



Необходимо осуществлять мониторинговые исследования за распространением таких инвазивных видов, как *Zizania latifolia* и *Lemna minuta*.

В связи с малой изученностью охраняемых растений гидрофильной флоры Саратовской области важно продолжать детальное изучение ценопопуляций уже обнаруженных редких видов, осуществлять поиск новых и проводить мониторинговые исследования найденных ценопопуляций.

Список литературы

1. Краснова А. Н. Проблемы охраны генофонда гидрофильной флоры. Рыбинск, 2001. 160 с.

2. Матвеев В. И., Саксонов С. В., Соловьева В. В. Водные растения в Красной книге Самарской области // Гидробиотаника-2000 : 5 Всерос. конф. по водн. растениям. Борок, 2000. С. 185–186.
3. Красная книга Саратовской области : Грибы. Лишайники. Растения. Животные. Саратов, 2006. 528 с.
4. Серова Л. А., Березуцкий М. А. Растения национального парка «Хвалынский». (Конспект флоры) Саратов, 2008. 194 с.
5. Еленевский А. Г., Буланый Ю. И., Радыгина В. И. Конспект флоры Саратовской области. Саратов, 2008. 232 с.
6. Щербаков А. В., Майоров С. Р., Мартиросян Е. В. Адвентивные Lemnaceae Московской области // Гидробиотаника 2010 : материалы I (VII) Международ. конф. по водным макрофитам (пос. Борок, 9–13 окт. 2010 г.). Ярославль, 2010. С. 338–340.

УДК 582.284+574

ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СОЕДИНЕНИЙ СЕЛЕНА ПРИ ХРАНЕНИИ КОЛЛЕКЦИОННЫХ КУЛЬТУР КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

Д. Ю. Ильин, Г. В. Ильина, М. И. Морозова

Пензенская государственная сельскохозяйственная академия
E-mail: g-ilyina@yandex.ru

Показаны возможности использования соединений селена в качестве компонента питательных сред для хранения коллекционных культур грибов. Антиоксидантные свойства элемента селена сдерживают окислительные процессы в мицелии, предотвращая его старение. Культурально-морфологические, физиологические и биохимические характеристики культур, их жизнеспособность сохраняются на достаточном уровне в течение 18–24 месяцев хранения.

Ключевые слова: коллекция культур, селен, антиоксиданты.

Possibilities Use of Selenium Compounds at Storage of Collection Cultures of Xylothrophic Basidiomycetes

D. Yu. Ilyin, G. V. Ilyina, M. I. Morosova

Possibilities of use of selenium compounds as component of nutrient mediums for storage of collection cultures of mushrooms are shown. Antioxidant properties element selenium reduces oxidizing processes in mycelium, preventing its aging. Morphological, physiological and biochemical characteristics of cultures and their viability remain at sufficient level within 18–24 months of storage.

Key words: culture collection, selenium, antioxidants.

Введение

Для сохранения биоразнообразия микроорганизмов предполагается создание коллекций культур. В частности, в условиях чистой культуры перспективно сохранение редких и исчезающих

видов базидиомицетов. В то же время поддержание коллекционных штаммов – неперемный атрибут работы с микроорганизмами – продуцентами ценных метаболитов, биологически активных веществ. С практических позиций сохранение морфолого-физиологических характеристик культуры микроорганизма и его продуктивных свойств в ходе длительного хранения было и остается одной из самых актуальных задач биотехнологии.

Промышленные регламенты работы с продуцентами допускают хранение культуры без пересева в течение четырех-шести месяцев. Традиционно наиболее распространенным способом поддержания исходной культуры гриба является высеивание мицелия в пробирки на скошенные агаризированные среды с оптимальным для каждого штамма составом и выращивание его до определенного возраста в стабильных условиях. Готовую культуру в пробирках помещают в холодильник и хранят при температуре 3–4 °С. Пересевы культур проводят через определенные промежутки времени с таким расчетом, чтобы наилучшим образом сохранить физиолого-биохимические свойства штамма. Для длительного хранения некоторых штаммов рекомендуется использовать бедные сахарами крахмальные среды. В крупных коллекциях грибные культуры успешно хранят в заморо-





женном состоянии в атмосфере жидкого азота при температурах $-165-196^{\circ}\text{C}$; в лиофилизированном состоянии; под слоем вазелинового или минерального масла [1]. Но это, к сожалению, не всегда подходит для хранения культур высших грибов, а также теряется актуальность и возможность реализации в большинстве учебных и научных коллекций, имеющих в регионах России. При этом известно, что ни один из многочисленных способов хранения живых культур микроорганизмов не дает полной гарантии стабильности штамма и сохранения его продуктивности.

