



Austerserviku (*Pleurotus ostreatus*) kultiveerimine eostest viljakehani

Bakalaurusetöö

CARLOS-CHRISTIAN KÜNNAPAS

Juhendajad: Toomas Paalme, Keemia ja biotehnoloogia instituut, professor
Siim Raadik, Scandic Organic OÜ, tegevjuht

Õppekava: LAAB17/17



Cultivation of Gray oyster (*Pleurotus ostreatus*) from spores to fruiting body

Bachelor thesis

CARLOS-CHRISTIAN KÜNNAPAS

Supervisors: Toomas Paalme, Department of Chemistry and Biotechnology,
professor

Siim Raadik, Scandic Organic OÜ, tegevjuht

Study program: LAAB17/17

Autorideklaratsioon

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Carlos-Christian Künnapas

[allkiri 11.01.2023]

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.

Juhendaja: Toomas Paalme

[allkiri 11.01.2023]

Sisukord

Autorideklaratsioon	3
Annotatsioon	5
Lühendid	6
Sissejuhatus	7
1. Kirjanduse ülevaade	8
1.1 Seened kui elusorganismid	8
1.2 Kandseente elutsükkel	10
1.3 Seente ajalugu meditsiinis kui ka söögilaua	12
1.4 Seente kasutamine meditsiinilistel eesmärkidel	13
1.5 Seente kultiveerimine	14
1.6 Austerservik (<i>Pleurotus ostreatus</i>) söögiseenena	15
2. Töö eesmärgid	17
3. Eksperimentaalne osa	18
3.1 Materjalid ja meetodid	18
3.1.1 Organismid	18
3.1.2 Reaktiivid ja söötmed	18
3.1.3 Tarvikud ja seadmed	21
3.2 Seente kultiveerimine	22
4. Tulemused ja arutelu	31
Kokkuvõte	33
Kasutatud kirjandus	36
Lisa 1	39

Annotatsioon

Antud lõputöös käsitletakse seen *Pleurotus ostreatus* (eesti keeles “austerservik” või “hall-auster”) kultiveerimist eostest viljakehani. Austerservik on võrdlemisi tuntud seen, selle kasvukiirus ja resistentsus teiste hallitusseente vastu kõrge. Selles lõputöös käsitletakse protsesse, mis hõlmavad austerserviku kultiveerimist kunstlikes tingimustes, selleks kuluvat aega, kasvutingimusi ja saagikust. Kui metsas olevad seened kasvavad juhuse põhjal ning looduses on see pigem numbrite mäng ja teiste organismidega konkureerimine. Sisetingimustes kasvatamine eemaldab aga selle konkureerimise faktori teiste organismidega ning luuakse kõige soodsamad tingimused mingi kindla seene kasvatamiseks. Aseptilise tehnika kasutamisega, mis hõlmab seente kultiveerimist sisetingimustes, viiakse ka juhuse faktor nulli lähedale.

Selle bakalaaurusetöö kirjanduse ülevaates käsitletakse lakooniliselt seeneriiki kui eloslooduse osa, seente kasutust nii toiduna kui meditsiinis, seente kultiveerimise ajalugu, kandseente elutsüklit ning vaadatakse üle ka austerserviku omadusi põhjalikumalt. Kuna seeneriik on nii suur ja laiahaardeline oma olemuselt, siis selles lõputöös on käsitletud lühidalt seente taksonoomiat ja kandseente elutsüklit, et tutvustada lugejale seente olemust ja anda aimu seente tähtsusest meie ökosüsteemis ja ühiskonnas. Samuti anda ettekujutus lugejale protsessidest, kuidas seeni laboris kasvatatakse, seene eostest Petri tassil kuni viljakehadeni, mis on leitavad poeletil.

Lühendid

sp - ingl k. "*Species*" ehk "liik"

UN – *United Nations*, eesti k. Ühinenud Rahvaste Organisatsioon

c.a - ingl k. "*Circa*" ehk umbkaudu

RH% - ingl k. "*Relative humidity*" ehk suhteline niiskus

1 bar - Rõhu mõõtühik, SI ühikutes 100 kPa

Transfer - eesti k. "Ülekanne" ehk siinses kontekstis "Ümberkülv"

Sissejuhatus

Läbi aegade on seeni kasutatud toiduna, nii rahvameditsiinis, kui ka rituaalsetel eesmärkidel. Iidsetest aegadest on usutud, et seentel on teatud võime tugevdada inimese tervist. Mida aeg edasi ja võimekamaks teadus areneb, seda rohkem leitakse tõendeid, mis kinnitavad seente kasulikkust inimese tervisele.

Kui meie lääne meditsiin toetub haiguste ravimisele, siis on juba mitu tuhat aastat ida meditsiinis tegeletud haiguste ennetamisega - olgu need siis seotud füüsilise või vaimse tervisega. Usuti, et erinevatel seentel on erinevad tervist edendavad võimed ning see on ka kandunud tänapäeva- eriti Aasias (Hiina, Jaapan, Mongoolia, jne), kus seened ja nende tervislikud omadused on väga kõrgelt hinnatud toidulaul.

Siim Kabrits asutas firma "Chaga Health", et Eesti rahva tervist läbi chaga abil tugevdada. Siimu emal oli avastatud väga hilises staadiumis olev vähkkasvaja. Arstid andsid ta emale maksimaalselt 3 kuud elada, aga Siim oli kursis, et mõned idarahvad kasutavad seda seent just vähkkasvajate vastu. Siim siis tegi ise kodus chaga tõmmise valmis, smuugeldas haiglasse ja doseeris iseseisvalt oma ema 2 kuu perioodil. Siimu ema lasti haiglast välja peale kolme kuud ning ta elas täisväärtuslikku elu edasi 10 aastat.

