

О.Н. ЖУК, канд. биол. наук,
доцент кафедры биотехнологии,
заведующий научно–исследовательской лабораторией
прикладной и фундаментальной биотехнологии¹

О.А. БОКОВА
студент¹

В.В. САКОВИЧ
аспирант

В.Н. НИКАНДРОВ, доктор биол. наук, профессор,
профессор кафедры биотехнологии¹
¹Полесский государственный университет,
г. Пинск, Республика Беларусь

Статья поступила 9 октября 2017г.

ОСОБЕННОСТИ РОСТА И РАЗВИТИЯ КУЛЬТУРЫ ГРИБА ВЕШЕНКА ОБЫКНОВЕННАЯ (*PLEUROTUS OSTREATUS*) В ПРИСУТСТВИИ ИОНОВ МАРГАНЦА (II)

Аннотация. *Современные биотехнологии требуют применения строго сбалансированных условий для максимального выхода конечных продуктов. Марганец является эссенциальным микроэлементом для живых организмов, его недостаток или избыточное поступление сопровождаются нарушением жизнедеятельности или даже гибелью организма. Потребность биосистем в этом микроэлементе имеет свои отличия, однако данные о влиянии марганца на рост и развитие грибов, и в частности *P. ostreatus*, в литературе отсутствуют. В данной работе показано, что питательная картофельно–сахарозная среда является хорошим доступным субстратом для выращивания *P. ostreatus* in vitro. Добавление в данную питательную среду хлорида марганца в концентрациях 0,025 мг/л, 0,1 мг/л, 0,5 мг/л, 2,5 мг/л, 10,0 мг/л влияет на рост и развитие данного гриба в зависимости от условий культивирования. Значительный прирост биомассы мицелия, по сравнению с контролем, получен для поверхностной культуры при концентрации 0,025 мг/л (19,8%), для глубинной без перемешивания – 0,5 мг/л (26%), для глубинной с перемешиванием – 10,0 мг/л (9%). Выяснение характера зависимости влияния марганца на биосистемы от совокупности других факторов представляется весьма интересным и перспективным для дальнейшего развития биотехнологии*

Введение. Вешенка обыкновенная (*Pleurotus ostreatus*) – съедобный гриб, который отличается быстрым ростом и высоким выходом плодовых тел, обладает хорошими пищевыми качествами, содержит большое количество сбалансированного по аминокислотному составу белка, богатые полиненасыщенными жирными кислотами липиды, свободные и связанные углеводы, практически весь комплекс витаминов группы В, эргостерин, витамин Е и аскорбиновую кислоту. *P. ostreatus* богат минеральными веществами, необходимыми для нормального функционирования организма человека [1, 7]. По объему производства плодовых тел этот гриб занимает третье место в мире. В настоящее время очень активно развивается биотехнология глубинного культивирования *P. ostreatus*, преимуществами которого являются технологическая простота и быстрота наращивания биомассы по сравнению с традиционным «сельскохозяйственным» циклом. При данном способе культивирования конечным продуктом являются богатые биологически активными веществами мицелий и культуральная жидкость [10], которые могут служить, например, в медицине и фармации как источник лекарственных субстанций [2, 3, 8], животноводстве (кормовые добавки), пищевой промышленности (использование сухого порошка мицелия в качестве приправ и усилителей грибного вкуса и аромата) и др. [7, 8]. Для развития промышленной микологии актуальным является поиск оптимального состава питательных сред, которые позволили бы обеспечить максимальный выход биомассы и максимальный синтез целевых метаболитов. Одним из важнейших микроэлементов для жизнедеятельности биосистем является марганец.

Марганец – эссенциальный элемент, который содержится во всех живых организмах и является компонентом целого ряда энзимов. Его недостаток или избыточное поступление могут нарушать обмен веществ, в результате чего может происходить нарушение жизнедеятельности или даже гибель организма. Функции марганецсодержащих соединений разнообразны.

Марганец входит в состав Mn–содержащей пероксидазы *P. ostreatus*, участвующей в расщеплении лигнина. Грибы способны накапливать ряд металлов, включая марганец [9]. Однако данные о влиянии марганца на рост и развитие грибов, и частности *P. ostreatus*, в литературе отсутствуют.