В то же время при частых пересевах культуры нередко изменяют физиологические параметры, теряют способность к выработке целевых продуктов или снижают ее. Среди прочих причин это обусловлено спонтанной диссоциацией штаммов, инициируемой окислительными стрессами, являющимися обязательным последствием процессов многократного посева. Окислительный стресс рассматривается как главный механизм дезорганизации клеточного метаболизма [2–4].

Существуют сведения, свидетельствующие о выраженных антиоксидантных свойствах микроэлемента селена [5–7]. Механизмы нивелирования окислительного стресса в клетке связывают с работой антиоксидантных ферментных систем, в состав активных центров которых входит селен. В связи с этим целью нашей работы было исследование возможностей использования соединений селена для снижения уровня окислительного стресса у хранящихся мицелиальных культур.

Материал и методы исследований

Объектами настоящих исследований стали штаммы видов ксилотрофных базидиомицетов, занесенных в Красную книгу Пензенской области: *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. (трутовик лакированный, штаммы G1-1, G1-3, G1-6) и *Sparassis crispa* (Wulfen) Fr. (спарассис курчавый, штамм AI-10), сохранение культур которых имеет особое значение.

В питательную среду, предназначенную для хранения мицелиальных культур (картофельно-глюкозный агар, КГА), вносили растворы селената натрия (Na_2SeO_4) (первый вариант опыта) и 9-фенил-симметричного октагидроселеноксанта (селенопиран, СП-1) (второй вариант опыта), с конечной концентрацией в пересчете на селен 10^{-4} г/л. В контрольные варианты вносили адекватное количество растворителя (диметилсульфоксид). Культуры хранили при температуре обычной холодильной камеры (4°C).

Для оценки состояния мицелия использовали морфологические, физиологические и биохимиче-

ские маркерные показатели. Это средние скорости роста мицелия после хранения, степень базофилии протоплазмы (иллюстрация метаболической активности клетки по интенсивности окрашивания ее содержимого основными красителями, оценивается по шкале от 1 до 5 баллов), способность к образованию телеоморфы, оксидазная активность культур на лигнинсодержащем материале и концентрации в мицелии биохимического маркера окислительного стресса – малонового диальдегида (МДА).

Жирно-кислотный состав мицелия определялся методом газожидкостной хроматографии с использованием соответствующих стандартов, а также путем расчета времен удерживания.

Для определения МДА в мицелии использовали фотометрический метод [8], основанный на взаимодействии МДА и тиобарбитуровой кислоты.

Статистическая обработка проводилась с помощью программы для обработки и анализа статистических данных «Statistica 6.0». Для оценки достоверности результатов использовался *t*-критерий Стьюдента при уровне значимости 0,95.

Результаты и их обсуждение

Нами изучено влияние соединений селена на показатели состояния хранящего мицелия штаммов *G. lucidum*. Установлено, что в опытных вариантах и в контроле культуры сохраняют способность к прорастанию в обычные сроки (в течение 3–6 месяцев). После 3-х месяцев хранения культур в контроле скорость роста мицелия достоверно снижается, что объясняется, прежде всего, увеличением периода адаптации. После хранения культур свыше 6 месяцев в контрольном варианте ферментативная активность мицелия последовательно угасает. После 12 месяцев хранения такие культуры не брались в опыт, по причине того, что посевной материал практически утрачивал способность к прорастанию.

Результаты опытов, близкие для трех изученных штаммов *G. Lucidum*, представленные на примере наиболее продуктивного (склонного к плодоношению) штамма G1-1, показали, что соединения селена при их добавлении в среды способствуют сохранению физиологических параметров хранящейся культуры в течение длительного времени (до 18–24 месяцев) без посева (табл. 1). По истечении этого периода отмечаются характерные изменения, которые определяются при помощи ряда морфологических и биохимических маркерных показателей: скорость роста, степень базофилии протоплазмы, оксидазная активность культуры на лигнинсодержащем материале.



