ВИВЧЕННЯ РОСТОВИХ ТА МОРФОЛОГІЧНИХ ПАРАМЕТРІВ МІЦЕЛІЮ *PLEUROTUS OSTREATUS* (JACQ.) P. KUMM. ЗА ДІЇ LED-ЛАЗЕРІВ

Решетник К.С., Юськов Д.С., Сімонян Р.В.

Донецький національний університет імені Василя Стуса
вул. 600-річчя, 21, 21021, м. Вінниця
k.reshetnyk@donnu.edu.ua

У статті представлено результати вивчення ростових та морфологічних параметрів міцелію *Pleurotus ostreatus* за поверхневого культивування на агаризованому живильному середовищі за дії лазерного опромінення в умовах різних енергетичних доз опромінення (25,05–102,5 мДж/см²). Вивчення швидкості росту вегетативного міцелію штамів P-191, P-192, P-6v, P-154, P-155, P-108 гриба *P. ostreatus* проводили на картопляно-глюкозному агарі (КГА). Для вивчення впливу лазерного опромінення на ріст досліджених штамів вегетативний міцелій культивували протягом семи діб на агаризованому середовищі (КГА) у стандартних чашках Петрі (діаметром 9 см). Для лазерного опромінення вегетативного міцелію використовували пристрій, який був сконструйований співробітниками кафедри ботаніки та екології Донецького національного університету імені Василя Стуса. У дослідженнях як джерело світла використовували LED-лазери: BRP–3010–5 із випромінюванням червоного спектра з довжиною хвилі 635 нм; BBP–3010–5 із випромінюванням синього спектра з довжиною хвилі 405 нм та BGP–3010–5 із випромінюванням зеленого спектра з довжиною хвилі 532 нм, на основі яких і працює пристрій. Показано, що максимальна швидкість радіального росту штамів *P. ostreatus* спостерігалася за дії лазерного опромінення довжиною хвилі 532 нм, при цьому найефективнішою була енергетична доза опромінення 51,1 мДж/см². Опромінення міцелію тривалістю 5 с, 15 с та 20 с світлом довжиною хвилі 405 нм, 532 нм та 635 нм з енергією опромінення 25,05, 77,3 та 102,5 мДж/см² не чинило суттєвого впливу на швидкість радіального росту всіх досліджених штамів *P. ostreatus*. Визначено, що опромінення світлом довжиною хвилі 405 нм, 532 нм та 635 нм міцелію штамів *P. ostreatus* не впливало на основні морфологічні характеристики колоній на картопляно-глюкозному агаризованому середовищі. **Ключові слова:** фотоактивація, швидкість росту, поверхневе культивування, *Pleurotus ostreatus*.

Study of growth and morphological parameters of mycelium *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. under the action of LED lasers. Reshetnyk K., Yuskov D., Simonyan R.

The article presents the results of studying the growth and morphological parameters of the mycelium of *Pleurotus ostreatus* during surface cultivation on agar nutrient medium under the action of laser irradiation at different energy doses (25.05–102.5 mJ/cm²). The study of the growth rate of vegetative mycelium of strains P-191, P-192, P-6v, P-154, P-155, P-108 of the fungus *P. ostreatus* was performed on potato-glucose agar (PGA). To study the effect of laser irradiation on the growth of the studied strains, vegetative mycelium was cultured for 7 days on agar medium (PGA) in standard Petri dishes (diameter 9 cm). A device designed by the staff of the Department of Botany and Ecology of Vasyl Stus Donetsk National University was used for laser irradiation of the vegetative mycelium. In the studies, LED lasers were used as a light source: BRP – 3010–5, with red spectrum radiation with a wavelength of 635 nm; BBP-3010-5 with blue spectrum radiation with a wavelength of 405 nm and BGP-3010-5 with green spectrum radiation with a wavelength of 532 nm, on the basis of which the device works. It is shown that the maximum rate of radial growth of *P. ostreatus* strains was observed under the action of laser irradiation with a wavelength of 532 nm, with the most effective energy dose being 51.1 mJ/cm². Irradiation of the mycelium for 5 s, 15 s and 20 s with light wavelengths of 405 nm, 532 nm and 635 nm with an irradiation energy of 25.05, 77.3 and 102.5 mJ/cm² did not significantly affect the radial growth rate of all studied strains *P. ostreatus*. It was determined that irradiation with light of 405 nm, 532 nm and 635 nm mycelium of *P. ostreatus* strains did not affect the main morphological characteristics of colonies on potato-glucose agar medium. **Key words:** photoactivation, growth rate, surface cultivation, *Pleurotus ostreatus*.