Antud lõputöös uuritavaks seeneks on *Pleurotus ostreatus* (edaspidi austerservik), mis kasvab looduslikult pea igal pool kus kasvab lehtmets. Tegu on kandseenega, mis paikneb *Agaricomycetes* alamklassis ning kuulub šampinjonilaadsete servikuliste seente alla. Austerservik on saprofiilne seen, mis käitub looduses puidu lagundajana. Teda võib leida vaid surnud või surevatel puudel. Austerservikud toovad metsale kasu, lagundades surnud puitu, tagastades mulda elutähtsad keemilised elemendid ja mineraalid ökosüsteemi, teistele organismidele omastataval kujul.

Austerservikud on karnivoorsed seened, mis suudavad tappa ümarusse, tootes kaltsiumi siduvat toksiini, mis siis halvab saagi, põhjustab ümarussi kudedes nekroosi ning muudab ta seeditavaks valgurikkaks toiduallikaks [1].

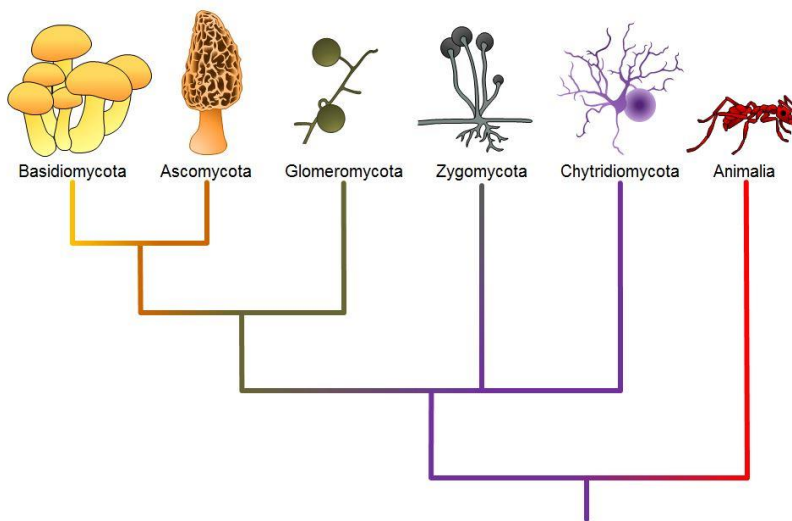
Austerservikut on kasutatud ka diisli poolt saastatud pinnase puhastamiseks, kus austerservik suutis 95% [2] saastest muuta mittetoksilisteks ühenditeks.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Seened kui elusorganismid

Elusolendeid kategoriseeritakse üldiselt kolme domeeni: bakterid, arhed ja eukarüoodid. Eukarüoodid jaotatakse omakorda looma-, taime- ja seeneriiki. Seeneriiki kuulub omakorda viis hõimkonda. Kõik need organismid on võrdlemisi tihedalt seotud looduses üksteisega ning sõltuvad ökosüsteemides üksteisest. Seened (fungi) on eraldi seisev elusolendite kategooria; riik, ning antud töös käsitleme seente all viljakehasid moodustavaid seeneriigi esindajaid (täpsemalt, basidiomycota hõimkonda kuuluvaid seeni).

Seened (inglise k. *fungi*) on hulkraksed eukarüootsed organismid, mis jaotuvad: *Basidiomycota* (kandseened), *Ascomycota* (kottseened), *Glomeromycota* (krohmseened), *Zygomycota* (ikkeseened) ning *Chytridiomycota* (viburseened) (Joonis 1). Kõigil neil on erinev roll meie ökosüsteemis ning mida aeg edasi, seda rohkem leiame neile kasutusala. Näiteks on üheraksed pärmseened, *Ascomycota* hõimkonda kuuluvad *Saccharomyces sp.*, üheks tähtsamaiks koostisosaks nii leiva- kui alkoholitööstuses. Samuti avastus 20. sajandi algul, et *Penicillium sp.* saab kasutada antibiootikumina on olnud ravimitööstusele vaieldamatult väga suur hüpe- hinnatakse, et tänu penitsiliini ravimiks võtmisele 1942 aastal, on see päästnud c.a 200 miljoni inimese elu [3].



Joonis 1. Seente liigitus hõimkonnati [4].

Seened oma olemuselt sarnanevad anatoomiselt enam taimedele, aga metaboolselt loomadele. Seentel puudub võime liikuda iseseisvalt, seene mütseel omades võimet mullas edasi tungida sarnaneb selles mõttes taime juurtele. Nagu taime juurte, omastavad nad eluks vajalikud mineraalained ja toitained kasvuks juurte kaudu, seene viljakehad aga omastavad oma eluks vajalikud mineraalained ja toitained mütseelist. Seene viljakeha koosneb suuremas osas veest, mis omastatakse pinnasest ning mingil määral ka atmosfäärist.

Kõige suuremad erinevused seentel ja taimedel on see, et taimed on kokkuvõtlikult biomassi “tootjad” ja seened aga selle “tarbijad”. Taimed kasutavad päikeseenergiat fotosünteesiks, tarbivad süsihappegaasi ja vett ning toodavad peamiselt biomassi ja hapniku. Seened nagu loomad, tarbivad hapniku ja toodavad süsihappigaasi ning omavad võimet lagundada orgaanilisi ühendeid lihtsamateks ühenditeks ja kasutada neid biosünteesilistes protsessides. Samuti aitavad seened ka teistel organismidel toitaineid pinnasest kergemini omastada. Nii taimedel ja seentel on olemas rakusein, loomadel aga seda ei ole ning neid kaitsevad rakumembraan ja teised rakulised struktuurid.

Ascomycota ehk kottseened on suurim seente perekond, kus on üle 64 000 liigi [5]. Paljud kottseente hõimkonda kuuluvad seened moodustavad ka viljakehi, aga mitte kõik. Kottseened on oma nimetuse saanud tänu oma sugulisele, eoseid kandvale rakule, mida just sellesse hõimkonda kuuluvad seened toodavad. Vanakreeka keelest “*ἀσκός*” ehk “*askós*” tähendab otsetõlkes nahast kotti, mis viitab sellele struktuurile, mis ümbritseb sellesse hõimkonda kuuluvate seente eoseid. *Ascomycota* hõimkonda kuuluvad näiteks: mürkel (*Morchella sp.*), trühvlid (*Tuber sp.*, *Elaphomyces sp.*, jne), aga samuti ka penitsiliin (*Penicillium sp.*) ning ka pagaripärm (*Saccharomyces cerevisiae*).