Таблица 1

Влияние соединений селена на физиолого-биохимические параметры мицелия *G. lucidum* (штамм GI-1) при хранении

Варианты опыта	Период хранения	Показатели			
		Средняя скорость роста, мм/сут	Базофилия протоплазмы, баллы	Оксидазная активность, ед. опт. пл · 100/г·с	Способность к формированию телеоморфы
Контроль	До начала хранения	9.60 ± 0.10	5	0.58 ± 0.02	Имеется
	3 месяца	7.39 ± 0.08	4	0.61 ± 0.02	Имеется
	6 месяцев	2.60 ± 0.03	4	0.26 ± 0.01	Имеется
	9 месяцев	1.03 ± 0.12	3	0.15 ± 0.01	Имеется
	12 месяцев	–	2	–	Отсутствует
	18 месяцев	–	1	–	–
	24 месяца	–	0	–	–
	30 месяцев	–	–	–	–
	36 месяцев	–	–	–	–
КГА + селенат натрия (10 ⁻⁴ г/л по Se)	До начала хранения	9.60 ± 0.10	–	0.58±0.02	Имеется
	3 месяца	9.51 ± 0.12	5	0.77 ± 0.04	Имеется
	6 месяцев	9.57 ± 0.03	5	0.60 ± 0.06	Имеется
	9 месяцев	9.50 ± 0.04	4	0.51 ± 0.01	Имеется
	12 месяцев	9.50 ± 0.10	4	0.43 ± 0.19	Имеется
	18 месяцев	8.90 ± 0.10	4	0.40 ± 0.12	Имеется
	24 месяца	5.60 ± 0.10	3	0.28 ± 0.03	Отсутствует
	30 месяцев	–	–	–	–
	36 месяцев	–	–	–	–
КГА + селенопиран (10 ⁻⁴ г/л по Se)	До начала хранения	9.60 ± 0.10	5	0.58±0.02	Имеется
	3 месяца	9.40 ± 0.12	5	0.51 ± 0.16	Имеется
	6 месяцев	9.32 ± 0.09	5	0.49 ± 0.01	Имеется
	9 месяцев	9.30 ± 0.06	5	0.49 ± 0.12	Имеется
	12 месяцев	9.22 ± 0.20	5	0.40 ± 0.12	Имеется
	18 месяцев	6.16 ± 0.09	4	0.39 ± 0.11	Имеется
	24 месяца	1.60 ± 0.06	2	0.18 ± 0.06	Имеется
	30 месяцев	–	–	–	–
	36 месяцев	–	–	–	–

Имеющийся в коллекции штамм *S. crispa* (AI-10) не проявляет склонности к образованию телеоморфы на традиционных питательных средах в условиях чистой культуры. Для него характерны относительно низкие скорости роста на КГА (контроль), относительно невысокие показатели оксидазной активности. Проведено изучение возможностей увеличения сроков хранения культуры при помощи внесения в среду соединений селена (табл. 2).

Возможно, вследствие облигатно-паразитической стратегии в природе штамм *S. crispa* быстро утрачивает способность к нормальному развитию, испытывая стресс в условиях чистой культуры. Существуют предположения, что вне зависимости от относительно низких скоростей роста энергетические затраты организма в условиях стресса довольно велики [9]. Это, безусловно, определяет

некоторое смещение баланса в обменных процессах в ущерб процессам ассимиляции, при одновременной интенсификации образования продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Соединения селена, вероятно, стабилизируют протекание обменных процессов в мицелии и в определенной степени нивелируют негативное влияние свободных радикалов. Данное предположение нашло подтверждение при определении содержания в мицелии хранящихся культур биохимического маркера окислительного стресса – малонового диальдегида (МДА).

Предварительно, до начала хранения, были изучены особенности жирно-кислотного состава мицелия штаммов *G. lucidum* и *S. crispa*. Установлены некоторые отличия между штаммами первого вида. Второй вид представлен в коллекции одним штаммом. Статистическая



Таблица 2

Влияние соединений селена на физиолого-биохимические параметры мицелия *S. crista* (штамм AI-10) при хранении