Актуальність дослідження. Сьогодні активно зросли дослідження базидієвих грибів з огляду на досить широке їх використання, зокрема для виробництва продуктів харчування, ферментів, харчових добавок та фармацевтичних речовин [1; 2]. Відомо, що з грибів отримують багато біологічно активних сполук з унікальними властивостями. Серед них багато сполук, що знижують холестерин, мають антидіабетичні та імуномодуючі й інші властивості. Деякі із цих речовин мають не лише фармацевтичні властивості, а й є новим класом харчових добавок або харчових препаратів. Найважливіші фармацевтичні препарати з лікарських грибів вклю-

чають полісахариди, речовини з антиоксидантними властивостями та лектини [3; 1; 4]. Окрім того, останнім часом спостерігається значний інтерес до використання грибів або грибних екстрактів як дієтичних добавок. Відомо, що у плодових тілах *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. міститься багато біологічно активних речовин, які здатні попереджати і лікувати широкий спектр захворювань. Зокрема, дослідження показали, що високий уміст чистого протеїну (до 47,7%) у плодових тілах *P. ostreatus* сприяє запобіганню та лікуванню гепатиту, виразки шлунка, знижує кількість холестерину в крові, допомагає нормалізувати тиск як у гіпертоніків, так

і у гіпотоніків, надає протипухлинну дію, підвищує імунну стійкість організму [5].

Мета роботи – дослідити швидкість радіального росту та морфологічні особливості міцелію штамів базидієвого гриба *Pleurotus ostreatus* за дії лазерного опромінення різною довжиною хвилі.

Зв'язок авторського доробку з важливими науковими та практичними завданнями. Дослідження виконано в рамках НДР «Розроблення способів підвищення продуктивності рослин і грибів за допомогою LED-лазерних систем» за номером Державної реєстрації 0120U102962. Тематика дослідження є одним з основних наукових напрямів діяльності кафедри ботаніки та екології Донецького національного університету імені Василя Стуса.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Сьогодні відомий вплив низькоінтенсивного світла на лінійний ріст та накопичення біомаси різними видами грибів: *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach, *Ganoderma lucidium* (Curtis) P. Karst, *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers., *Inonotus obliquus* (Fr.) Pilat, *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler [6; 7]. Досліджено позитивний вплив опромінення на врожайність гриба *P. ostreatus* [8]. Також було встановлено, що лазерне опромінення в дозах 45–230 мДж/см² стимулює проростання спор та ріст міцелію у *H. erinaceus* [9]. За даними Н.Л. Поєдинок, базидієві гриби на різних стадіях онтогенезу є чутливими до червоного (625 та 632,8 нм), синього (463 та 488 нм) та зеленого (522 та 514,5 нм) світла низької інтенсивності у види-

мому діапазоні довжини хвиль із різними спектральними та енергетичними характеристиками [8]. Окрім того, досліджено, що зміни ростової активності спор і вегетативного міцелію грибів, які викликані короткочасним опромінюванням світлом низької інтенсивності, передаються на наступні фази онтогенезу і не потребують подальшої активізації світлом [8]. Дані літератури вказують на те, що фоторецепторна система грибів адаптована до світла в діапазоні довжин хвиль від 350 до 730 нм [10]. Причому вплив світла на розвиток грибів визначається як видовою, так і штамовою приналежністю [11].

