

УДК 602.6:635.9

DOI <https://doi.org/10.32851/2226-0099.2020.116.1.9>

ПІДБІР ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ ОТРИМАННЯ КУЛЬТУРИ БАЗИДИОМІЦЕТІВ РОДУ *PLEUROTUS* В УМОВАХ IN VITRO

Іванова Т.В. – к.с.-г.н., доцент, доцент кафедри екобіотехнології та біорізноманіття, Національний університет біоресурсів і природокористування України

Метою дослідження поставлено модифікацію живильного середовища для вищих базидіоміцетів, а саме грибів роду *Pleurotus*, і визначення лінійної швидкості росту перспективного штаму НК-35. Методи. У дослідженнях використовували біотехнологічні методи (для отримання та субкультивування штаму НК-35 чистої культури гливи звичайної в умовах *in vitro* використовували такі середовища: м'ясо-пептони агар, картопляно-глюкозний агар, агаризоване середовище на відварах проростків картоплі й лоха вузьколистого), статистичні методи (досліджувалася лінійна швидкість росту грибів, для експерименту з оцінки швидкості росту *Pleurotus ostreatus* суспензію грибів (у співвідношенні 1:2) розміщували на досліджуваній поживній середовища; ріст колоній оцінювали вимірюванням їхнього діаметру у двох перпендикулярних напрямках кожні дві доби протягом двох тижнів), складання графіків залежності швидкості росту досліджуваних культур від часу. Результати. Нами виявлено, що відомі раніше середовища не забезпечують достатньої швидкості росту мицелію та необхідного врожаю біомаси в порівнянні з досліджуваною субстанцією. Вивчено нові компоненти живильного середовища для отримання більшої біомаси чистої культури вищих базидіоміцетів роду *Pleurotus*. Отже, живильне середовище для чистих культур вищих базидіоміцетів, яке містить агар-агар і воду, додатково містить відвари зерна вівса й кори дуба в такому співвідношенні компонентів на 1 л: агар-агар 15 г, відвари зерна вівса 600 мл, кори дуба 250 мл, інші – дистильована вода. Результати аналізу лінійної швидкості росту *Pleurotus ostreatus* на досліджуваних і контрольному живильних середовищах, розрахунок коефіцієнта кореляції свідчать: для виділення та вирошування штамів гливи звичайної найпридатніше середовище з вмістом відварів зерен вівса й кори дуба. Надана діаграма кореляційного поля у вигляді діаграми розсіювання (кореляційного поля), що ілюструє зв'язок між змінними, й розрахована лінія регресії. Вона представлена прямою, а це означає, що кореляційний зв'язок між ознаками лінійний та оцінюється за допомогою вибіркового коефіцієнта кореляції r . Через те, що коефіцієнт кореляції > 0 , зв'язок між ознаками X і Y пряий, а $R = 0,98615$ – зв'язок сильний. Висновки: одержані результати використовуватимуться в подальших дослідженнях для отримання чистої культури грибів роду *Pleurotus* в умовах *in vitro*.

Ключові слова: живильне середовище, чиста культура, гриби роду *Pleurotus*, мицелій, біомаса.

Ivanova T.V. Selection of nutrient media for culturing basidiomycetes of the genus *Pleurotus in vitro*

The aim of the research was a modification of the nutrient medium for the higher Basidiomycetes (mushroom of the genus *Pleurotus*) and determination of their linear growth rate. Biotechnical and statistical methods were used in researches. The studies used biotechnological methods (to obtain and subculture strain NK-35 pure culture of oyster mushroom *in vitro* used the following media: meat-peptone agar, potato-glucose agar, agar medium on decoctions of potato seedlings and oyster. Statistical methods: (linear growth rate of mushroom was studied, for the experiment to assess the growth rate of *Pleurotus ostreatus* suspension of mushroom (in a ratio of 1:2) was placed on the studied nutrient media, colony growth was assessed by measuring their diameter in two perpendicular directions every two days for two weeks; growth rates of the studied crops over time. Results of the analysis of the linear growth rate of *Pleurotus ostreatus* on nutrient medium (tested and controled), also the correlation coefficient calculation shows that most suitable medium for cultivation of strains of *Pleurotus ostreatus* contains decoction of grain oats and oak bark. The correlation field diagram is presented in the form of a scattering diagram (correlation field). This illustrates the relationship between the variables and the calculated regression line. It is represented by a straight line, which means that the correlation between the features is linear and is estimated using a sample correlation coefficient r . Since the correlation coefficient > 0 , the relationship between the signs of X and Y is straight, because $R = 0,98615$ the relationship is strong. The results will be used in further researches to obtain pure cultures of mushroom of the genus *Pleurotus* in conditions *in vitro*.

