

Рус.УДК 602.6:635.9

*Особенности модификации питательной среды для получения чистой культуры грибов рода *Pleurotus**

Иванова Татьяна Васильевна, Заруцкая Алина Валентиновна, Кузёмко Надежда Александровна, Мамонтова Анна Александровна, Откидач Игорь Сергеевич.

Аннотация:

Изучены новые компоненты питательной среды для получения большей биомассы чистой культуры высших базидиомицетов рода *Pleurotus* – перспективных продуцентов физиологически активных веществ.

Ключевые слова: питательная среда, чистая культура, грибы рода *Pleurotus*, мицелий, биомасса.

Eng.: *Modification of the nutrient medium to produce a pure culture of mushrooms of genus *Pleurotus*.*

Ivanova Tatyana Vasil'evna, Zarutskaya Alina Valentinovna, Kuz'omko Nadezhda Aleksandrovna, Mamontova Anna Aleksandrovna, Otkidach Igor Sergeevich.

Abstract:

We investigated creation of the nutrient medium for extracting a pure culture of Basidiomycetes of genus *Pleurotus* – perspective producers of physiologically active substances.

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

Введение

Мицелий грибов – это посадочный материал грибов, вегетативное тело которого состоит из тонких ветвящихся нитей (гифов), стерильно выращенных на различных носителях и предназначенных для посадки в подготовленный субстрат для получения урожая грибов.

Существует большое количество культурных штаммов, которые отличаются друг от друга внешним видом, урожайностью, количеством удаления спор и требованиями к условиям выращивания.

Штамм грибов (нем. Stamm – ствол, основа) – чистая культура, выделенная из определенного источника или полученная в результате мутации или селекции. Современные штаммы характеризуются высокой однородностью и качеством грибов, высокой урожайностью в сочетании с коротким циклом колонизации субстрата и плодоношения.

В украинском производстве лучше всего себя зарекомендовал штамм вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*) НК-35.

НК-35 – это гибридный штамм, является одним из самых популярных при выращивании вешенки (рис.1). Данные о происхождении и развитии штамма приведены в табл.1, 2 [4,6,10,11,14,15].

Паспорт штамма вешенки Р-2 (НК-35)

Таблица 1

Штамм	Штамм	Происхождение штамма вешенки	Температура плодоношения, °С	Цвет плодового тела гриба
Р-2	НК-35	Венгрия	5-22 (opt 14-16)	серый



Рис. 1. Внешний вид плодового тела вешенки обыкновенной, штамм Р-2 (НК-35). Автор фото: И.С. Откидач

Таблица 2

Параметры роста и развития штамма вешенки Р-2 (НК-35):

Разрастание мицелия вешенки	
Температура	22°С в помещении (в блоке 24-28°С)
Относительная влажность	60-65%
Продолжительность обрастания	14-16 дней
CO ₂	5000-20 000 ppm
Воздухообмен	Нет
Освещение	Нет
Развитие плодовых тел вешенки	
Температура	5-22°С (opt 14-16°С)

Относительная влажность	80-85 %
Продолжительность	4-7 дней
CO ₂	<1000 ppm
Воздухообмен	4-8 объемов в час
Освещение	1000-5000 (2000) lux

Питательные среды

Основой создания питательных сред для приготовления культур тканей являются смеси минеральных солей и, так как питание культивируемых тканей является гетеротрофным, источник углерода вводят в состав среды в виде сахарозы или глюкозы.

Кроме углерода, кислорода и водорода, для роста тканей необходимы азот в виде азотной или аммонийной соли, фосфор в виде фосфата, сера в виде сульфата. Общая концентрация минеральных элементов наиболее высокая в среде МПА.

Углеводное питание. В большинстве сред источником углерода и энергии является сахароза или глюкоза в концентрации 20—40 г/л.

pH среды. В нативных условиях клетка функционирует в узких пределах колебаний концентрации водородных ионов. Относительная стабильность величины pH внутри клетки и среды, ее окружающей, поддерживается буферными системами, в которых важную роль играют белковые молекулы, такие как амфолиты. Относительно стабильное pH в среде поддерживается за счет хелатирующих реагентов или соответствующих соединений. Большинство стационарных изолированных культур грибов растет на средах с pH 7—7,8 [4,6,10,11,14,15].

