

THE INFLUENCE OF MANGANESE (II) CHLORIDE ON THE GROWTH AND DEVELOPMENT OF SURFACE CULTURE *STEREUM HIRSUTUM*

Kalko E.I. (Republic of Belarus) Email: Kalko52@scientifictext.ru

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

Abstract: in this paper, it is shown that the addition of manganese (II) chloride in concentrations of 0.025 mg/l, 0.1 mg/l, 0.5 mg/l, 2.5 mg/l, 10.0 mg/l, 20.0 mg/l, 30.0 mg/l, 40.0 mg/l affects the growth and development of this surface culture *S. hirsutum* in a nutrient medium. A significant increase in the mycelium compared to the control was received for the surface culture *S. hirsutum* at a concentration of 0.1 mg /l (18,4%). Determination of the nature of the dependence of the influence of manganese (II) chloride on the *S. hirsutum* in vitro on the totality of other factors seems very interesting and promising for the further development of biotechnology.

Keywords: basidiomycetes, surface cultivation, manganese (II) chloride.

ВЛИЯНИЕ ХЛОРИДА МАРГАНЦА (II) НА РОСТ И РАЗВИТИЕ ПОВЕРХНОСТНОЙ КУЛЬТУРЫ *STEREUM HIRSUTUM*

Калько Е.И. (Республика Беларусь)

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

Аннотация: в данной работе показано, что добавление в питательную среду хлорида марганца (II) 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 влияет на рост и развитие поверхностной культуры *S. hirsutum*. Значительный прирост мицелия, по сравнению с контролем, получен для поверхностной культуры *S. hirsutum* при концентрации 0,1 мг/л (18,4 %). Выяснение характера зависимости влияния хлорида марганца (II) на *S. hirsutum* in vitro от совокупности других факторов представляется весьма интересным и перспективным для дальнейшего развития биотехнологии.

Ключевые слова: базидиомицеты, поверхностное культивирование, хлорид марганца (II).

УДК 60:582.284.3

В настоящее время вопрос о возможности искусственного выращивания высших лечебных грибов становится все более актуальным. Исследования, проводимые в данной области, свидетельствуют, что многие виды базидиомицетов являются перспективными продуцентами биологически активных веществ [1-12].

Способ выращивания грибов в условиях естественного произрастания требует определенных условий и является продолжительным по времени. Альтернативой, позволяющей решить проблемы выращивания базидиальных грибов для получения качественного и безопасного сырья для фармакологической промышленности, являются биотехнологические приемы культивирования *ex situ* [13, 14].

Среди множества групп базидиомицетов грибов-ксилотрофов наиболее перспективными для культивирования считаются дереворазрушающие грибы, которые характеризуются быстрым накоплением биомассы и не требуют сложных и дорогостоящих питательных сред. Одним из представителей этой группы грибов является лигнотрофный сапрофит *S. hirsutum* (стереум жестковолосистый) [15], глубинная биомасса и плодовые тела которого обладают лечебными свойствами [1-10]. Сбор плодовых тел гриба *S. hirsutum* в природе лимитируется несколькими факторами: непродолжительный период развития для мясистых плодовых тел, редкая встречаемость или малочисленность гриба в природе, и урон, который может быть нанесен экосистеме процедурой изъятия плодовых тел [16]. С этой точки зрения, биотехнологическое производство удобно благодаря круглогодичности и ресурсосберегающему отношению к окружающей среде. Для биотехнологических приемов культивирования *ex situ* основой для экстракции может являться мицелий, получаемый в чистой культуре, при этом возникает необходимость изучить особенности роста и развития поверхностной культуры *S. hirsutum*.

Для успешного проведения поверхностного культивирования необходимо применение строго сбалансированных условий [17], в нашей работе стимулятором роста выступит соль (хлорид марганца (II)).

Цель данной работы – изучение влияния хлорида марганца (II) на рост и развитие поверхностной культуры *Stereum hirsutum*.