Новизна. Уперше досліджено ростові параметри та морфологічні особливості шести штамів гриба *Pleurotus ostreatus* за дії лазерного опромінення в умовах різних енергетичних доз опромінення (25,05–102,5 мДж/см²).

Методика досліджень. Вивчення швидкості росту вегетативного міцелію штамів P-191, P-192, P-6v, P-154, P-155, P-108 гриба *Pleurotus ostreatus* проводили на картопляно-глюкозному агарі (КГА). Культивування проводили за температури 26±2°C у термостаті. Диски міцелію діаметром 5 мм вирізали стерильною сталевією трубкою на відстані 8–10 мм від краю активного росту колонії та поміщали у центр чашки Петрі діаметром 90 мм. Радіуси колоній вимірювали в чотирьох взаємно перпендикулярних напрямках на 2, 4, 6, 8, 10 та 12-ту добу культивування. Для розрахунку швидкості радіального росту (V_R , мм/доба) будували криві залежності

Рис. 1. Пристрій для опромінення міцелію монохроматичним світлом за допомогою LED-лазерів

1 – платформа для кріплення пристрою, 2 – електродвигун, 3 – електродвигун 2, 4 – захисна кришка для дзеркальної призми, 5 – дзеркальна призма, 6 – транспортерна стрічка, 7 – бункер для опромінених об'єктів, 8 – валик, який рухає транспортерну стрічку, 9 – платформа для опромінених об'єктів, 10 – штатив для кріплення LED-лазерів, 11 – LED-лазер BGP-3010-5 із випромінюванням зеленого спектру з довжиною хвилі 532 нм, 12 – LED-лазер BBP-3010-5 із випромінюванням синього спектру з довжиною хвилі 405 нм, 13 – LED-лазер BRP-3010-5 із випромінюванням червоного спектру з довжиною хвилі 635 нм, 14 – панель управління

радіуса міцеліальної колонії від часу культивування. У фазі лінійної залежності приросту радіуса від часу визначали швидкість росту за формулою:

$$V_R = \frac{R_1 - R_0}{t_1 - t_0}$$

де R_1 – радіус колонії в кінці фази лінійного росту, R_0 – радіус колонії на початок фази лінійного росту, $t_1 - t_0$ – тривалість лінійної фази росту (доба) [12; 13].

Спостереження за ростом колоній припиняли після повного заростання чашки Петрі міцелієм. Дослідження культурально-морфологічних характеристик колоній проводили кожні два-три дні культивування впродовж 12 діб [14]. Морфологічна характеристика колоній охоплювала опис текстури, забарвлення, щільності, зональності, реверзumu краю колонії та його зовнішньої лінії [15; 16].

Для вивчення впливу лазерного опромінення на ріст досліджених штамів гриба вегетативний міцелій культивували протягом семи діб на агаризованому середовищі (КГА) у стандартних чашках Петрі (діаметром 9 см). Для лазерного опромінення вегетативного міцелію використовували пристрій, який був сконструйований співробітниками кафедри ботаніки та екології ДонНУ імені Василя Стуса. Пристрій складається з восьмигранної дзеркальної призми, що сприймає промінь LED-лазерів: BRP-3010-5 із випромінюванням червоного спектра з довжиною хвилі 635 нм; BBP-3010-5 із випромінюванням синього спектра з довжиною хвилі 405 нм та BGP-3010-5 із випромінюванням зеленого спектра з довжиною хвилі 532 нм (виробник лазерів BOB LASER Co., Китай) і відбиває його на транспортерну стрічку, на якій розміщується чашка Петрі з міцелієм. Потужність кожного лазера становить 100 мВт (рис. 1). Міцелій опромінювали у такий спосіб: відкрита чашка Петрі з міцелієм рухається на