Материалы и методы

Выбор исходного материала

Исследования проводили в течение 2013—2015 гг. на кафедре экобиотехнологии и биоразнообразия Национального университета биоресурсов и природопользования Украины, г. Киев. Посевной материал вешенки представлен штаммом НК35. Мицелий белого цвета, с характерным запахом. Плодовое тело среднего размера (50—80 мм), шляпка с вогнутыми ровными краями. Окраска – от тёмно-серой до светло-серой, в зависимости от температуры культивирования, при естественном освещении – серо-коричневая или коричневая. Чем ниже температура в камере, тем темнее окраска. Размер шляпок варьирует от 50 до 120 мм в диаметре. Грибы имеют мясистую текстуру, особенно при низкой температуре, хорошо хранятся и транспортируются. Исследования проводились по следующей схеме (рис. 2).



Рис. 2. Схема исследования

Получение чистой культуры грибов. Для получения чистой культуры вешенки обыкновенной используют следующие среды: мясо-пептонный агар, картофельно-глюкозный агар, агаризированную среду на отварах проростков картофеля и лоха узколистного.

Плодовые тела гриба выбирают в период созревания. Их отбирают с плодовых тел по показателям, которые отвечают штамму. Споры высевают в чашки Петри. После прорастания спор и полного обрастания среды маточную культуру сохраняют в холодильной камере при температуре 0—2° С [4,7,10,15]. Введение в чистую культуру проводят по общепринятым методикам [6].

Нами исследована линейная скорость роста грибов (ЛСР) [15]. Для эксперимента по оценке скорости роста *Pleurotus ostreatus* суспензию грибов (в соотношении 1:2) размещали на исследуемые питательные среды. Затем каплю суспензии спор грибов (0,01 мл) наносили в центр чашки Петри на среду контроль (МПА). Чашки инкубировали в термостате при (27 ± 2) °С при влажности 90 %. Рост колонии оценивали измерением ее диаметра в двух перпендикулярных направлениях через каждые двое суток в течение двух недель. На основании полученных данных составляли графики зависимости скорости роста исследуемых культур от времени.

Результаты исследований и их обсуждение

Ближайшим аналогом модифицированной среды является питательная среда для работы с чистыми культурами высших базидиомицетов – объектов промышленного выращивания. Она предусматривает следующие этапы ее получения: этиолизированные картофельные проростки в количестве 250 г отвариваются на медленном огне в конической колбе, содержащей 500 мл воды. По истечении 15—20 мин отвар фильтруют через ватно-марлевый фильтр на стеклянной воронке, объем фильтрата доводят до 500 мл. Воздушно-сухие плоды лоха узколистного (*Elaeagnus angustifolia*) в

количестве 50 г отвариваются в другой колбе в 500 мл воды в течение того же времени. Декокт фильтруют на стеклянной воронке через ватно-марлевый фильтр. Отвары проростков картофеля и лоха узколистного объединяют, добавляют 20 г агар-агара, доводят объем фильтрата до 1000 мл и плавят агар на медленном огне. Готовую среду разливают в пробирки размером 20x200 мм, автоклавируют при давлении 1,5 атм в течение 1 часа и заливают на скошенный агар [15,16]. Через 3 суток (контроль стерильности среды) скошенный агар засевают чистыми культурами штаммов грибов рода *Pleurotus*. Инкубация длилась в течение суток в термостате при $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ [14]. Чистые культуры получают на 7—8 сутки.

В основу исследования поставлена задача модификации питательной среды для высших базидиомицетов – перспективных продуцентов физиологически активных веществ. Методом экспериментальных исследований нами выявлено, что она не обеспечивает достаточной скорости роста мицелия и необходимого урожая биомассы в сравнении с исследуемой субстанцией. К недостаткам относится также и отсутствие данных о содержании сахаристых и белковых веществ – главных источников углеродного и азотного питания макромицетов.

Поставленная задача решается тем, что питательная среда для чистых культур высших базидиомицетов, которая содержит агар-агар и воду дополнительно содержит отвары зерна овса и коры дуба в следующем соотношении компонентов на 1 л: агар-агар 15 г, отвары зерна овса 600 мл, коры дуба 250 мл, остальное – дистиллированная вода.

Варианты опыта проводились согласно методик в трёх повторностях.

Экспериментальные данные по линейной скорости роста штаммов съедобных грибов Р-2 (НК-35) вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*) были получены на следующих питательных средах (ПС): среда с отварами проростков картофеля и лоха узколистного (ПС №1), модифицированная среда с отварами зерна овса и коры дуба (ПС №2), в качестве контроля – мясо-пептонный агар (ПС №3)(табл.3).