Целью работы являлось изучение влияния хлорида марганца на рост и развитие мицелия вешенки обыкновенной при различных видах культивирования.

Методика и объекты исследования. Работа выполнена на «диком» штамме *P. ostreatus*, выделенном сотрудником кафедры биотехнологии доцентом Е.О. Юрченко в 2014 г. из плодовых тел, растущих на культурном тополе (*Populus* sp.).

Гриб культивировали на картофельно–сахарозной среде, для приготовления которой использовали картофель сорта Скарб [6]. В питательную среду добавляли (кроме контроля) $MnCl_2$ в конечной концентрации 0,025, 0,1, 0,5, 2,5, 10 мг/л.

Измеряли диаметр, высоту и плотность колоний и высчитывали их ростовой коэффициент (РК) [4, с. 198, 202].

$$PK=(d \times h \times g)/t,$$

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

Морфологические особенности мицелия *P. ostreatus* анализировали с помощью микроскопа Olympus CX41.

Поверхностное культивирование. При посеве *P. ostreatus* на плотную питательную среду фрагменты ковра маточного мицелия площадью 1,0 см² помещали в центр чашки Петри и выращивали в течение 14 сут в темноте при постоянной температуре 26 ± 1 °С. Рост и развитие мицелия ежедневно оценивали органолептически, на 7–е и 14–е сут исследовали морфологию.

Глубинное культивирование. Посев инокулюма *P. ostreatus* осуществляли, помещая фрагменты ковра маточного мицелия площадью 1,0 см² в стерильную жидкую питательную среду. Анализировали морфологические особенности культур, количество и размеры клубков мицелия. Для определения урожайности (по сухой массе) мицелий высушивали при температуре 35–37 °С до полной потери гибкости склеившейся гифальной массы и взвешивали.

В экспериментах без перемешивания питательную среду разливали во флаконы объемом 190 мл по 100 мл. Культуру гриба выращивали в течение 10 дней в темноте при температуре 26 ± 1 °С.

В экспериментах при постоянном перемешивании культуры мицелий *P. ostreatus* культивировали в течение 14 дней в темноте в стеклянных колбах емкостью 500 мл, содержащих по 250 мл питательной среды, при 26 ± 1 °С на качалке модели WiseShakeSHO и режиме 70 об./мин.

Полученные результаты обрабатывали статистически с применением однофакторного дисперсионного анализа с помощью пакета анализа данных в MS Excel. Достоверность влияния фактора определяли по критерию Фишера. Силу влияния фактора оценивали методом Плохинского [5, с. 65].

Результаты и их обсуждение. Влияние ионов марганца на морфологические особенности культур. При всех использованных способах культивирования мицелий *P. ostreatus* имел характерные для него морфологические особенности: бесцветные, септированные гифы, при септах имелись многочисленные одиночные пряжки (рисунок 1). Добавление ионов марганца в питательную среду во всем диапазоне концентраций не оказало влияния на морфологию мицелия вешенки.