транспортерній стрічці під променем світла з установленою довжиною хвилі: 635, 405 та 532 нм, отримуючи необхідну енергетичну дозу опромінення (25,05–102,5 мДж/см²) залежно від мети нашого дослідження. Опромінення міцелію тривало 5 с (тривалість руху чашки транспортерною стрічкою становила 90 с), 10 с (тривалість руху чашки транспортерною стрічкою становила 180 с), 15 с (тривалість руху чашки транспортерною стрічкою становила 270 с) та 20 с (тривалість руху чашки транспортерною стрічкою становила 360 с). Потім за допомогою стерильної сталеві трубки з колонії міцелію вирізали міцеліальні диски діаметром 5 мм та здійснювали інокуляцію на живильне середовище відповідного складу. Для інокуляції контрольних чашок Петрі застосовували неопромінену культуру.

Опромінення міцелію проводилося у таких режимах (табл. 1).

Статистична обробка проводилася за допомогою пакетів статистичних програм [17]. Повторюваність дослідів трикратна.

Виклад основного матеріалу. Аналіз результатів наших досліджень для штамів гриба *P. ostreatus* показує, що швидкість росту міцелію, який не було опромінено (контроль), для всіх досліджених нами штамів становила $4,2 \pm 0,49$ – $6,6 \pm 0,61$ мм/добу (рис. 2). Ураховуючи загальноприйняті критерії, які використовують під час розгляду життєвих стратегій міцеліальних грибів [18], та дані літератури [13], більшість із наших культур належить до групи штамів, що ростуть із середньою швидкістю росту. Для всіх досліджених штамів *P. ostreatus* нами була встановлена закономірність щодо чутливості міцелію до дії опромінення зеленим, червоним та синім світлом протягом 10 с (енергетична доза опромінення – 51,1 мДж/см²). Було показано, що швидкість раді-

Таблиця 1

Режими опромінення міцелію досліджених видів грибів

Варіант опромінення	Тривалість опромінення, с			Енергетична доза опромінення, мДж/см ²
	Червоне світло (635 нм)	Синє світло (405 нм)	Зелене світло (532 нм)	
1 (контроль)	0	0	0	0
1	2	3	4	5
2	5	0	0	25,05
3	0	5	0	25,05
4	0	0	5	25,05
5	10	0	0	51,1
6	0	10	0	51,1
7	0	0	10	51,1
8	15	0	0	77,3
9	0	15	0	77,3
10	0	0	15	77,3
11	20	0	0	102,5
12	0	20	0	102,5
13	0	0	20	102,5

ального росту міцелію за дії зеленого світла для всіх штамів гриба *P. ostreatus* (окрім штаму Р-192) зростала в межах від $44 \pm 3,1\%$ до $47,9 \pm 2,8\%$, відповідно, у межах статистичної похибки можна констатувати, що реакція штамів була однаковою. Винятком був штаму Р-192, швидкість росту якого збільшилася лише на $27,7 \pm 2,4\%$ порівняно з контролем. Дія опромінення червоним світлом збільшувала швидкість росту для всіх досліджених штамів *P. ostreatus*

в межах від $12,9 \pm 3\%$ до $20 \pm 3,1\%$, а для штаму Р-6v цей показник збільшився на $27 \pm 2,8\%$. Опромінення світлом довжиною хвилі 405 нм протягом 10 с викликало зростання швидкості росту міцелію для всіх досліджених штамів цього виду в межах від $7,4 \pm 2\%$ до $14,5 \pm 2,3\%$ відповідно (рис. 2).