Таблица 3

**Динамика роста мицелия штамма P-2 (НК-35)
вешенки обыкновенной**

Показатели	Название питательной среды						
Агар+Отвар с проростков картофеля и плодов лоха							
Время, сутки	2	4	6	8	10	12	14
Рост мицелия, мм	1	10	28	42	49	55	60
Агар+Отвар с зерна овса и коры дуба							
Время, сутки	2	4	6	8	10	12	14
Рост мицелия, мм	5	16	28	47	58	65	70
Контроль (мясо-пептонный агар) (ПС №3)							
Время, сутки	2	4	6	8	10	12	14
Рост мицелия, мм	8	20	37	54	68	76	80

На рис. 3 представлена линейная скорость роста колоний, выросших из спор в течение 14 дней.

В работе необходимо было проверить наличие связи между переменными: расчет выборочного коэффициента корреляции. Мы оценили возможную связь между указанными параметрами. Для этого использовали мастер функций Microsoft Excel. Значение r для ПС №1 = 0,977536, ПС №2 = 0,98615, ПС №3 = 0,985223. Самый оптимальный показатель 0,98615 близок к 1, что говорит о наличии тесной линейной связи между параметрами.

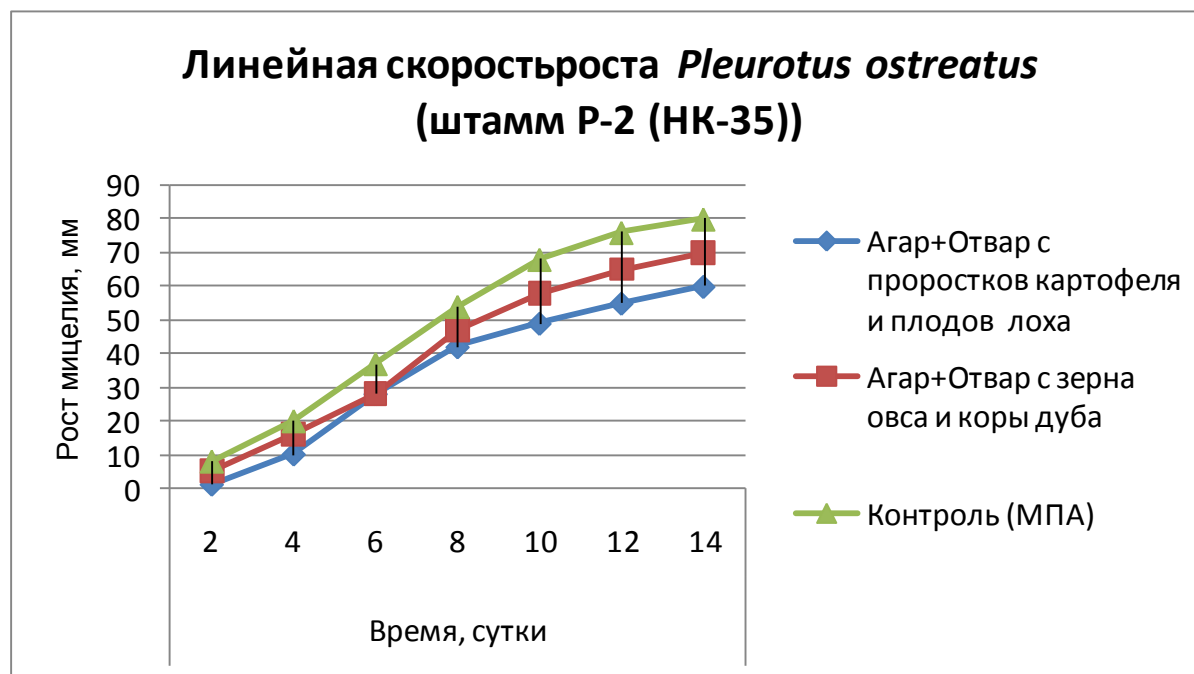


Рис. 3. Линейная скорость роста *Pleurotus ostreatus* штамма P-2 (НК-35)

Как следствие мы построили диаграмму корреляционного поля, представив данные эксперимента в виде диаграммы рассеяния (корреляционного поля), иллюстрирующей связь между переменными. Также получили линию регрессии. В нашем случае корреляционное поле вытянуто, это значит, что корреляционная связь между признаками есть. Линия регрессии представлена прямой, значит корреляционная связь между признаками линейная и оценивается с помощью выборочного коэффициента корреляции r . Так как коэффициент корреляции >0 , то связь между признаками X и Y прямая, т. к. $r = 0,98615$ – связь сильная (рис. 4).