Basidiomycota ehk kandseened on teine suur hõimkond seeni koos *Ascomycota* hõimkonnaga, mille all on samamoodi nii mikroskoopilisi, kui ka makroskoopilisi seeni. Mõlemad hõimkonnad kuuluvad “kõrgemate” seeneliste alla, ehk seenelised, kus hüüfid on hästi arenenud, vaheseintega ja tavaliselt mõnel arengujärgul tihedaks koeks põimunud, eriti viljakehas. Kandseente eripära on see, et need on reeglina niitjad seened, mis koosnevad hüüfidest ja paljunevad sugulisel teel, moodustades spetsiaalse kujuga otsarakke, mida nimetatakse basiidideks ning need otsarakud kannavad väliseid meiospoore e. mitootilisi eoseid. Neid spetsiaalseid eoseid nimetatakse basidospoorideks [6]. *Basidiomycota* hõimkonna alla kuuluvad: murumunad (*Bovista sp.*, *Calvatia sp.*, *Lycoperdon sp.*, jne), puravikud (*Boletus sp.*), kukeseened (*Cantharellus sp.*), servikud (*Pleurotus sp.*), aga samuti ka mikroskoopilised, viljakehata, seened nagu *Cryptococcus sp.*, erinevad pärmid (*Sporobolomyces sp.*), roosteseened (*Pucciniales sp.*), jne.

1.2 Kandseente elutsükkel

Kandseente elutsükkel jagatakse kuude etappi (Joonis 2).

Kõigepealt paiskab täielikult küps viljakeha õhku mikroskoopilisi, silmaga mitternähtavaid eoseid. Eosed on siis seentel üherakuline paljunemisüksus, mis sisaldab sellele seenele omast geneetilist materjali. Üks küps 10 cm diameetriga individuaalne seene kübar suudab õhku paisata kuni 100 miljonit [7] eost tunnis. Kuna eosed on väga väikesed ja kergekaalulised, kanduvad nad tuulega väga kergelt looduses ning võivad läbida väga suuri vahemaid [8].

Kui eosed (haploidsed basidiospoorid) on maandunud pinnasele, mis sobib nende idanemiseks, algab sobivate keskkonna tingimuste saabudes nende idanemine. Moodustuvad hüüfid (monokarüoonid).

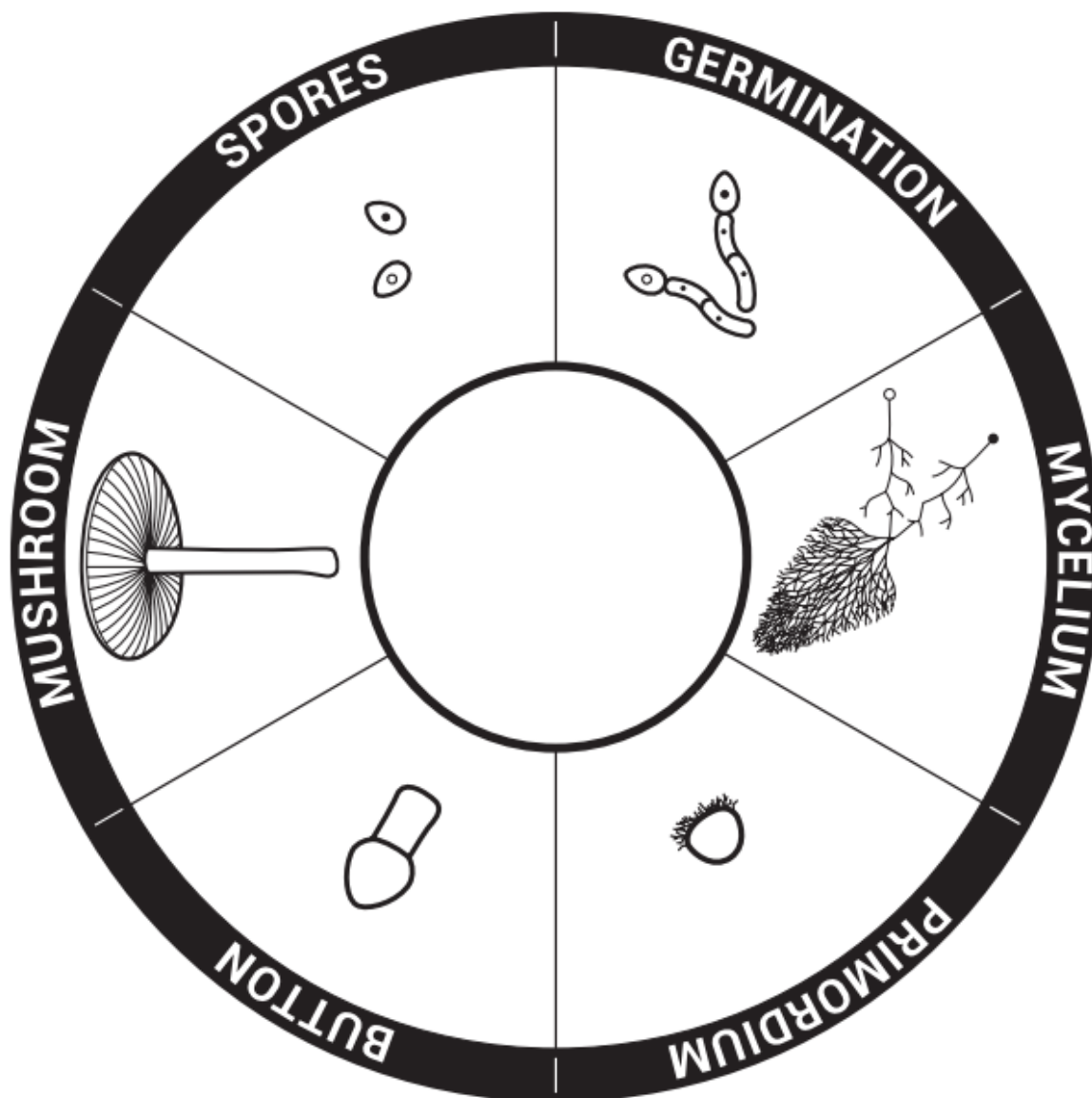
Hüüfidel on sugu "+" või "-". Kui need sulanduvad moodustuvad dikarüootsed seenerakud, mille kogumit nimetatakse mütseeliks. Hüüfide otsad sekreteerivad hüdrofüütilisi ensüüme ning võimaldavad pinnases leiduvate polümeerse ühendite lagunemist omandavateks toitaineteks ning nende imendumist. Mütseel on $2n$ hüüfide kogum.