Материалы и методы. Объектом настоящего исследования являлся штамм базидиального гриба *S. hirsutum*, чистая культура которого была выделена из плодовых тел [18, с. 36]. Для изучения особенностей роста и развития культуры гриба *S. hirsutum* в присутствии хлорида марганца (II) проводили культивирование в поверхностных условиях [19, с. 119]. Поверхностное культивирование осуществляли на агаризованной картофельно-сахарозной среде в чашке Петри при температуре $25 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 14 суток. Для приготовления среды использовали: картофель сорта «Скарб», пищевая сахароза ГОСТ 21–94, дистиллированная вода (100 г/л картофельного отвара, 10 г/л сахарозы, 1,5% агар-агара), pH 5,0–6,0. В качестве посевного материала для поверхностного культивирования использовали агаровые блоки воздушного мицелия, вырезанные из краевой зоны роста культуры, выращенной на чашке Петри в течение 14 суток. Среду предварительно стерилизовали в автоклаве в течение 40 мин при 112°C (0,5 атм.). В питательную среду (кроме контроля) дополнительно вносили раствор хлорида марганца (II) до конечной концентрации 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.

Рост и развитие мицелия ежедневно оценивали органолептически, на 7-е и 14-е сутки исследовали морфологию. Морфологические особенности мицелия *S. hirsutum* анализировали с помощью микроскопа Olympus CX41.

Измеряли диаметр колонии, высоту и плотность колонии и высчитывали ростовой коэффициент (РК) по формуле (1) [20, с. 203].

$$PK = d \times h \times g \div t \quad (1)$$

d – диаметр колонии, мм; h – высота колонии, мм; g – плотность колонии, балл; t – возраст колонии, сутки.

Полученные результаты обработали статистически в программах «Statistika 6», «Excel 2010».

Результаты и методы исследования. Влияние хлорида марганца (II) на рост и развитие культуры *S. hirsutum* при поверхностном культивировании. На плотной питательной среде уже на 7-е сутки культивирования мицелий *S. hirsutum* имел характерные признаки – бело-желтоватая, войлочная колония, реверзум не изменен, поверхность колонии зональная. По характеру развития воздушного мицелия форма колонии неравномерная с увеличением от центра, центральная часть колонии кратерообразная, зона роста концентрическая. Цвет колонии в контроле в динамике роста не изменялся, экссудата не отмечено. Культуре *S. hirsutum* был присущ специфический запах, близкий к запаху препаратов пенициллина.

При внесении в питательную среду хлорида марганца (II) к 14-м суткам культивирования в питательной среде, содержащей 10,0 мг/л, 20,0 мг/л, 30,0 мг/л, 40,0 мг/л соли, отмечено потемнение реверзума, при этом, чем выше концентрация, тем ярче выражено потемнение. Остальные морфологические характеристики колоний остались неизменными.

Для изучения линейного роста диаметр колонии измеряли в двух взаимно перпендикулярных направлениях на 7, 14 сутки культивирования [20, с. 203]. В таблице 1 представлены полученные результаты линейного роста колонии *S. hirsutum* при поверхностном культивировании с обогащением питательной среды MnCl_2 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 и 40,0 мг/л.

Таблица 1. Линейный рост колонии *S. hirsutum* при поверхностном культивировании на агаризованной среде в зависимости от концентрации хлорида марганца (II), культивирование 14 сут.

Концентрация MnCl_2 в среде, мг/л	Радиус колонии, мм	
	7-сутки	14-сутки
0(контроль)	21,50±0,74	40,38±0,13
0,025	22,10±0,12	42,25±0,32
0,1	22,65±0,16	42,65±0,16
0,5	21,60±0,22	41,33±0,27
2,5	20,90±0,17	40,83±0,12
10,0	20,00±0,46	39,70±0,12
20,0	19,50±0,16	38,87±0,18
30,0	18,48±0,21	37,40±0,17
40,0	18,08±0,15	36,90±0,14

Вычисляли скорость линейного роста мицелиальных колоний, выраженную в виде дроби, где числитель – это диаметр колонии, а знаменатель – возраст измеряемой колонии в сутках [20, с. 203]. В таблице 2 представлены полученные результаты скорости линейного роста колонии *S. hirsutum* при поверхностном культивировании с обогащением питательной среды MnCl_2 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.