Рис. 4. Диаграмма рассеяния (корреляционного поля)

Результаты анализа линейной скорости роста *Pleurotus ostreatus* на опытных и контрольной питательных средах, расчет коэффициента корреляции свидетельствуют: для выделения и выращивания штаммов вешенки обыкновенной наиболее пригодна среда с содержанием отваров зерен овса и коры дуба. Она показала себя лучше среды, которую приняли за аналог – с отваром ростков картофеля и лоха узколистного.

Пример конкретного приготовления среды. Зерно овса и кору дуба заливаем водой в соотношении 500 г до 1 л и 300 г до 300 мл соответственно, настаиваем в течение суток. Настои объединяем и отвариваем. Отвар фильтруем через ватно-марлевый фильтр. К фильтрованному отвару добавляем дистиллированную воду до нужного разведения, в зависимости от вида гриба, и 15 г агара. Плавим агар при слабом подогреве смеси. Полученную питательную среду разливаем в чашки Петри и стерилизуем в автоклаве при давлении 0,2 МПа и температуре 130 ± 2 °С в течение 40 мин. После стерилизации чашки Петри раскладываем и охлаждаем. Через трое суток контроля стерильности среды сеем чистые культуры *Pleurotus*. Для посева берем образцы мицелия

размером 3x3 мм штамма Р-2 (НК-35). Чистые культуры, их пересев в качестве маточного инокулята получаем на 7—10 сутки, в зависимости от ЛСР штамма и скорости зарастания среды.

Таким образом, оптимизированная нами питательная среда, которая содержит отвары зерна овса и коры дуба пригодна для выращивания грибов рода *Pleurotus*, а именно штамма Р-2 (НК-35). Разработка питательной среды на основе отвара зерен овса и коры дуба позволяет проводить её изготовление непосредственно в микологических лабораториях и грибоводческих предприятиях.

Литература

- 1.Алексеева, К.Л. Культивируемые грибы. Научно- производственный справочник / К.Л.Алексеева // Изд-во Рос. Сельхоз. Академии. – М.: РАСХН, 2000. – 223 с.
- 2.Бабицкая, В.Г. *Pleurotus ostreatus* продуцент комплекса биологически активных веществ / В.Г.Бабицкая, В.В.Щерба // Прикладная биохимия и микробиология. М.: – 1996. Т.32. – №2. – С. 203 – 210.
- 3.П.Баранова, С.В. Производство коммерческого мицелия съедобных грибов на виноградной выжимке / С.В.Баранова, Т.К.Скорикова, и др// Изд-во «Путь», 1991.
- 4.Белицкий, И.В. Посевной мицелий съедобных и лекарственных ксилотрофных грибов: технологии выращивания и критерии качества / И.В.Белицкий, Л.М.Краснопольская // Гавриш. 2000. – №3. – С. 11.
- 5.Беккер З.Э. Физиология и биохимия грибов //М.: Изд во МГУ. 1988. 230 с.
- 6.Беккер М.Е. Введение в биотехнологию - Рига: Пищевая промышленность, 1978 - 231 с.
- 7.Билай, В.И. Методы экспериментальной микологии / В.И.Билай // Киев.: Наукова думка. 1982. 551 с.
- 8.Бисько, Н.А. Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубинной культуре. /Н.А. Бисько и др. // Киев.: Наукова думка. 1983. – 312с.
- 9.Бисько, Н.А.Биология и культивирование съедобных грибов./Н.А. Бисько, Н.А. Дудка // Киев.: Наукова думка. 1987. – 148 с.
- 10.Бисько, Н.А. Комплексный подход к культивированию вешенки / Н.А.Бисько, В.Т. Билай, С.Б.Кравчук, К.Л.Алексеева //Киев. 2001. – 54с.
- 11.Бисько Н.А. Микрофлора субстрата *Pleurotus ostreatus* / Н.А. Бисько // Микология и фитопатология. 1996. Е. 30. – вып. — 5/6. С. 7–12.