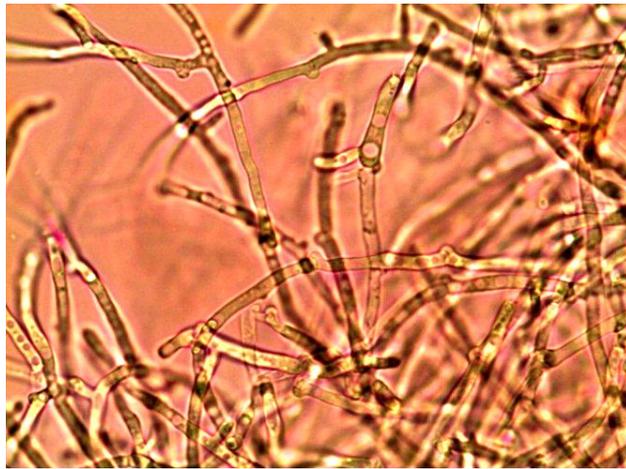


Рисунок 1 – Морфологические особенности мицелия *P. ostreatus*, об. × 40

Влияние ионов марганца на рост и развитие культуры *P. ostreatus* при поверхностном культивировании. На плотной питательной среде уже на седьмые сутки культивирования мицелий вешенки имел характерные признаки – белая шерстисто-ватная колония с приподнятым краем, бахромчатой внешней линией, реверзум не изменен, поверхность колонии – зональная (крупные зоны). Форма колонии по характеру развития воздушного мицелия – 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 был присущ ярко выраженный грибной аромат. При внесении в питательную среду хлорида марганца к 14-м суткам культивирования в питательной среде, содержащей 2,5 и 10,0 мг/л соли, отмечено потемнение реверзума, при этом чем выше концентрация, тем ярче выражено потемнение (рисунок 2). Остальные морфологические характеристики колоний остались неизменными.

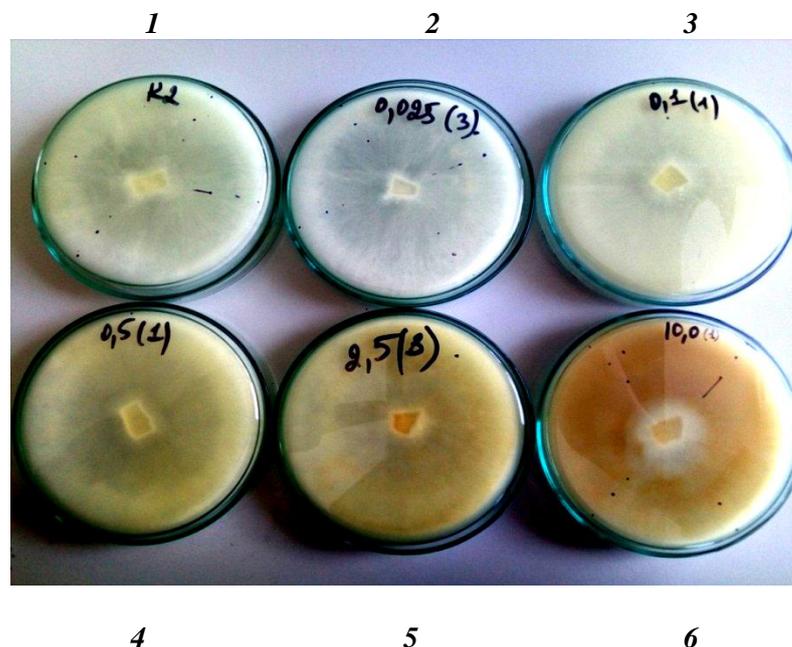


Рисунок 2 – Потемнение колоний вешенки обыкновенной при поверхностном культивировании. Реверзум, 14 сут.

1 – контроль, 2–6 – введение в питательную среду хлорида марганца (2 – 0,025 мг/л, 3 – 0,1 мг/л, 4 – 0,5 мг/л, 5 – 2,5 мг/л, 6 – 10 мг/л).

Добавление в питательную среду $MnCl_2$ в концентрациях 0,025 и 0,1 мг/л стимулировало рост мицелия на 19,8 и 8,5% соответственно, а в концентрациях 0,5, 2,5 и 10,0 мг/л слабо угнетало на 6,6, 4,7 и 3,8% соответственно (таблица 1).

Таблица 1 – Прирост мицелия *P. ostreatus* при поверхностном культивировании на плотной питательной среде в зависимости от концентрации хлорида марганца, 7 сут

Концентрация ионов марганца в среде, мг/л	Площадь зоны роста, мм ²
0 (контроль) (n = 3)	106,0 ± 4,4
0,025 (n = 3)	123,0 ± 1,3
0,1 (n = 3)	115,0 ± 8,2
0,5 (n = 3)	99,0 ± 1,4
2,5 (n = 3)	101,0 ± 1,0
10,0 (n = 3)	102,0 ± 0,7

Однофакторный дисперсионный анализ полученных данных позволил заключить, что действие варьирующего фактора (концентрация ионов марганца) оказывает статистически значимое влияние на прирост вешенки обыкновенной при поверхностном культивировании, так как F–критерий Фишера (F=7,2471) больше F–критического (F–квантиль=3,1059), $P < \alpha$ ($P=0,0024$; $\alpha=0,05$), при заданном уровне значимости $\alpha = 0,05$. Сила влияния данного фактора на прирост поверхностной культуры *P. ostreatus* находится в пределах от 0,61 до 1,0 ($h^2_x = 0,751$) и является сильной.