Таблица 2. Скорость линейного роста колонии *S. hirsutum* при поверхностном культивировании на агаризованной среде в зависимости от концентрации хлорида марганца (II), культивирование 14 сут.

Концентрация MnCl ₂ в среде, мг/л	Скорость линейного роста, мм/сут	
	7-сутки	14-сутки
0(контроль)	6,14± 0,21	5,77± 0,02
0,025	6,32±0,03	6,03±0,05
0,1	6,47±0,04	6,09±0,02
0,5	6,17±0,06	5,91±0,04
2,5	5,97±0,05	5,84±0,02
10,0	5,72±0,13	5,67±0,02
20,0	5,47±0,04	5,55±0,02
30,0	5,34±0,08	5,36±0,03
40,0	5,16±0,04	5,27±0,02

Одной из важнейших, наиболее стабильных характеристик вида в культуре, является скорость роста на агаризованной среде [20, с. 203]. Добавление в питательную среду хлорида марганца (II) в концентрациях 0,025 мг/л, 0,1 мг/л, 0,5 мг/л, 2,5 мг/л стимулировало рост культуры на 8,9%, 18,4%, 5,7%, 3,6% соответственно, а в концентрациях 10,0 мг/л, 20,0 мг/л, 30,0 мг/л, 40,0 мг/л угнетало рост культуры на 2,4%, 6%, 12,7%, 18,8% соответственно, по сравнению с контролем (таблица 3).

Таблица 3. Прирост мицелия поверхностной культуры *S. hirsutum* в зависимости от концентрации хлорида марганца (II), 14 сут.

Концентрация MnCl ₂ в среде, мг/л	Ростовой коэффициент <i>S. hirsutum in vitro</i> , 14-е сутки
0(контроль)	54,05± 0,75*
0,025	58,85±0,83
0,1	63,98±0,23
0,5	57,11±0,34
2,5	55,99±0,16
10,0	52,75±1,03
20,0	50,81±0,29
30,0	47,19±0,74
40,0	43,89±1,65

Однофакторный дисперсионный анализ полученных данных показал, что действие варьирующего фактора (концентрация MnCl₂) оказывает статистически значимое влияние на скорость роста колонии *S. hirsutum* при поверхностном культивировании, так как t-критерий Стьюдента ($t = 7,808475$) больше t-критического (2,12), $P < 0,05$. $F = 6,146976$.

Вывод. При поверхностном культивировании культуры *S. hirsutum* добавление хлорида марганца (II) влияет лишь на изменение цвета колоний в концентрациях 10,0 мг/л, 20,0 мг/л, 30,0 мг/л, 40,0 мг/л, но не изменяет другие морфологические признаки. Оптимальное значение концентрации хлорида марганца (II) в питательной среде для наибольшего прироста поверхностной культуры *S. hirsutum* составляет 0,1 мг/л. Влияние хлорида марганца (II) на рост и развитие мицелия гриба носит сложный характер и результат их воздействия на культуру *S. hirsutum* зависит от совокупности других факторов. Однако прояснение этого момента требует проведения дополнительных исследований.