Опромінення міцелію тривалістю 5 с, 15 с та 20 с світлом довжиною хвилі 405 нм, 532 нм та 635 нм з енергією опромінення 25,05, 77,3 та 102,5 мДж/см²

штам Р-192

штам Р-6v

штам Р-191

штам Р-154

штам Р-155

штам Р-108

Рис. 2. Вплив лазерного опромінення на швидкість радіального росту міцелію штамів гриба *Pleurotus ostreatus* на картопляно-глюкозному живильному середовищі:

■ без опромінення; ■ 405 нм; ■ 532 нм; ■ 635 нм

* – $P < 0,05$, порівняно з контролем

Рис. 3. Колонії гриба *Pleurotus ostreatus* штам Р-6v на агаризованому живильному середовищі (КГА) (12 доба культивування) за дії лазерного опромінення

Контроль (без опромінення)

Продовження рис. 3. Колонії гриба *Pleurotus ostreatus* штам Р-6в на агаризованому живильному середовищі (КГА) (12 доба культивування) за дії лазерного опромінення

не чинило суттєвого впливу на швидкість радіального росту усіх досліджених штамів *P. ostreatus* (рис. 2).

Результати дослідження морфології міцеліальних культур *P. ostreatus* показали, що всі досліджувані штами гриба утворювали пухнасті, ватно-шерстисті, щільні колонії білого кольору, край колонії дещо піднятий, реверзум збігається з кольором середовища. Навколо інокуляма колоній утворювалася зона менш щільного міцелію різного радіусу (8–20 мм), щільно притиснутого до субстрату. Зональність або слабо виражена, або взагалі відсутня. Морфологічні особливості міцеліальних колоній штамів *P. ostreatus* на агаризованому живильному середовищі (КГА) за дії лазерного опромінення були характерні для морфології колоній міцелію цього виду гриба, відмінностей у відомих морфологічних характеристиках колоній *P. ostreatus* [14] за дії лазерного опромінення нами не було виявлено (рис. 3).

Згідно з дослідженнями Н.Л. Поєдинок, опромінення когерентним світлом довжиною хвилі 632,5 нм збільшувало швидкість росту моноспорових ізолятів *P. ostreatus* майже на 180%, під час культивування на агаризованому пивному суслі (7° за Баллінгом) опромінення некогерентним світлом дов-

жиною хвилі 625 нм сприяло пришвидшенню росту міцелію майже на 60%, а опромінення світлом когерентним (488 нм) та некогерентним (463 нм) сприяло поліпшенню росту міцелію моноспорових ізолятів у межах 20%, при цьому була використана енергія опромінення 230 мДж/см² [8]. Порівнюючи отримані нами результати з результатами Н.Л. Поєдинок, можна припустити, що міцелій *P. ostreatus* чутливий саме до довжини хвилі когерентного світла 632,5 нм, оскільки наші дані (використана нами довжина хвилі світла 635 нм) значно менші (збільшення на 12,9–27% порівняно з контролем). Окрім того, нами було вперше виявлено реакцію міцелію штамів *P. ostreatus* на когерентне зелене світло довжиною хвилі 532 нм (енергетична доза опромінення – 51,1 мДж/см²): швидкість росту міцелію зросла на 47,9% відповідно до контролю. Отримані нами результати дослідження щодо впливу лазерного опромінення можна пояснити з погляду теорії про універсальні механізми фотоіндукції [19], відповідно до якої результатом первинних механізмів впливу лазерного випромінювання є зміна біохімічної активності та посилення генерації синглетного кисню і вивільнення NO, який є регулятором активності цитохром-с-оксидази у клітині. Окрім того, включаються і вторинні механізми впливу опромінення, а саме зміни у клітинах, що відбуваються після поглинання кванта (фотона) світла. Вони пов'язані переважно з поглинанням світла у мітохондріях. Наслідком цього є зміни у гомеостазі самих клітин: зростання концентрації АТФ та Ca²⁺, активізація Na⁺, K⁺-АТФ-ази і трансмембранних йонних потоків, окрім того, відбувається деполяризація мембрани клітини.