Kui on tekkinud piisavalt suur mütseelikogum, on see eelduseks silmaga nähtava viljakeha formeerumiseks. Mütseel käitub looduses kui toitainete vahendajana – assimileerides mullast orgaanilisi ühendeid ja taimejuurtest pärit süsivesikute energiat, akumuleerivad mineraalaineid ja vahendavad neid nii seenele enesele, kui ka nendega seonduvatele taimedele. Vastutasuks pakuvad taimed seenele glükoosi ja muid kergesti imenduvaid süsivesinike. Toitainete kogumine mütseelis võimaldab (on eelduseks), et jätkata seene elutsükli ning moodustada seenealgeid, ehk ingl k. "*primordia*".

Neljandas etapis on tekkinud juba seenealge, ehk "*primordia*". Kui mütseel on pinnase all, siis selles etapis olevat seenealget on füüsiliselt võimalik näha pinnasel kasvamas.

Viiendas etapis omastab tekkinud seenealge kasvuks mütseelist toitaineid ja pinnasest vett ning sirgub aja möödudes küpseks viljakehaks. See on hästi kriitiline etapp seene elutsükli kasvuks, sest kui kasvutingimused peaksid ekstreemselt muutuma, näiteks kui on temperatuuri liigsed kõikumised või õhuniiskuse kõikumised, siis võib seene viljakeha oma kasvu lõpetada ja aja möödudes ära kõduneda.

Kuuendas etapis on seene elutsükli lõpp. Selles etapis on seen täielikult küps ning on valmis välja paiskama eoseid, mis on võimelised kanduma väga kaugele tänu erinevatele loomadele ja tuulele, et eelkirjeldatud protsessi algusest peale korrata. Soodsate tingimuste olemasolul jätkub aga mütseeli kasv lokaalselt, selle tõestuseks oleks näiteks seeneringid.



Joonis 2. Kandseente elutsükel [9]. Kellaosuti liikumise suunas - “*Germination*” eesti k. “idanemine”; “*Mycelium*” eesti k. “mütseel” e. “seeneniidistik”; “*Primordium*” eesti k. seenealge; “*Button*” – eesti k. “nupp”, aga siinses kontekstis “kübara ja jalaga noor seen”; “*Mushroom*” eesti k. “seen”.

1.3 Seente ajalugu meditsiinis kui ka söögilaua

Seeni on kasutatud aastatuhandeid söögiks. Arvatakse, eriti idamaades, et seentel on ka igasuguseid erinevaid tervist parandavaid omadusi, alustades vaimsetest probleemidest ning lõpetades vähkkasvajatega.

Traditsioonilises Hiina meditsiinisüsteemis koheldakse vaimu ja keha väikese universumina, kus iga üksikisikut vaadeldakse kui eksklusiivse üksusena ning nende tervis sõltub Ying ja Yangi vahelisest tasakaalust. Selle kohaselt tarvitasid kunagi suurte dünastiade keisrid igavese seisundi saavutamiseks teed, mis oli erinevatest seentest valmistatud, aga põhiliselt kasutati reishit, ehk "*Ganoderma sp.*" perekonnast pärinevaid seeni, eriti "*Ganoderma tsugae*" ning "*Ganoderma lucidum*" [10].

Vanad kreeklased uskusid, et seentel on võim anda sõdalastele lahingus jõudu. Roomlased pidasid seeni "jumalate toiduks". Hiina on seeni alati vaadelnud "elueliksiirina", samuti usuti Lõuna-Ameerikas seentel olevat tugevat maavälist jõudu ning seal piirkonnas kasutati seeni, nimelt psilotsübiini sisaldavaid seeni, religioossetel eesmärkidel. Nende hallutsinogeensete seentega muudeti teadvuse seisundit ning usuti, et nende seente abil on võimalik erinevate jumalatega suhelda. Selle abil siis omakorda paluti paremat vilja saagikust, tervist ja võimu [11]. Teisalt on seeni tunnustatud ka nende atraktiivsete kulinaarsete omaduste poolest.

Koos pika ajalooga toiduallikana on seened traditsioonilises meditsiinis olulised nende ravivõime- ja omaduste poolest. Neil on palju märkimisväärseid tervist tugevdavaid ning erinevaid haigusi ravivaid omadusi [12].

1.4 Seente kasutamine meditsiinilistel eesmärkidel

Tänapäeval on seente raviomadused üha enam rambivalgusesse liikunud ka meie lääne ühiskonnas. Teaduse arenedes areneb ka võimekus uurida seente tervistavaid omadusi. Kunagised folkloorsed arvamused, et seen X aitab probleemi Y vastu hakkavad teaduslike tõendeid saama.