Варианты опыта	Период хранения	Показатели		
		Средняя скорость роста, мм/сут	Базофилия протоплазмы, баллы	Оксидазная активность, ед.опт.пл·100/г·с
Контроль	До начала хранения	0.62 ± 0.03	4	0.13 ± 0.02
	3 месяца	0.44 ± 0.03	3	0.10 ± 0.01
	6 месяцев	0.05 ± 0.03	1	–
	9 месяцев	0.01 ± 0.03	1	–
	12 месяцев	–	–	–
	18 месяцев	–	–	–
КГА + селенат натрия (10 ⁻⁴ г/л по Se)	До начала хранения	0.62 ± 0.03	4	0.13 ± 0.02
	3 месяца	0.60 ± 0.03	4	0.14 ± 0.07
	6 месяцев	0.55 ± 0.03	2	0.09 ± 0.06
	9 месяцев	0.38 ± 0.03	2	–
	12 месяцев	0.02 ± 0.03	2	–
	18 месяцев	–	–	–
КГА + селенопиран (10 ⁻⁴ г/л по Se)	До начала хранения	0.62 ± 0.03	4	0.13 ± 0.02
	3 месяца	0.77 ± 0.03	5	0.14 ± 0.01
	6 месяцев	0.60 ± 0.03	4	0.09 ± 0.01
	9 месяцев	0.42 ± 0.03	4	0.07 ± 0.04
	12 месяцев	0.38 ± 0.03	2	–
	18 месяцев	0.35 ± 0.03	2	–

оценка выявила достоверность отличий между штаммами *G. lucidum* лишь по двум из двенадцати идентифицированных жирных кислот (пентадекановой и пальмитиновой), а межвидовые отличия показаны по всем установленным жирным кислотам. При оценке полученных данных во всех образцах отмечено преобладание ненасыщенных жирных кислот (моноеновых, диеновых). Помимо тривиальных компонентов, изомеров, во всех образцах обнаружено небольшое количество высококипящих компонентов, по всей видимости не являющихся высшими жирными кислотами. Тем не менее значительное представительство непредельных жирных кислот свидетельствует о существовании своеобразного ресурса для образования малонового диальдагида при активизации окислительных процессов в мицелии.

Уровень МДА определяли в мицелии изученных видов на этапе адаптации к субстрату, в фазу логарифмического роста культур, а затем на разных сроках хранения мицелия.

Установлено неоднозначное содержание МДА у разных штаммов изученных видов на разных этапах роста (табл. 3). Отмечено, что в фазу адаптации, в период которой рост мицелия замедлен, уровень МДА находится на довольно высоком уровне, что косвенно иллюстрирует наличие окислительного стресса. Этот факт свидетельствует в пользу сделанного выше предпо-

ложения относительно высоких энергетических затрат организма на адаптационные процессы. Впоследствии, с переходом культур к логарифмическому и стационарному росту, на фоне возросших показателей средних скоростей роста, содержание МДА в мицелии несколько снижается и стабилизируется, что указывает на снижение уровня стресса и включение антиоксидантных механизмов.

При анализе результатов, полученных при определении содержания МДА в образцах мицелия, хранящихся на средах, с добавлением соединений селена (10⁻⁴ г/л в пересчете на элемент), сравнение проводили с показателями, отмеченными в исходных образцах на стадии логарифмического роста. Содержание МДА в хранящемся мицелии штаммов обоих изученных видов, существенно различающихся трофическими особенностями в природных условиях, достоверно ниже контрольных показателей мицелия аналогичного возраста и срока хранения.

Сохранение культур в жизнеспособном состоянии в течение длительного периода хранения, более стабильный относительно контрольных показателей антиоксидантный статус мицелия в совокупности свидетельствуют о значительном нивелировании фактора окислительного стресса. Известно, что селен как часть глутатионпероксидазы оказывает защитное



действие при окислительном стрессе, катализируя распад перекиси водорода или разложение гидроперекисей липидов и тем самым прерывая переокислительную цепную реакцию свободных радикалов [10]. Кроме того, в ряде источников на соединения селена – селенаты – указывают как на антиметаболиты [11]. Органические же

соединения селена в плане воздействия на рост и метаболизм, в частности грибных культур, изучены сравнительно недостаточно. Возможно, в данном случае имеет место стабилизация обменных процессов, на фоне которой замедление метаболических реакций определяет торможение свободнорадикальных процессов.