12. Бухало, А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре / А.С. Бухало // Киев. 1988. – 144 с.
13. Морозов, А.И. Разведение грибов. Мицелий / А.И. Морозов // АСТ. 2007. 43 с.
14. Дудка И.А., Бисько Н.А., Билай В.Г. Культивирование съедобных грибов. - К.: Урожай, 1992. - 160с.
15. Патент 29725 А Украины. Питательная среда для работы с чистыми культурами высших базидиомицетов – объектов промышленного выращивания / Сычев П.А., Негруцкая С.Ф., Ткаченко Н.П., Тимофеев А.А., Калиберда Г.В. Заявка №97020763 от 21.02.97, 6 А01G1/04, С12N1/14.
16. Патент 29744 А Украины. Питательная среда для обновления коллекции штаммов грибов рода вешенка / Сычев П.А., Тимофеев А.А., Калиберда Г.В., Гарджала Л.И., Загуменный Р.А. Заявка №97041764 от 15.04.97, 6 А01G1/04, С12N1/14.

Literature

1. Alekseyeva, K.L. Kul'tiviruyemyye griby. Nauchno- proizvodstvennyy spravochnik / K.L.Alekseyeva // Izd-vo Ros. Sel'khoz. Akademii. - M .: RASKHN, 2000. - 223 s.
2. Babitskaya, V.G. Voshenka obyknovennaya produtsent kompleksa biologicheski aktivnykh veshchestv / V.G.Babitskaya, V.V.Shcherba // Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya. M .: - 1996. T.32. - №2. - S. 203 - 210.
3. P.Baranova, TSB Proizvodstvo kommercheskogo mitseliya s'yedobnykh gribov na vinogradnoy vyzhimke / S.V.Baranova, T.K.Skorikova, i dr // Izd-vo «Put'», 1991.
4. Belitskiy, I.V. Posevnoy mitseliy s'yedobnykh i lekarstvennykh ksilotrofnykh gribov: tekhnologii vyrashchivaniya i kriterii kachestva / I.V.Belitskiy, L.M.Krasnopol'skaya // Gavrish. 2000 - №3. - S. 11.
5. Bekker Z.E. Fiziologiya i biokhimiya gribov // M .: Izd-vo MGU. 1988. 230 s.
6. Bilay, V.I. Metody eksperimental'noy mikologii / V.I.Bilay // Kiyev .: Naukova dumka. 1982. 551 s.
7. Bis'ko, N.A. Vysshiye s'yedobnyye bazidiomitsety v poverkhnolstnoy i glubinnoy kul'ture. /N.A. Bis'ko i dr. // Kiyev .: Naukova dumka. 1983 - 312s.
8. Bis'ko, N.A. Biologiya i kul'tivirovaniye s'yedobnykh gribov. / N.A. Bis'ko, N.A. Dudka // Kiyev .: Naukova dumka. 1987. - 148 s.

9. Bis'ko, H.A. Kompleksnyy podkhod k kul'tivirovaniyu veshenki / N.A.Bis'ko, V.T. Bilay, S.B.Kravchuk, K.L.Alekseyeva // Kiyev. 2001 -54s.
10. Bis'ko H.A. Mikroflora substrata veshenki OSTREATUS / HA Bis'ko // Mikologiya i fitopatologiya. 1996 Ye. 30. - vyp. - 5/6. S. 7-12.
11. Bukhalo, AC Vysshiye s"yedobnyye bazidiomitsety v chistoy kul'ture / peremennogo toka Bukhalo // Kiyev. 1988. - 144 s.
12. Morozov, A.I. Razvedeniye gribov. Mitseliy / A.I. Morozov // AKT. 2007. 43 s.
13. Dudka I.A., Bis'ko N.A., Bilay V.G. Kul'tivirovaniye s"yedobnykh gribov. - K. : Urozhay, 1992. - 160s.
14. Patent 29725 A Ukrainy. Pitatel'naya sreda dlya raboty s chistymi kul'turami vysshikh bazidiomitsetov - ob"yektov promyshlennogo vyrashchivaniya / Sychev P.A., Negrutskaya S.F., Tkachenko N.P., Timofeyev A.A., Kaliberda G.V. Zayavka №97020763 ot 21.02.97, 6 A01G1 / 04, C12N1 / 14.
15. Patent 29744 A Ukrainy. Pitatel'naya sreda dlya obnovleniya kollekcii shtammov gribov roda veshenka / Sychev P.A., Timofeyev A.A., Kaliberda G.V., Gardzhala L.I., Zagumenny R.A. Zayavka №97041764 ot 15.04.97, 6 A01G1 / 04, C12N1 / 14.
16. Semenov S.M. Laboratornyye sredy dlya aktinomitsetov i gribov. Spravochnik - M. : Agropromizdat, 1990. - 240s.