Samuti aitab arvatavasti kaasa ka seente üldisemasele kasutamisele meditsiinilistel eesmärkidel ning populariseerimisel see, et USA-s osades osariikides ning Kanadas on hiljuti dekriminaliseeritud psilotsübiini sisaldavate seente omamine ja kasutamine ning seda ainet sisaldavaid seeni kasutatakse ka näiteks Johns Hopkins ülikoolis erinevate vaimuhaiguste ravimisel. Psilotsübiin ja psilotsiin (fosfaatrühmata, bioloogiliselt aktiivne vorm psilotsübiinist) on osades seentes esinev hallutsinogeen, mis käitub kui mürgina erinevate kahjurite vastu looduses. Tänu oma mõjudele inimkehas: eufooria, visuaalsed ja vaimsed hallutsinatsioonid, tajumutused, moonutatud ajataju ja tajutavad vaimsed kogemused. Neid ühendeid sisaldavate seente korje, müük, kultivatsioon ja tarbimine illegaliseeriti 1971. aastal UN poolt ning need ühendid liigitati esimese kategooria narkootikumide alla [13].

On leitud, et söögiseenel - lõvilakk (ladina k. *Hericum sp.*), mida on ka juba varem kasutatud ka neuroloogiliste haiguste raviks omab katsetustel hiirtega neurogeneratiivsed omadusi. Leiti, et kui hiirte närvikahjustus on varajases staadiumis, siis eelnimetatud seenes olevad β -glükaanid (peamiselt erinatsiin ja eritsenoon) aitavad närvirakkude taastumisele märkimisväärselt kaasa [14].

Chaga seent (*Inonotus obliquus*), mis kasvab kasepuudel on kasutatud peamiselt Hiinas, Venemaal ja Koreas läbi aastasadu põletiku leevendajana, vähkkasvaja ennetajana ning üldiselt tervise tugevdajana. Tänapäeva uuringud on näidanud, et tõepoolest on sellel seenel kasvavastane, antioksüdantne, viirusevastane, hüpolipideemiline ja hüpolipideemiline toime [15].

Libliktagelit (*Trametes versicolor*) on kasutatud läbi ajaloo erinevate haiguste raviks; põletikest kuni vähkkasvajate ennetamiseni ning raviks. On leitud, et libliktagel sisaldab ainet nimega "polüsahhariid-K" [16], mis on kliinilistes katsetes olnud efektiivne adjuvantravis (kasvaja korral kirurgiline ravi, millele järgneb keemia- või kiiritusravi, et vähendada kasvaja taastekke riski) [17] erinevate vähkkasvajate leevendamisel. "Polüsahhariid-K" võib põhjustada ekstreemsetel juhtudel kõhulahtisust, tumedamat väljaheidet ja tumedamaid küüsi [18]. Jaapanis on see isegi saanud heakskiidu kasutamiseks kliiniliselt. Seda eelnimetatud "polüsahhariid-K" on uuritud ka immuunpuudulikkuse raviks, aga hetkel on efektiivsus sellel eesmärgil ebaselge [19].

See on alles jäämäe tipp seente müstilisest potentsiaalist ning arvatavasti aja möödudes tehakse üha enam avastusi, mis viivad uute suurte läbimurreteni meie lääne meditsiinis.

1.5 Seente kultiveerimine

Kui taimi on kasvatatud tehnikult aastatuhandeid söögiks erinevate mulla kooslusega põllumaadel, siis seente kasvatamiseks polnud olemas teadmisi ega meetodeid ning neid käidi erinevates metsades korjamas. Alles 800 aastat tagasi hakkasid Hiinlased esimesi kultuurseeni, Shiitaket (*Lenintula edodes*) kasvatama. Esialgu kultiveeriti shiitaket nii, et puu raiuti kirvega maha, millel shiitake kasvas või millel arvati olevat shiitake eoseid. Puu lõiguti palkideks ning need palgid pandi värskelt lõigatud samast puuliigist palkide kõrvale, millel polnud silmaga nähtavat seene kasvu [20].

Euroopas aga hakati seeni kultiveerima alles 17. sajandil. Esialgu kultiveeriti hariliku šampinjoni (*Agaricus bisporus*) Pariisis põldudel. Umbes 160 aastat hiljem avastati, et seentele meeldib rohkem maa all kasvada, eriti koobastes, ekskaveeritud tunnelites ning kaevandustest. See maa-alune kultivatsivatsioon oli kuldstandard kuni 19. sajandi lõpuni [21].

Tänapäeval kasvatatakse seeni enamjaolt kontrollitud tingimustes, spetsiaalselt disainitud hoonetes, kus on võimalik kunstlikult luua ideaalsed tingimused: optimaalne õhuniiskus, temperatuur, valguse tugevus, CO₂ kontsentratsioon õhus, jne, seente kasvuks. Selle lõputöö praktiline osa viidi läbi spetsiaalselt seente kasvuks disainitud merekonteinerite kompleksis, kus ühes konteineris viidi läbi töö aseptiline osa, peamiselt Petri tassidega töö ja erinevate meediumite inokuleerimine ning inokuleeritud meediumite inkubeerimine. Kui kunagi hoiti näpud ristis, et seened kasvama läheksid, siis tänapäeval on seente kasvatamine palju rohkem teadusele toetuvam ning faktuaalsem.

1.6 Austerservik (*Pleurotus ostreatus*) söögiseenena

Austerservik (*Pleurotus ostreatus*) on kandseente hõimkonna alla kuuluv söögiseen. Austerservik paikneb taksonoomiliselt *Basidiomycota* hõimkonnas, *Agaricomycetes* klassis, *Agaricales* seltsis, *Pleurotaceae* sugukonnas, perekonnas *Pleurotus*. Austerservik on oma olemuselt saprofiilne seen, mis eelistab oma kasvupinnaks surevat või surnud lehtpuitu. Looduses on see võrdlemisi hästi äratuntav seen, mis kasvab tavaliselt suurte klastritena puidul ning kübara suuruseks võib olla kuni 15cm. Sellel on valged eoslehekesed, mis jooksevad mööda selle jässaka, peaaegu olematu, jala alla poole. Kübara värvus on noorel austerservikul sinakas ja vananedes muutub hallikamaks, aga sõltuvalt keskkonnatingimustest võib küpse austerserviku kübara värvus olla ka tumepruun või hallikaslilla. Kogutud eoste värvus on valge, kuid vahel ka õrnalt lillakas. Looduses esineb austerservikut Eestis sügise algul ning püsib tugevate külmade saabumiseni. Sooja talve korral võib austerservik viljuda kuni kevadeni. Kõige rohkem esineb seda Eestis pigem parkides ning aedades, aga võib leida ka metsast.