Список литературы / References

1. Cell factories of higher fungi for useful metabolite production / H. Qin [et al.] // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 2016. Vol. 155. P. 199–235.
2. New benzoate derivatives and hirsutane type sesquiterpenoids with antimicrobial activity and cytotoxicity from the solid-state fermented rice by the medicinal mushroom *Stereum hirsutum* / K.L. Ma [et al.] // Food Chemistry, 2014. Vol. 143. P. 239–245.
3. Natural bioactive sterol 5a, 8a-endoperoxides as drug lead compounds / M. Bu [et al.] // Med. Chem., 2014. Vol. 4. P. 709–716.
4. The antioxidant properties of solid-culture extracts of basidiomycetous fungi / J. Lee J. [et al.] // J. Gen. Appl. Microbiol., 2013. Vol. 59. № 4. P. 279–285.

5. Sterins A and B new antioxidative compounds from *Stereum hirsutum* / B.S. Yun [et al.] // J. Antibiot., 2002. Vol. 55. P. 208–210.
6. Free-radical scavenging activity of submerged mycelium extracts from higher basidiomycetes mushrooms / M.D. Asatiani, V.I. Elisashvili, S.P. Wasser, A.Z. Reznick, E. Nevo // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2007. Vol. 71. № 12. P. 3090–3092.
7. Epicorazine C, an antimicrobial metabolite from *Stereum hirsutum* HKI 0195 / P. Kleinwächter, H.M. Dahse, U. Luhmann, B. Schlegel, K. Dornberger // J. Antibiot. Tokyo, 2001. Vol. 54. № 6. P. 521–525.
8. Rai M. Mycotechnology: present status and future prospects / Eds. M. Rai // New Delhi: I.K. International, 2007. 306 p.
9. Dubin G.-M. Acetylenic aromatic compounds from *Stereum hirsutum* / G.-M.Dubin, A. Fkyerat, R. Tabacchi // Phytochemistry, 2000. Vol. 53. Pp. 571–574.
10. Antibacterial and antitumor activity of crude methanolic extracts from various macrofungi species / B. Poyraz [et al.] // BIBAD, 2015. Vol. 8. № 1. P. 5–10.
11. Schwartz B. The use of edible mushroom water-soluble polysaccharides in the treatment and prevention of chronic diseases: a mechanistic approach. / B. Schwartz, Y. Hadar, D. Sliva. In: Fang E.F.; Ng, N.B. (ed.). Antitumor potential and other emerging medicinal properties of natural compounds. Dordrecht et al.: Springer, 2013. P. 263–283.
12. Zjawiony J.K. Biologically active compounds from Aphyllophorales (polypore) fungi / J.K. Zjawiony // J. Nat. Prod., 2004. Vol. 67. № 2. P. 300–310.
13. Petre M. (ed.) Mushroom biotechnology: Developmet and applications / M. Petre [et al.] // Amsterdam et al.: Elsevier, 2016. 222 p.
14. Popov A. Hypocholesterolic effect of some higher basidiomycetes / A. Popov [et al.]; In: Zaikov, G.E. (ed.) // Research progress in biotechnology. N.Y.: Nova Biomedical Books, 2008. P. 53–58.
15. Рипачек В. Биология дереворазрушающих грибов / В. Рипачек. М.: Лесная промышленность, 1967. 276 с.
16. Koune, J.-P. Threatened mushrooms in Europe [Nature and Environment Series. № 122] / J.-P. Koune. Council of Europe Publishing, 2001. 23 pp.
17. Особенности роста и развития культуры гриба вешенка обыкновенная (*Pleurotus ostreatus*) в присутствии ионов марганца (II) / О.Н. Жук, О.А. Бокова, В.В. Сакович, В.В. Никандров // Веснік Палескага дзяржаўнага ўніверсітэта. Серыя прыродазнаўчых навук, 2017. № 2. С. 43-50.
18. Бухало А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре / А.С. Бухало. Киев: Наукова думка, 1988. 144 с.
19. Дудка И.А. Методы экспериментальной микологии / И.А. Дудка. Киев: Изд.: Наук. думка, 1982. 550 с.
20. Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубинной культуре / Н.А. Бисько, А.С. Бухало, С.П. Вассер [и др.]. Под ред. И.А. Дудки. Киев: Наукова думка, 1983. 312 с.