Головні висновки. 1. Досліджено вплив лазерного опромінення на швидкість радіального росту та морфологічні особливості міцелію досліджених штамів гриба *P. ostreatus*. 2. У всіх варіантах дослідів із вивчення впливу лазерного опромінення на міцелій підібрані дози світла різних спектрів з однаковою щільністю енергії. 3. Опромінення довжиною хвилі 532 нм та 635 нм виявилось оптимальним для росту міцелію штамів *P. ostreatus*. Особливих відмінностей морфологічних характеристик колоній *P. ostreatus* за дії опромінення нами не було виявлено.

Література

1. Wasser S. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002. Vol. 60. P. 258–274.
2. Cohen R., Persky L. and Hadar Y. Biotechnological applications, and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 2002. № 58. P. 582–594.
3. Guillot J., Konska G. Lectins in Higher Fungi. *Biochem System Ecol.* 1997. № 3. P. 203–230.
4. Ng T. Peptides, and proteins from fungi. *Peptides*. 2004. № 25. P. 1 055–1 073.
5. Бисько Н.А., Митропольская Н.Ю., Соломко Э.Ф. Лекарственные грибы – для здоровья и красоты. Киев : Наук. думка, 2003. 40 с.
6. Poyedinok N.L., Buchalo A.S., Negriyko A.M., Potemkina J.V., Mykchaylova O.B. The action of argon and helium-neon laser radiation on growth and fructification of culinary-medicinal mushrooms *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm., *Lentinus edodes* (Berk.) Singer, and *Hericius erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2003. Vol. 5. P. 293–299.
7. Poyedinok N.L., Potemkina Z.V., Buchalo A.S., Negriyko A.M., Grygansky A.Ph. Stimulation with low-intensity laser light of basidiospore germination and growth of monocaryotic isolates in Medicinal Mushroom *Hericius erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. (Aphyllphoromycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2000. Vol. 2. № 4. P. 339–342.

8. Poyedinok N.L. Influence of low-intensity laser radiation on the growth and development of *Hericiun erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. and *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. *Int. J. Med. Mushr.* 2001. Vol. 3. № 2(3). P. 199.
9. Поєдинок Н.Л. Биотехнологические основы интенсификации культивирования съедобных и лекарственных макромицетов с помощью света низкой интенсивности : дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.20. Киев, 2015. 387 с.
10. Corrochano L.M. Fungal photoreceptors: sensory molecules for fungal development and behaviour. *Photochem Photobiol Sci.* 2007. Vol. 6. P. 725–736.
11. Горовой Л.Ф. Влияние света на морфогенез шляпочных грибов. Киев : Институт ботаники им. Н.Г. Холодного, 1989. 44 с.
12. Соломко Е.Ф., Ломберг М.Л., Митропольська Н.Ю. Ріст окремих видів лікарських макроміцетів на поживних середовищах різного складу. *Український ботанічний журнал.* 2000. Вип. 57. С. 119–126.
13. Ломберг М.Л. Лікарські макроміцети у поверхневій та глибинній культурі : дис. ... канд. біол. наук : 03.00.21. Київ, 2005. 231 с.
14. Бухало А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. Киев : Наук. думка, 1988. 144 с.
15. Бондарцев А.С. Шкала цветов. Москва : АН СССР, 1954. 27 с.
16. Stalpers J.A. Identification of wood-inhabiting Aphyllophorales in pure culture. *Studies in Mycology.* 1978. № 16. P. 1–248.
17. Приседський Ю.Г. Пакет програм для проведення статистичної обробки результатів біологічних експериментів. Донецьк : ДонНУ, 2005. 84 с.
18. Великанов Л.Л., Сидорова И.И. Некоторые биохимические аспекты в экологии грибов. *Успехи микробиологии.* 1983. № 18. С. 112–132.
19. Кару Т.И. Универсальный клеточный механизм лазерной биостимуляции: фотоактивация фермента дыхательной цепи цитохромоксидазы. *Голография: фундаментальные исследования, инновационные проекты и нанотехнологии. XXVI школа по когерентной оптике и голографии.* Иркутск : Папирус, 2008. С. 156–175.