Austerservik on tekstuurilt sametine ja võrdlemisi tihke ning maitsetl meenutab mingil määral mereande. Samuti, nagu enamikel seentel, on see võrdlemisi madala kalorisaldusega, aga see-eest väga toitainete- ja vitamiiniderohke (Tabel 1.). Austerserviku viljakeha sisaldab ka c.a 88,75% vett [23].



Joonis 3. Looduslikes tingimustes kasvav austerservik, Tallinn, Kitseküla asum.

Toitaine	Toitaineline väärtus 100 g kohta, värske	%päevasest tarbimissoovitusest
Energia	33 Kcal	1,6%
Süsivesikud	6,09 g	4,7%
Valgud	3,31 g	6%
Rasv	0,41 g	2%
Kiudained	2,3 g	6%
Vitamiinid		
Folaadid	38 µg	9,5%
Niatsiin	4,956 mg	31%
Pantoeenhape	1,294 mg	26%
Püridoksiin	0,110 mg	8%
Riboflaviin	0,349 mg	27%
Tiamiin	0,125 mg	10%
Vitamiin-D	29 IU mg	7%
Elektrolüüdid		
Naatrium	18 mg	1%
Kaalium	420 mg	9%
Mineraalid		
Kaltsium	3 mg	<1%
Vask	0,244 mg	27%

Tabel 1. Värsk austerserviku toitumisalane teave 100g kohta koos % päevasest tarbimissoovitustest [22].

2. Töö eesmärgid

Tutvuda kirjandusega, et leida austerserviku kasvuks sobivad tingimused. Kasvatada laboris austerservik (*Pleurotus ostreatus*) seene eostest viljakehani ning kirjeldada ja analüüsida selle protsessi käiku tervikuna, samuti võrrelda Eestis metsikult kasvava austerserviku saagikust kommertsiaalselt kasutatavate liikidega. Teha kirjanduse ülevaade viljakehasid moodustavate seente bioloogiast.

3. Eksperimentaalne osa

3.1 Materjalid ja meetodid

3.1.1 Organismid

Austerserviku kasvatamiseks kasutati Pärnumaalt, Saarde vallast, Laiksaare külast, metsast katastri numbriga: 71001:001:0073, leitud austerserviku seene eoseid, mis koguti enne töö alustamist hõbepaberile ühe ööpäeva jooksul ning hoiustati kokkuvoldituna grippkotis, külmkapis +4°C juures.

Seene eoste kogumine toimus tuulevaikses ruumis ühe ööpäeva jooksul. Metsast võetud seen asetati hõbepaberile, lahtine kübar vastu hõbepaberit ning seenele pandi 330 mL joogiklaas peale, mis tekitas seene kübara ja hõbepaberi vahel õhuvoogudeta ala. Klaas seene ümber tagas tuulevaikse keskkonna, et kogutud eoseid langeks maksimaalselt hõbepaberile ning mitte ei lenduks keskkonda.

Tööstuslik seenekultuur, Belgia mütseeli tootva firma, Mycelia, poolt aretatud M2191 *Pleurotus ostreatus* saadi ettevõtte "Scandic Organic OÜ" kolleksioonist.

3.1.2 Reaktiivid ja söötmed

Seene kasvatamiseks laboris kasutati agar-agar pulbrit (Food Colours, Poola), Linnaseekstrakt- eriti hele (Muntons, Suurbritannia), rukist (Koskvere veski maherukis, toidupartii: 239, Eesti), lehtpuu saepuru (Puumarket AS tootmisjäädgid, Eesti), põhugraanuid (Biohansa, Eesti).

Tööpindade, riulite ning käte desinfitseerimiseks kasutati 3% H₂O₂ (Honeywell, USA) ja 70% isopropanooli (BS DEZON S, Saksamaa) lahust vees.

MEA (*malt extract agar*), 2% kontsentratsiooniga söötme, valmistamiseks kasutati 20 g agar-agar pulbrit (Food Colours, Poola) ning 20 g linnaseekstrakti (Muntons, Suurbritannia), segati 1L (kraani)veega, mis kuumutati pliidiil potis 100°C-ni, aeg-ajalt segades ning siis kallati edasiseks kasutuseks ettevaatlikult 1L borosilikaat pudelisse. Agar-agar, 2% kontsentratsiooniga, lahustub vees temperatuuridel üle 90°C ning taheneb temperatuuridel 35-45°C seetõttu peab enne sellega töötamist üles sulatama.

Agar-agar antud retseptis käitub kui meediumi tahkendajana, sõltuvalt lisatud kogusest saab teha tahkema konsistentsiga lõpp-produkti, kui lisada rohkem kui 20 g ning viskoossema konsistentsiga, kui lisada vähem kui 20 g agar-agarit liitri vett kohta. Antud diplomitöös tundus kõige kindlam kasutada 2% kontsentratsiooniga agarit, sest varasem töökogemus on näidanud, et see on seente eostest alustamisel parim variant, samuti seente tüvede isoleerimiseks ja ümberkülviks.

Linnaseekstrakt käitub retseptis kui lihtsasti seedivate süsivesikute ehk suhkrute allikana seene mütseelile. Selle valisin ka kontsentratsiooniga 2%, sest kõrgema toitaineväärtusega sööde võib anda paremad tingimused kasvuks ka mingile muule organismile, mis on võibolla kogemata Petri tassile

sattunud ning vähesema toitaineväärtusega sööde võib inhibeerida seene mütseeli kasvu ning pikendada aega kuniks Petri tass oleks kasutatav järgmisel etapil.