Key words: nutrient medium, pure culture, mushrooms of the genus *Pleurotus*, mycelium biomass.

Аналіз літературних джерел, постановка проблеми. Міцелій – це посівний матеріал грибів, вегетативне тіло якого складається з тонких розгалужених ниток (гіфів), стерильно вирощених на різних носіях і призначених для посадки в підготовлений субстрат для отримання врожаю грибів [1].

Існує велика кількість культурних штамів, які відрізняються один від одного зовнішнім виглядом, врожайністю, кількістю виділення спор і вимогами до умов вирощування [2; 3].

Штам грибів (нім. *Stamm* – стовбур, основа) – чиста культура, виділена з певного джерела або отримана в результаті мутації або селекції. Сучасні штами характеризуються високою однорідністю та якістю грибів, високою врожайністю в посиданні з коротким циклом колонізації субстрату і плодоношення [2; 3].

В українському виробництві найкраще себе зарекомендував штам гливи звичайної (*Pleurotus ostreatus*) НК-35. НК-35 – це гібридний штам, є одним з найпопулярніших при вирощуванні гливи. Дані про походження та розвиток штаму наведені в табл. 1, 2 [4–9].

Таблиця 1

Паспорт штаму гливи Р-2 (НК-35)

Штам	Штам	Походження штаму гливи	Температура плодоношення, °С	Колір плодового тіла гриба
Р-2	НК-35	Угорщина	5–22 (opt 14–16)	Сірий

Таблиця 2

Параметри росту і розвитку міцелію штаму гливи Р-2 (НК-35)

Температура	22°C в приміщенні (в блоці 24–28°C)
Відносна вологість	60–65%
Тривалість обростання	14–16 днів
CO ₂	5 000–20 000 ppm
Повітрообмін	Ні
Освітлення	Ні

Матеріал і методика. Вибір вихідного матеріалу. Дослідження проводилися протягом 2015–2020 рр. на кафедрі екобіотехнології та біорізноманіття Національного університету біоресурсів і природокористування України, м. Київ. Посівний матеріал гливи представлений штамом НК 35. Міцелій білого кольору, з характерним запахом. Плодове тіло середнього розміру (50–80 мм), капелюшок з увігнутими рівними краями, забарвлення від темно-сірого до світло-сірої в залежності від температури культивування, при природному освітленні сіро-коричневе або коричневе. Чим нижче температура в камері, тим темніше забарвлення. Розмір капелюшків варіює від 50 до 120 мм в діаметрі. Гриби мають м'ясисту текстуру, особливо за низької температури, добре зберігаються і транспортуються.

Отримання чистої культури грибів. Для отримання чистої культури гливи звичайної використовують такі середовища: м'ясо-пептони агар, картопляно-глюкозний агар, агаризоване середовище на відварах проростків картоплі і лоха вузьколистого.

Живильні середовища

Основою створення живильних середовищ для приготування культур тканин є суміші мінеральних солей і, так як живлення культивованих тканин є гете-

ротрофним, джерело вуглецю вводять до складу середовища у вигляді сахарози або глюкози.

Крім вуглецю, кисню і водню, для росту тканин необхідний азот у вигляді азотної або аммонійної солі, фосфор у вигляді фосфату, сірка у вигляді сульфату. Загальна концентрація мінеральних елементів найбільш висока в середовищі м'ясо-пептонний агар.

Вуглеводне живлення. У більшості середовищ джерелом вуглецю та енергії є сахароза або глюкоза в концентрації 20–40 г / л.

рН середовища. У нативних умовах клітина функціонує у вузьких межах коливань концентрації водневих іонів. Відносна стабільність величини рН всередині клітини і середовища, що її оточує, підтримується буферними системами, в яких важливу роль відіграють білкові молекули – амфоліти. Відносно стабільне рН в середовищі підтримується за рахунок хелатуючих реагентів та відповідних з'єднань. Більшість стаціонарних ізольованих культур грибів росте на середовищах з рН 7–7,8 [10–14].

Плодові тіла гриба вибирають в період дозрівання. Їх відбирають з плодкових тіл за показниками, які відповідають штаму. Спори висівають в чашки Петрі. Після проростання спор і повного обростання середовища маточну культуру зберігають в холодильній камері за температури 0–2 °С [10–14]. Введення в чисту культуру проводять за загальноприйнятими методиками [15; 16].