Влияние ионов марганца на рост и развитие глубинной культуры P. ostreatus. В варианте глубинного культивирования без перемешивания наблюдали формирование мицелия в виде медузоподобного образования в толще среды, а на поверхности среды и стенок сосудов – в виде поверхностного мицелия. Изменения цвета культуры и образования экссудата на поверхностном мицелии не происходило, следовательно, добавление хлорида марганца в исследуемых концентрациях не оказало влияния на морфологические особенности мицелия *P. ostreatus* при этом варианте глубинного культивирования.

Что касается урожайности данной культуры (нарастания биомассы мицелия) в зависимости от концентрации в питательной среде $MnCl_2$, то при концентрации соли 0,025, 0,1, 0,5 и 10,0 мг/л по сухой массе она превышала показатели контроля на 5,6, 26,1, 42,0 и 14,6% соответственно, а при концентрации соли 2,5 мг/л – снижалась на 7,8% в сравнении с контролем (таблица 2).

Таблица 2 – Прирост биомассы вешенки обыкновенной в глубинной культуре без перемешивания в зависимости от концентрации хлорида марганца в питательной среде, 10 сут

Концентрация ионов марганца, мг/л	Масса мицелия, г
0 (контроль) (n=3)	0,251 ± 0,015
0,025 (n=3)	0,265 ± 0,015
0,1 (n=3)	0,317 ± 0,030
0,5 (n=3)	0,357 ± 0,023
2,5 (n=3)	0,232 ± 0,006
10,0 (n=3)	0,288 ± 0,032

Применение однофакторного дисперсионного анализа полученных данных позволило установить, что действие варьирующего фактора (концентрация ионов марганца) на рост *P. ostreatus* в глубинной культуре без перемешивания является статистически значимым – F–критерий Фишера (F=4,3611) больше F–критического (F–квантиль=3,1059), $P < \alpha$ ($P=0,0170$; $\alpha=0,05$), при заданном уровне значимости $\alpha = 0,05$. Сила влияния данного фактора на рост мицелия в глубинной культуре без перемешивания находится в пределах от 0,61 до 1,0 ($h^2_x = 0,645$) и является сильной.

В глубинной культуре с перемешиванием во всех вариантах эксперимента наблюдали рост мицелия в виде клубочков, покрытых лучистыми выростами (рисунок 3).



Рисунок 3 – Рост мицелия *P. ostreatus* в виде клубочков при глубинном культивировании на качалке

Длина лучистых выростов во всех колбах, в присутствии ионов марганца, визуально больше, чем в контроле. В контроле, а также в колбах с концентрацией хлорида марганца в питательной среде 0,025, 0,1, 0,5, 2,5 мг/л клубочки мицелия были рыхлые. В колбах с концентрацией ионов марганца 10,0 мг/л визуально наблюдали более плотные клубочки.

Добавление хлорида марганца привело также к изменению цвета клубочков по мере увеличения концентрации ионов марганца в питательной среде от светло-желтого до светло-коричневого (рисунок 4).