Tabel 2. Kasutatud linnaseekstrakti toitumisalane teave 100 g kohta [24].

Kalorid	375 kcal
Niiskus	3,9 g
Valgud	5,4 g
Rasv	<0,1%
Kiudained	0,1%
Tuhk	1,3 g
Süsivesikud	89,4 g

Antud töös kasutatud substraadi “*master’s mix*” retsept:

Tabel 3. Viljakehade saamiseks kasutatud kasvukeskkonna retsept.

Tooraine	Kogus (kg)
Pöögi saepuru	15
Biohansa põhugraanulid	10
Vesi	28

Kõigepealt segati substraadi kuivained (saepuru ja põhugraanulid) kokku suures plastnõus - 15 minutit aktiivset segamist, siis määrati mikrolaineahju, tühja Petri tassi ning milligrammikaalu abil kuiva substraadi umbkaudne veesisaldus.

Veesisalduse määramine kasutatavas substraadis

Kõigepealt leiti tühja Petri tassi kaal, seejärel võeti “*master’s mix*” anumast suvalisest kohast proov ning kaaluti seda koos Petri tassiga milligrammikaalul. Tühja Petri tassi kaaluks tuli 56,13g ning proovi kaaluks koos Petri tassiga tuli 68,17g. Arvutasime substraadi koguse Petri tassil ning selle saamiseks pidime lahutama substraadiga kaalutise substraadita kaalutisest: $68,17g - 56,13g = 12,04g$. Seejärel pandi Petri tass prooviga mikrolaineahju ning mikrolaineahi pandi tööle 800W juures kolmeks minutiks - peale igat möödunud minutit võeti see välja ning Petri tassis olevat proovi segati umbes 10-15 sekundit, et niiskus oleks Petri tassil ühtlasemalt jaotunud. Peale kolme minutit oli proovist vesi täielikult aurustunud ning see kaaluti milligrammikaaluga uuesti üle. Uueks kaalutiseks tuli 65,31g.

Lahutasime esialgsest kaalutisest (proov enne mikrolaineahjuga töötlemist) saadud kaalutise (mikrolaineahjuga töödeldud proov) ning saime, et proovis oli esialgselt: $68,17\text{g} - 65,31\text{g} = 2,86\text{g H}_2\text{O}$. Veesisalduse protsentuaalseks leidmiseks jagasime leitud vee koguse substraadis, mikrolaineahjuga töötlemata, substraadi kaalutisega ning korrutasime 100-ga, et saada proovis oleva veesisalduse protsent:

$$\frac{2,86\text{ g}}{12,04\text{ g}} \times 100\% = 23,75\% \approx 23,8\%$$

Seejärel lisasime "master's mix"-ile 28L vett, segasime hoolikalt ning kordasime eespool kirjeldatud meetodikat. Seekord tuli tühja Petri tassi kaalutiseks 56,40g ning suvalisest kohast võetud proovi massiks, koos Petri tassiga, 80,50g. Leidsime proovi kaalu Petri tassita, milleks tuli $80,50 - 56,40\text{g} = 24,10\text{g}$. Töötlesime seekord kolme minuti asemel proovi viis minutit (substraadil kõrgem veesisaldus ning täielikus vee aurustumiseks kulub rohkem aega) ja segasime proovi Petri tassil peale igat möödunud minutit 10-15 sekundit ühtlasemaks niiskuse jaotamiseks. Uueks kaalutiseks peale mikrolaineahjuga töötlemist tuli 64,04g. Veesisalduse leidmiseks lahutasime esialgse, töötlemata, kaalutise uuest saadud, töödeldud, kaalutisest ning saime, et proovis on : $80,50\text{g} - 64,04\text{g} = 16,46\text{g H}_2\text{O}$. Seejärel leidsime protsentuaalselt veesisalduse, jagades leitud vee koguse proovis esialgselt, mikrolaineahjuga töötlemata, kaalutisest ja korrutasime 100-ga:

$$\frac{16,46\text{ g}}{24,10\text{ g}} \times 100\% = 68,29\% \approx 68,3\%$$

Kui optimaalne veesisaldus saavutatud, siis segati substraati veel 15 minutit ning seejärel viidi see edasi spetsiaalsetesse filterkottidesse. Kasutatud kottideks olid spetsiaalselt seente kultiveerimiseks loodud polüpropüleenist autoklaavitavad filterkotid.

Filterkott tagab gaasivahetuse, hoides välja muud organismid, mis võivad inhibeerida või konkureerida kasvatava seenega, ehk antud juhul austerservikuga. Kotti filtrid on piisavalt suure diameetriga, et hapnik pääseks sisse ja süsihappegaas välja, aga piisavalt väikese diameetriga, et bakterid ning eosed ega muu saaste sisse ei pääseks.

Kotid substraatidega volditi pealt kokku ning asetati, kotisuu suunatud autoklaavi keskele, autoklaavi, et vältida autoklaavi seintelt tuleneva kondensatsiooni sattumist substraati läbi kotisuu. Substraate autoklaaviti 2 tundi, töö rõhul 1 bar, temperatuuril 121°C - steriliseerides täielikult substraadi. Peale autoklaavi töö lõppemist oodati veel c.a 20 h, et autoklaav ning autoklaavis olevad substraadid oleks piisavalt maha jahtunud, et need seene mütseeliga nakatatud rukkiteradega inokuleerida. Jahtumisel oli autoklaav tugevalt kinni, et steriliseeritud substraatidel ei oleks kokkupuudet õhuga ning oodati kuni autoklaavi siserõhk ja temperatuur loomulikult, keskkonnatingimusi muutmata, labori tingimustega oleks samad enne autoklaavi avamist