Нами досліджувалася лінійна швидкість росту грибів (ЛСР) [15]. Для експерименту з оцінки швидкості росту *Pleurotus ostreatus* суспензію грибів (в співвідношенні 1: 2) розміщували на досліджувані поживні середовища. Потім краплю суспензії спор грибів (0,01 мл) наносили в центр чашки Петрі на середовище контроль (МПА). Після чашки інкубувались в термостаті за $(27 \pm 2)^\circ\text{C}$ та вологості 90 %. Ріст колоній оцінювався вимірюванням їх діаметру в двох перпендикулярних напрямках кожні дві доби протягом двох тижнів. На підставі отриманих даних нами складено графіки залежності швидкості росту досліджуваних культур від часу.

Статистичний аналіз проводили, використовуючи програму Statistica 8.0, а для обчислювання даних – Microsoft Office Excel.

Обговорення результатів. Найближчим аналогом модифікованого середовища є живильне середовище для роботи з чистими культурами вищих базидіоміцетів – об'єктів промислового вирощування, який передбачає наступні етапи його проведення: етилізовані картопляні проростки в кількості 250 г відварюються на повільному вогні в конічній колбі, що містить 500 мл води. Після приготування протягом 15–20 хв відвар фільтрують через ватно-марлевий фільтр на скляній воронці, обсяг фільтрату доводять до 500 мл. Повітряно-сухі плоди лоху вузьколистого (*Elaeagnus angustifolia*) в кількості 50 г відварюються в іншій колбі в 500 мл води протягом того ж часу. Декокт фільтрують на скляній воронці через ватно-марлевий фільтр. Відвари проростків картоплі і лоху вузьколистого об'єднують, додають 20 г агар-агару, доводять об'єм фільтрату до 1 000 мл і плавлять агар на повільному вогні. Готове середовище розливають в пробірки розміром 20x200 мм, автоклавують за тиску 1,5 мПа протягом 1 год і заливають на скошений агар [11; 12]. Через 3 доби (контроль стерильності середовища) скошений агар засівають чистими культурами штамів грибів роду *Pleurotus*. Інкубація тривала протягом доби в термостаті при $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$. Чисті культури отримують на 7–8 добу.

В основу дослідження поставлено завдання модифікації живильного середовища для вищих базидіоміцетів – перспективних продуцентів фізіологічно активних речовин. Методом експериментальних досліджень нами було виявлено, що це середовище не забезпечує достатньої швидкості росту міцелію і необхідного врожаю біомаси в порівнянні з досліджуваною субстанцією. До недоліків належить також і відсутність даних про вміст цукристих і білкових речовин – головних джерел вуглецевого й азотного живлення базидіоміцетів.

Поставлена задача вирішується тим, що живильне середовище для чистих культур вищих базидіоміцетів, яке містить агар-агар і воду додатково містить відвари зерна вівса та кори дуба в такому співвідношенні компонентів на 1 л: агар-агар 15 г, відвари зерна вівса 600 мл, кори дуба 250 мл, інші – дистильована вода.

Експериментальні дані щодо лінійної швидкості росту штамів істівних грибів P-2 (НК-35) гливи звичайної (*Pleurotus ostreatus*) було отримано на таких живильних середовищах (ПС): середовище з відварами проростків картоплі і лоху вузьколистого (ПС № 1), модифіковане середовище з відварами зерна вівса і кори дуба (ПС № 2), в якості контролю – м'ясо-пептоний агар (ПС № 3). На рис. 2 представлена лінійна швидкість росту колоній, що виростили з спор протягом 14 днів.