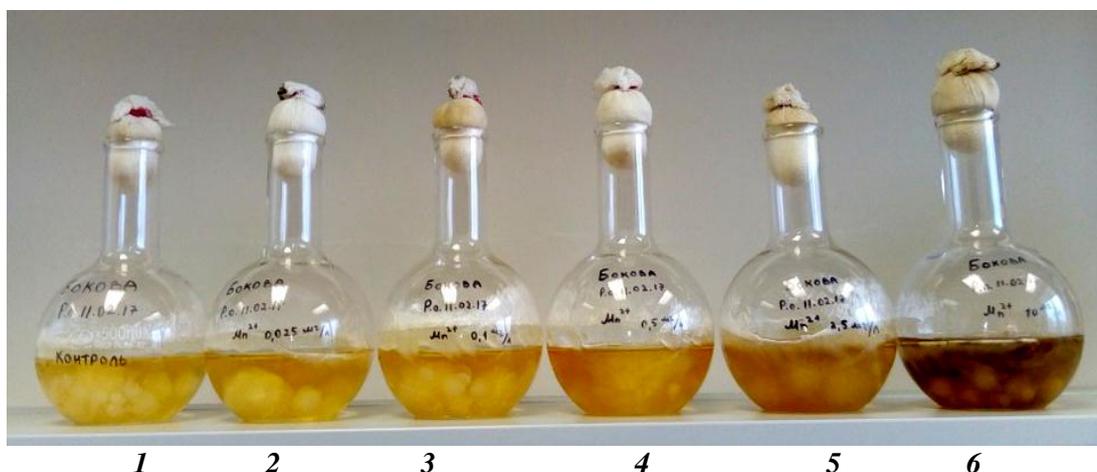


Рисунок 4 – Изменения цвета культуры *P. ostreatus* в зависимости от концентрации хлорида марганца при глубинном культивировании на качалке. 14 сут. 1– контроль, 2–6 – введение в питательную среду хлорида марганца (2 – 0,025 мг/л, 3 – 0,1 мг/л, 4 – 0,5 мг/л, 5 – 2,5 мг/л, 6 – 10 мг/л).

На клубочках мицелия, выросших в среде с концентрацией ионов марганца 10,0 мг/л, имелись темно-коричневые пятна. На поверхности клубочков, которые росли в среде с концентрацией ионов марганца 2,5 мг/л, также были обнаружены небольшие потемнения, однако в гораздо меньшем количестве, по сравнению с колбами с концентрацией ионов марганца 10,0 мг/л.

Во всех вариантах эксперимента при глубинном культивировании на качалке культуры *P. ostreatus* развивались 1–2 крупных клубочка, происходящих из инокулюма, и вторичные мелкие. При росте в среде, содержащей соль марганца, количество клубочков уменьшалось, размеры их увеличивались по сравнению с контролем (таблица 3).

Закономерности влияния ионов марганца на количество и размер образовавшихся клубочков мицелия *P. ostreatus* при глубинном культивировании не выявлено. Однако, судя по сухой массе

мицелия, добавление хлорида марганца в питательную среду оказывало влияние на урожайность. При концентрациях 0,025, 0,1, 0,5 и 2,5 мг/л урожайность снижалась на 21,6, 17,8, 9,5 и 5,3% соответственно, а при 10,0 мг/л увеличилась на 9,3% по сравнению с контролем (таблица 4).

Таблица 3 – Характер роста мицелия *P. ostreatus* в зависимости от концентрации ионов марганца при глубинном культивировании на качалке, 14 сут

Концентрация ионов марганца, мг/л	Количество клубочков мицелия по классам диаметра (см)			
	0,3–0,5	0,6–2,0	2,1–3,0	3,1–6,5
0 (контроль) (n=3)	1–19	1–23	1–2	1
0,025 (n=3)	1–3	1–6	1	1
0,1 (n=3)	1–8	1–14	1–2	1–2
0,5 (n=3)	1–2	1–3	1	1
2,5 (n=3)	0	1–6	1–2	1–2
10,0 (n=3)	1	1–14	1–4	1–2

Таблица 4 – Влияние хлорида марганца на накопление биомассы мицелия *P. ostreatus*. 14 сут культивирования на качалке

Концентрация ионов марганца, мг/л	Сухая масса, г
0 (контроль) (n=3)	3,98 ± 0,04
0,025 (n=3)	3,12 ± 0,09
0,1 (n=3)	3,27 ± 0,07
0,5 (n=3)	3,60 ± 0,40
2,5 (n=3)	3,73 ± 0,25
10,0 (n=3)	4,35 ± 0,28

Однофакторный дисперсионный анализ полученных данных показал, что действие варьирующего фактора (концентрация ионов марганца) оказывает статистически значимое влияние на прирост культуры вешенки обыкновенной на качалке, так как F–критерий Фишера ($F = 3,9725$) больше F–критического (F –квантиль = 3,1059), $P < \alpha$ ($P = 0,0234$; $\alpha = 0,05$), при заданном уровне значимости $\alpha = 0,05$. Сила влияния данного фактора на прирост глубинной культуры вешенки с перемешиванием находится в пределах от 0,61 до 1,0 ($h^2_x = 0,623$) и является сильной.