Таблица 3

Содержание малонового диальдегида в мицелии штаммов *G. lucidum* и *S. crispa* на стадии активного роста и после продолжительного хранения при температуре 4 °С, нмоль/г

Время развития мицелия с момента инокуляции	Виды, штаммы			
	<i>G. lucidum</i>			<i>S. crispa</i>
	GI-1	GI-3	GI-6	AI-10
3 сут (фаза адаптации)	88.6 ± 2.14	102.1 ± 1.22	94.5 ± 2.05	123.4 ± 3.24
5 сут (фаза логарифмического роста)	64.6 ± 1.96	80.5 ± 2.04	85.1 ± 4.43	112.7 ± 5.96
7 сут (фаза стационарного роста)	59.9 ± 2.55	75.9 ± 4.37	82.1 ± 3.29	88.4 ± 1.90
9 сут (фаза стационарного роста)	60.1 ± 2.81	87.8 ± 3.47	90.2 ± 4.75	84.2 ± 3.77
После хранения в течение:				
3 месяцев	40.8 ± 1.80	51.2 ± 6.38	141.9 ± 4.75	77.8 ± 6.12
6 месяцев	93.8 ± 7.24	84.9 ± 8.23	210.5 ± 5.79	126.9 ± 4.38
9 месяцев	115.9 ± 3.53	171.5 ± 4.59	262.3 ± 1.75	162.5 ± 5.30
12 месяцев	148.1 ± 4.57	214.0 ± 6.57	105.2 ± 2.72	147.9 ± 5.84
18 месяцев	107.8 ± 4.08	177.6 ± 5.47	104.2 ± 1.78	–
24 месяцев	91.2 ± 2.54	168.1 ± 3.21	100.6 ± 3.33	–

Полученные результаты однозначно свидетельствуют о целесообразности использования соединений селена в практике хранения культур ксилотрофных базидиомицетов.

Заключение

Таким образом, совокупность проведенных исследований позволила установить целесообразность использования соединений селена при хранении мицелиальных культур ксилотрофных базидиомицетов. Органические (9-фенил-симметричный-октагидроселеноксантен) и неорганические соединения селена (селенат натрия) при добавлении к питательной среде в концентрациях 10⁻⁴ г/л (в пересчете на селен) позволяют увеличить сроки хранения мицелиальных культур при температуре 4 °С до 18–24 месяцев. Жизнеспособность, ростовые, биохимические характеристики (скорость и характер роста, базофилия протоплазмы, ферментативная активность, способность к образованию базидиомы) сохраняются на достаточно высоком уровне. В ходе дальнейших исследований планируется изучение возможности использования изученных соединений при хранении культур видов грибов – представителей других эколого-трофических групп.

Список литературы

1. Егоров Н. С. Промышленная микробиология. М., 1989. 688 с.

2. Довженко Н. В., Куриленко А.В., Бельчева Н. Н., Челомин В. П. Окислительный стресс, индуцированный кадмием, в тканях двухстворчатого моллюска *Modiolus modiolus* // Биология моря. 2005. Т. 31, № 5. С. 358–362.

3. Терешина Е. В. Старение, окислительный стресс и антиоксиданты // Геронтология и гериатрия. 2005. Вып. 5. С. 39–52.

4. Choudry S., Panda S. K. Induction of oxidative stress and ultrastructural changes in moss *Taxithelium nepalense* (Schwaegr.) Broth. under lead and arsenic phytotoxicity // Current science. 2004. Vol. 87, № 3. P. 342–348.

5. Schroeder H. A., Frost O. V., Balassa J. J. Essential trace elements in man : selenium // J. Chron. Dis. 1970. Vol. 23. P. 227–243.

6. Levander O. A. Selenium. Trace elements in human and animal nutrition / 5th Eds. Orlando et al.: Acad. Press, 1986. Vol. 2. P. 209–266.

7. Rezanka T., Sigler K. Biologically active compounds of semi-metals // Phytochemistry. 2008. Vol. 69. P. 585–606.

8. Michara M., Uchiyama M. Thiobarbituric and value on fresh homogenate of rat as a parameter of lipidperoxidation in aging, CCL4 intoxication and vitamin E deficiency // Biolchem. Med. 1980. Vol. 23(3). P. 302–311.

9. Костычев А. А. Биоабсорбция тяжелых металлов и мышьяка агарицидными и гастероидными базидиомицетами : автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2009. 23 с.

10. Grossman A., Wendel A. Non-reactivity of the selenoenzyme glutathione peroxidase with enzymatically hydroperoxidized phospholipids // Eur. J. Biochem. 1983. Vol. 1. P. 549–552.

11. Birkett J. A., Rowlands R. T. Chlorate resistance and nitrate assimilation in industrial strains of *Penicillium chrysogenum* // J. Gen. Microbiol. 1981. Vol. 123. P. 281–285.