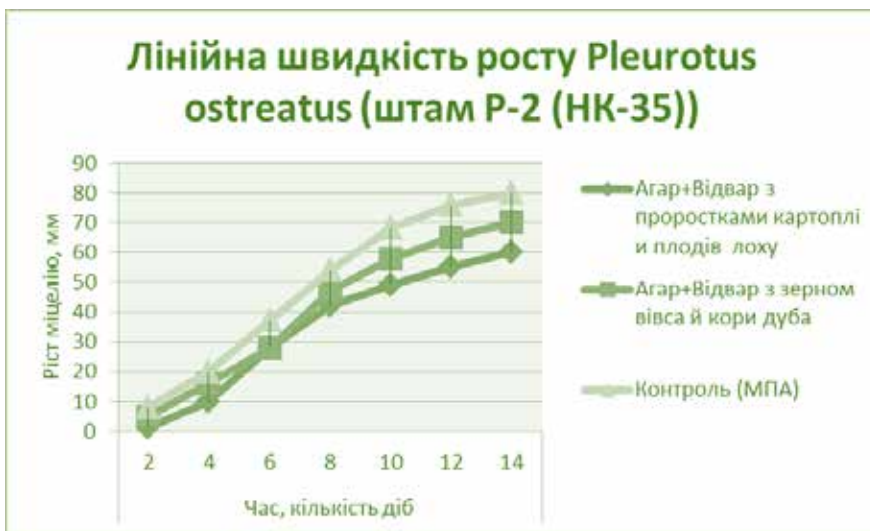


Рис. 1. Лінійна швидкість росту *Pleurotus ostreatus* штаму P-2 (НК-35)

У роботі необхідно було перевірити наявність зв'язку між змінними: розрахунок вибіркового коефіцієнта кореляції. Ми оцінили можливий зв'язок між зазначеними параметрами. Для цього використовували майстер функцій Microsoft Excel. Значення r для ПС № 1 = 0,977536, ПС № 2 = 0,98615, ПС № 3 = 0,985223. Найоптимальнішим був показник 0,98615, близький до 1, що свідчить про наявність тісного лінійного зв'язку між параметрами.

Як наслідок, була побудована діаграма кореляційного поля, де дані експерименту подані у вигляді діаграми розсіювання (кореляційного поля), що ілюструє зв'язок між змінними. Також отримано лінію регресії. У нашому випадку кореляційне поле витягнуте, що свідчить про наявність кореляційного зв'язку між ознаками. Лінія регресії представлена прямою, отже кореляційний зв'язок між озна-

ками лінійний і оцінюється за допомогою вибіркового коефіцієнта кореляції r . Так як коефіцієнт кореляції > 0 , то зв'язок між ознаками X і Y пряма, т. К. $R = 0,98615$ зв'язок сильний (рис. 2).

Результати аналізу лінійної швидкості росту *Pleurotus ostreatus* на досліджуваних і контрольних живильних середовищах, розрахунок коефіцієнта кореляції свідчать: для виділення та вирощування штамів гливи звичайної найбільш придатне середовище з умістом відварів зерен вівса і кори дуба. Воно зарекомендувало себе краще за середовище, яке було взяте за аналог – з відваром паростків картоплі і *Elaeagnus angustifolia* L.

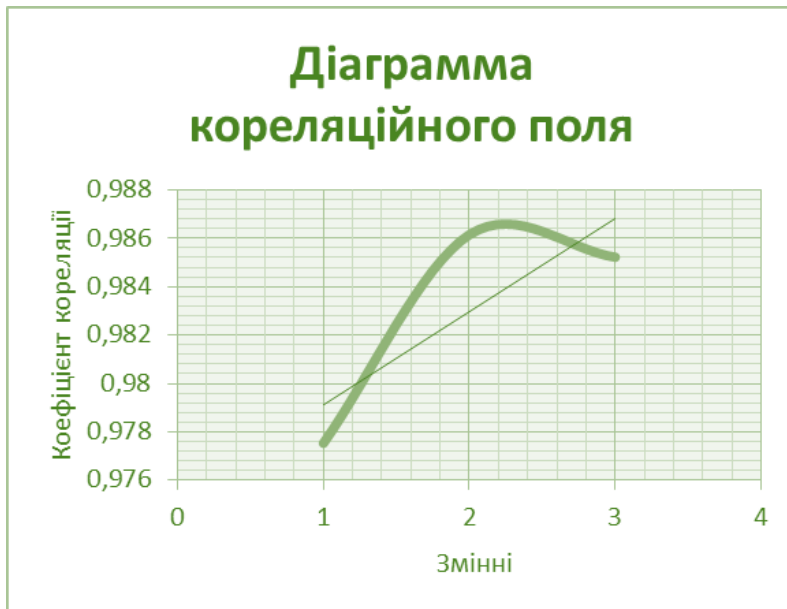


Рис. 2. Діаграма розсіювання (кореляційного поля) за розрахунку лінійної швидкості росту *Pleurotus ostreatus* штаму P-2 (НК-35)