Выводы. Питательная картофельно–сахарозная среда является хорошим доступным субстратом для выращивания *P. ostreatus in vitro*. Культура вешенки обладала приятным грибным ароматом при всех способах культивирования и он не изменялся при добавлении хлорида марганца. Добавление хлорида марганца в питательную среду в исследуемых концентрациях не влияет на морфологические особенности вешенки обыкновенной при всех способах культивирования. В поверхностной культуре добавление хлорида марганца влияет лишь на изменение цвета колоний и только в концентрациях 2,5 и 10,0 мг/л, но не изменяет другие морфологические признаки. В глубинной культуре хлорид марганца оказал влияние на морфологические особенности «шейкерной» культуры, но изменений не выявлено при глубинном культивировании гриба без перемешивания. Оптимальное значение концентрации ионов марганца в среде для наибольшего прироста вешенки варьирует в зависимости от способа культивирования: для поверхностного культивирования оно составляет 0,025 мг/л, для глубинного культивирования без перемешивания – 0,5 мг/л, для глубинного культивирования с перемешиванием – 10,0 мг/л. Следовательно, влияние ионов марганца на рост и развитие мицелия гриба носит сложный характер и результат их воздействия на культуру *P. ostreatus* зависит от совокупности других факторов.

Авторы выражают благодарность Е.О. Юрченко, И.А. Ильючик, А.Д. Кульгавене за помощь в проведении настоящих исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (грант № Б16–039)

Список литературы

1. Бабицкая, В.Г. *Pleurotus ostreatus* – продуцент комплекса биологически активных веществ / В.Г. Бабицкая, В.В. Щebra, В.С. Олешко, О.В. Осадчая // Прикладная биохимия и микробиология. – 1996. – Т. 32. – № 2. – С. 203–210.
2. Биологические особенности лекарственных макромицетов в культуре: сб. науч. тр. : в 2 т. Т 2 / НАН Украины, Ин-т ботаники им. Н.Г. Холодного; науч. ред. С.П. Вассер. – Киев, 2012. – 459 с.
3. Вассер, С.П. Наука о лекарственных шляпочных грибах: современные перспективы, достижения, доказательства и вызовы / С.П. Вассер // Биосфера. – 2015. – Т. 7. – № 2. – С. 238–248.
4. Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубинной культуре / Н.А. Бисько [и др.]; под. общ. ред. И.А. Дудки. – Киев: Наук. Думка, 1983. – 312 с.
5. Плохинский, Н. А. Биометрия / Н. А. Плохинский. – М.: Изд-во МГУ, 1970. – 367 с.
6. Теоретические и прикладные аспекты рационального использования и воспроизводства недревесной продукции леса: материалы международной научно-практической конференции, Гомель, 10–12 сентября 2008 г. / Ин-т леса НАН Беларуси; редкол.: А.И. Ковалевич (отв. ред.) [и др.]. – Гомель, 2008. – 383 с.
7. Deepalakshmi, K. *Pleurotus ostreatus*: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties / K. Deepalakshmi, S. Mirunalini // Journal of Biochemical Technology. – 2014. – Vol. 5. – No.2. – P. 718–726.
8. Gregori, A. Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus* spp. / A. Gregori, M. Svagelj, J. Pohleven // Food Technology Biotechnology. – 2007. – Vol. 45. – No. 3. – P. 238–249.
9. Kapahi, M. Mycoremediation potential of *Pleurotus* species for heavy metals: a review / M. Kapahi, S. Sachdeva // Bioresour. Bioprocess. – 2017. – Vol. 4. – No 32. – P. 2–9.
10. Oyetaya, V.O. Antimicrobial and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fries) cultivated on different tropical woody substrates / V.O. Oyetaya, O.O. Ariyo // Journal of Waste Conversion, Bioproducts and Biotechnology. – 2013. – Vol. 1. – No 2. – P. 28–32.

ZHUK O.N.

BOKOVA O.A.

SAKOVICH, V.V.

NIKANDROV V.N.

