируется чистота культуры. Температура $4\pm 1^\circ\text{C}$ является оптимальной для хранения культур между пересевами.

Возможен и другой способ хранения чистой культуры *S. hirsutum*, для этого применяется среда с большим содержанием воды, в состав среды входит 1,5% разведенное сусло и 1,2% агар-агар. В пробирку переносится агаровый блок, и пробирки с косяками помещаются в термостат при температуре 26°C , культивирование продолжается до той стадии, пока вся поверхность косяка не покроется мицелием. Затем пробирки в вертикальном положении заливают до верхнего края косяка вазелиновым маслом (вазелиновое масло автоклавируют 45 мин. при 1,05 атм.) и помещают в штатив для дальнейшего хранения. Каждый образец коллекции изолятов маркируется этикеткой: вид гриба, тип изолята (из плодового тела, моноспоровый, полиспоровый), номер соответствующего гербарного образца, место сбора, растение-хозяин, автор выделения, год выделения, дата заливки косяка маслом. Хранится в штативе, в вертикальном положении в холодильнике при температуре $4\pm 1^\circ\text{C}$. Необходимо субкультивировать каждые 3 года, допускается увеличение срока до 5 лет [14, с. 418].

Приводим сведения о хранении чистых культур грибов в жидком азоте. Перед закладкой на хранение мицелий выдерживают при температуре $5\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 1–7 суток. Затем в одно- или двухмиллиметровые стеклянные ампулы кладут по 6–8 зерен, обросших мицелием, и добавляют защитную суспензионную среду – 0,5 мл диметилсульфоксида глицерина. Перед замораживанием ампулы с мицелием выдерживают при температуре $19\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 60 мин. Замораживание проводят медленно, по технологии, обеспечивающей контроль за процессом охлаждения. Хранят замороженные культуры в рефрижераторе с жидким азотом при температуре от -160°C до -196°C . Для восстановления замороженного мицелия ампулы держат на водяной бане при температуре 38°C до полного исчезновения следов льда. Перед тиражированием данный мицелий необходимо проверить на жизнеспособность и силу роста. Данный метод позволяет сохранить штаммы длительное время без существенных изменений его генотипа [14, с. 420]. Однако метод требует наличия специального оборудования и экономически выгоден только при хранении больших объемов материалов.

Метод вегетативных пассажей является наиболее приемлемым, доступным и экономически выгодным для хранения коллекции *S. hirsutum*. Полученные штаммы будут использованы в дальнейшем для исследований антиоксидантных свойств *S. hirsutum in vitro*.

Автор выражает благодарность научному руководителю доценту кафедры биотехнологии *Е.О. Юрченко* за помощь в предоставлении материала для настоящих исследований.

Список литературы / References

1. *Вассер С.П.* Наука о лекарственных шляпочных грибах: современные перспективы, достижения, доказательства и вызовы // Биосфера, 2015. Т. 7. № 2. С. 238–248.
2. Биологические особенности лекарственных макромицетов в культуре: сб. науч. тр.: в 2 т. Т 1 // под ред. чл. кор. НАН Украины С.П. Вассер. Киев, 2011. 212 с.
3. Биологические особенности лекарственных макромицетов в культуре: сб. науч. тр.: в 2 т. Т 2 // под ред. чл. кор. НАН Украины С.П. Вассер. Киев, 2012. 459 с.
4. *Lee J. et al.* The antioxidant properties of solid-culture extracts of basidiomycetous fungi // J. Gen. Appl. Microbiol, 2013. Vol. 59. № 4. P. 279–285.
5. *Yun B.S. et al.* Sterins A and B new antioxidative compounds from *Stereum hirsutum* // J. Antibiot, 2002. Vol. 55. P. 208–210.
6. *Qin H. et al.* Cell factories of higher fungi for useful metabolite production // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol, 2016. Vol. 155. P. 199–235.
7. *Ma K. et al.* New benzoate derivatives and hirsutane type sesquiterpenoids with antimicrobial activity and cytotoxicity from the solid-state fermented rice by the medicinal mushroom *Stereum hirsutum* // Food Chemistry, 2014. Vol. 143. P. 239–245.
8. *Vi M. et al.* Natural bioactive sterol 5a,8a-endoperoxides as drug lead compounds // Med. Chem, 2014. Vol. 4. P. 709–716.
9. *Бухало А.С.* Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. Киев: Наукова думка, 1988. 144 с.
10. *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.

11. *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 Amerika, 2018. Vol. 2 (44). P. 16–22.
12. *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.
13. *Дудка И.А., Вассер С.П. Бухало А.С. и др., под ред. Дудки И.А.* Промышленное культивирование съедобных грибов. Киев: Наукова думка, 1978. 264 с.
14. *Дудка И.А., Вассер С.П.* Грибы. Справочник миколога и грибника. Киев: Наукова думка, 1987. 536 с.