Приклад конкретного приготування середовища. Зерно вівса і кору дуба заливаємо водою у співвідношенні 500 г до 1 л і 300 г до 300 мл відповідно, настоюємо протягом доби. Настой об'єднуємо і відварюємо. Відвар фільтруємо через ватно-марлевий фільтр. До профільтрованого відвару додаємо дистильовану воду до потрібного розведення в залежності від виду гриба і 15 г агару. Плавимо агар при слабкому підігріванні суміші. Отриману живильне середовище розливаємо в чашки Петрі і стерилізуємо в автоклаві при тиску 0,2 МПа і температурі 130 ± 2 °C протягом 40 хв. Після стерилізації чашки Петрі розкладаємо і охолоджуємо. Через три доби контролю стерильності середовища сіємо чисті культури *Pleurotus*. Для посіву беремо зразки міцелію розміром 3x3 мм штаму P-2 (НК-35). Чисті культури, їх пересівання в якості маточного іннокуляту отримуємо на 7–10 добу залежно від ЛСР штаму й швидкості заростання середовища.

Висновки. Таким чином, оптимізоване нами живильне середовище, яка містить відвари зерна вівса і кори дуба придатна для вирощування грибів роду *Pleurotus*, а саме штаму P-2 (НК-35). Розробка живильного середовища на

основі відвару зерен вівса і кори дуба дозволяє проводити його виготовлення безпосередньо в мікологічних лабораторіях і на підприємствах, що займаються грибовництвом.

У наступних наших дослідженнях плануємо не зупинятися на досягнутому, а впровадити результати у наукову та виробничу практику.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Іванова Т.В. Біотехнологія їстівних грибів : монографія. Том 1. Київ : Компринт, 2018. 165 с.
2. Беккер З.Э. Физиология и биохимия грибов. Москва : Изд во МГУ, 1988. 230 с.
3. Sanguinetti M. Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life. *International Journal of Microbiology*. 2015. DOI: 10.1155/2015/376387.
4. Pereima I.V., Ivanova T.V. Stimulation of growth of species of the fungus of the genus *Pleurotus* (Fr.) P. Kumm. at a glucose nutrition. *Biotechnologia Acta*. 2017. No. 10 (6). P. 45–52. DOI: org/10.15407/biotech10.06.045.
5. Бабицкая В.Г., Щерба В.В. *Pleurotus ostreatus* продуцент комплекса биологически активных веществ. *Прикладная биохимия и микробиология*. 1996. Т. 32. № 2. С. 203–210.
6. Іванова Т.В., Ковалишина Г.М. Біотехнології отримання міцелію *Pleurotus ostreatus* на зерні різних сортів пшениці. *Збір. наук. праць «Миронівський вісник»*. 2018. Т. 6. С. 25–30.
7. Бисько Н.А., Билай В.Т., Кравчук С.Б., Алексеева К.Л. Комплексный подход к культивированию вешенки. Киев, 2001. 54 с.
8. Ivanova T. Effects of membranotropic microfertilizers to grow the mycelium of *Lentinula Edodes*. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*. 2019. Vol. 9. № 3 P. 605–609. URL: <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2019/20.9.3.605-609>.
9. Бисько Н.А. Микрофлора субстрата *Pleurotus ostreatus*. *Микология и фитопатология*. 1996. Вып. 5/6. С. 7–12.
10. Беккер М.Е. Введение в биотехнологию. Рига : Пищевая промышленность, 1978. 231 с.
11. Іванова Т.В. Виявлення вірусних хвороб у плодових тілах печериці двоспорової (*Agaricus bisporus* (J. Lge) Imbach). *Наукові доповіді НУБіП України*. 2011. № 1 (23). 12 с.
12. Живильне середовище для грибів роду *Pleurotus* : пат. на корисну модель № 98969 Україна : МПК (2015) A01G 1/04, № 98969 ; заявл. 12.12.14 : опубл. 12.05.15, Бюл. № 9.
13. Поживне середовище для оновлення колекції штамів грибів роду глива : пат. на корисну модель 29744 А України ; заявка № 97041764 від 15.04.97, 6 А01G1/04, С12N1/14.
14. Бисько Н. А., Митропольская Н. Ю. Съедобный лекарственный гриб вешенка обыкновенная. *Экология докілья та безпека життєдіяльності*. 2008. № 3. С. 61–65.
15. Цизь О.М., Іванова Т.В., Патица М.В. Активізація трофічних зв'язків у системі «субстрат-рослина» за дії біопрепаратів при оздоровленні агроценозів. *Таврійський науковий вісник*. 2020. № 112. С. 221–227. URL: <https://doi.org/10.32851/226-0099.2020.112.3>.
16. Ha Thi Hoal. The Effects of Temperature and Nutritional Conditions on Mycelium Growth of Two Oyster Mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*). *Mycobiology*. 2015. V. 43. P. 14–23.