DISTINGUISHING FEATURE OF GROWTH AND DEVELOPMENT OF *PLEUROTUS OSTREATUS* MUSHROOM IN THE PRESENCE OF MANGANESE IONS (II)

Summary. *Modern biotechnologies require the application of strictly balanced conditions for maximum yield of final products. Manganese is an essential microelement for living organisms, its lack or excess supply is accompanied by impairment of vital activity or even death of the organism. The need for biosystems in this microelement has its differences, but there are no data on the effect of manganese on the growth and development of fungi, particularly *P. ostreatus*. In this paper, it is shown that a nutritious potato–sucrose medium is a good available substrate for the cultivation of *P. ostreatus* in vitro. The addition of manganese chloride to concentrations of 0.025 mg / L, 0.1 mg / L, 0.5 mg / L, 2.5 mg / L, 10.0 mg / L influences the growth and development of this fungus in a given nutrient medium from the conditions of cultivation. A significant increase in the biomass of the mycelium compared to the control was obtained for the surface culture at a concentration of 0.025 mg / l (19.8%), for deep culture without mixing, 0.5 mg / l (26%), for deep culture with mixing, 10.0 mg / l (9%). The elucidation of the nature of the dependence of the influence of manganese on the biosystems on the totality of other factors seems very interesting and promising for the further development of biotechnology*

References

1. Babitskaia V.G., Shchebra V.V., Oleshko V.S., Osadchaia O.V. *Pleurotus ostreatus* – produtsent kompleksa biologicheskii aktivnykh veshchestv [Pleurotus ostreatus – producer of the complex of biologically active substances]. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia* [Applied Biochemistry and Microbiology], 1996, vol. 32, no 2, pp. 203–210. (In Russian)

2. *Biologicheskie osobennosti lekarstvennykh makromitsetov v kul'ture* [Biological peculiarities of medicinal macromycetes in culture]. *Sbornik nauchnykh trudov*. Vol. 2 .Ed. S.P. Vasser. Kiev, 2012. 459 p. (In Russian)
3. Vasser S.P. *Nauka o lekarstvennykh shliapochnykh gribakh: sovremennye perspektivy, dostizheniia, dokazatel'stva i vyzovy* [Medicinal mushroom science: current prospects, advances, evidences, and challenges]. *Biosfera* [Biosphere]. – 2015, Vol. 7, no. 2, pp. 238–248. (In Russian)
4. Bis'ko N.A. et al. *Vysshie s"edobnye bazidiomitsety v poverkhnostnoi i glubinnoi kul'ture* [Higher edible basidiomycetes in a surface and submerged culture]. Ed. I.A.Dudka. Kiev, Naukova Dumka Publ., 1983. 312 p. (In Russian)
5. Plokhinskii N. A. *Biometriia* [Biometrics]. Moskow, Moskovskii gosudarstvennyi universitet Publ., 1970. 367 p. (In Russian)
6. *Teoreticheskie i prikladnye aspekty ratsional'nogo ispol'zovaniia i vosproizvodstva nedrevesnoi produktsii lesa* [Theoretical and applied aspects of sustainable use and reproduction of non-timber forest products]. *Materialy mezhdunarodnoi nauchno–prakticheskoi konferentsii, Gomel', 10–12 sentiabria 2008 g.* Ed. A.I. Kovalevich et al. Gomel', 2008. 383 p. (In Russian)
7. Deepalakshmi K., Mirunalini S. *Pleurotus ostreatus: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties*. *Journal of Biochemical Technology*, 2014, Vol. 5, no.2, pp. 718–726.
8. Gregori A., Svagelj M., Pohleven J. *Cultivation techniques and medicinal properties of Pleurotus spp*. *Food Technology Biotechnology*, 2007, Vol. 45, no. 3, pp. 238–249.
9. Kapahi M., Sachdeva S. *Mycoremediation potential of Pleurotus species for heavy metals: a review*. *Bioresour. Bioprocess*, 2017, Vol. 4, no 32, pp. 2–9.
10. Oyetaya V.O., Ariyo O.O. *Antimicrobial and antioxidant properties of Pleurotus ostreatus (Jacq.: Fries) cultivated on different tropical woody substrates*. *Journal of Waste Conversion, Bioproducts and Biotechnology*, 2013, Vol. 1, no 2, pp. 28–32.

Received 9 october 2017