3.1.3 Tarvikud ja seadmed

Seene eostest mütseeli aretamine sai alguse 94 mm diameetriga plastikust Petri tassidel (Lekolar, Soome). Vedelsööde steriliseeriti ning pärast kallati Petri tassidele laboratoorsest 1 L 3.3 borosilikaatklaasist pudelist (VWR, USA). Kõik Petri tassid millel oli sööde (ja inokulant) said töö lõpul suletud parafilmiga (Bemis, USA), et saaste sisse ei saaks. Seene eosed kraabiti hõbepaberilt ning söötme ümberkülve tehti skalpelliga, käepide nr.4 (Jobak Medical Instruments, Pakistan) ning tera nr.23 (Spengler, Prantsusmaa). Niisutatud rukkiteri hoiustati ning inokuleeriti 815 mL klaasist purkides (Pakendikeskus, Eesti) ning purgi kaante filtriks kasutati puuvilla (Nevotex, Eesti). Optimaalse veesisaldusega lehtpuu saepuru koos põhugraanulitega, ehk substraati, hoiustati, autoklaaviti ja inokuleeriti 2 L mahutavusega PPD50/SEU2/V19-32 polüpropüleenist autoklaavitavates filterkottides (SacO2, Belgia) ning nakatatud rukkiteradega inokuleeritud kotid suleti 500mm kilekeevitusseadmega (Mercier corporation, Taiwan). Kõik steriilne töö toimus HEPA filtriga varustatud BIOBASE BBS-H1100 horisontaalse laminaarkapi all (BIOBASE, Hiina) ning kõik steriliseerimine viidi läbi BIOBASE vertikaalses autoklaavis BKQ-B50/75V (BIOBASE, Hiina). Vedelsöötme komponendid ning samuti saepuru niiskusesisaldus kaaluti AWS-100 digitaalse (milligrammi)kaaluga (American Weigh Scales, USA), millega saab kaaluda vahemikus 0,01 g - 200 g ning mille eraldus on 0,01g. Substraadi kuivatamiseks, et määrata veesisaldus, kasutati mikrolaineahju Electrolux EMS20300OX (Electrolux, Rootsi). Valmis saepuru substraatide kaalumiseks kasutati digitaalset lauakaalu (Kern CPE15K3, Saksamaa), millega saab kaaluda vahemikus 0,5g – 15kg. Kasvuruumi temperatuuri ja suhtelist niiskust mõõdeti suhtelise niiskuse anduriga RHT-H85 (HENGKO, Hiina).



Joonis 4. Modifitseeritud kaanega purk

Töös kasutatud modifitseeritud kaanega purk kujutab endas purki, mille kaanele on sisse puuritud auk ning millesse on sisestatud tükk vatti. See on lihtne ja hea süsteem, mis tagab purgis oleva

gaasivahetuse mütseeli kasvuks. Nagu ennist mainitud, tarbivad seened hapniku ning eritavad CO₂. Vatist filter võimaldab selle ning tänu oma kiulisele struktuurile, raskendab see saastel sattumist purki, kätudes kui suure labürindina, millesse saaste osakesed kinni jäävad. Saaste all mõeldakse siin mistahes muud organismi, mis ei ole huvipakkuv seen.

3.2 Seente kultiveerimine

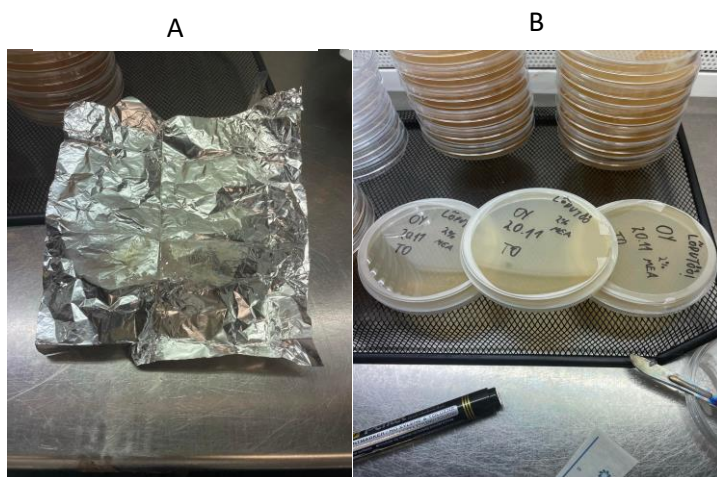
Seene eosed koguti Rae-Peetri talus (58°07'27.9"N 24°46'39.1"E) steriilsele hõbepaberile, mis siis viidi edasi Tallinna Scandic Organic OÜ laborisse.

Laboris tehti valmis 2% MEA sööde, mis pärast autoklaavimist kallati Petri tassidele ning pärast tahkenemist inokuleeriti austerserviku eostega.

Steriliseerimiseks pandi agarsöötme pudelile nõrgalt peale kork ja kaeti hõbepaberiga, et toimuks gaasivahetus ning et pudel ei puruneks autoklaavis rõhu erinevuse tõttu. Pudel viidi edasi autoklaavi üheks tunniks töörohul 1 bar, temperatuuril 121°C.

Reeglina piisab vedelike autoklaavimisest 15 minutist temperatuuril 121°C, aga kuna varasemalt on selles asutuses, kus lõputöö läbi viidi, probleeme olnud saastega, on leitud, et selles töös kasutatav autoklaav steriliseerib efektiivsemalt, kui hoida steriliseeritavat meediumi vähekesi kauem töörohul ja temperatuuril.

Peale autoklaavis steriliseerimist eemaldati autoklaavist vedela söötme pudel ning viidi koheselt isopropanooli ja UV-kiirgusega eeltöödeldud laminaarkapi alla, kus siis kallati sööde aseptiliselt Petri tassidele ning lasti neil seista töötava laminaari all kuniks nende tahkenemiseni. Peale tahkenemist inokuleeriti petri tassid eelnevalt metsast saadud austerserviku eostega. Eoseid kraabiti steriilse skalpelliteraga ettevaatlikult söötmele.



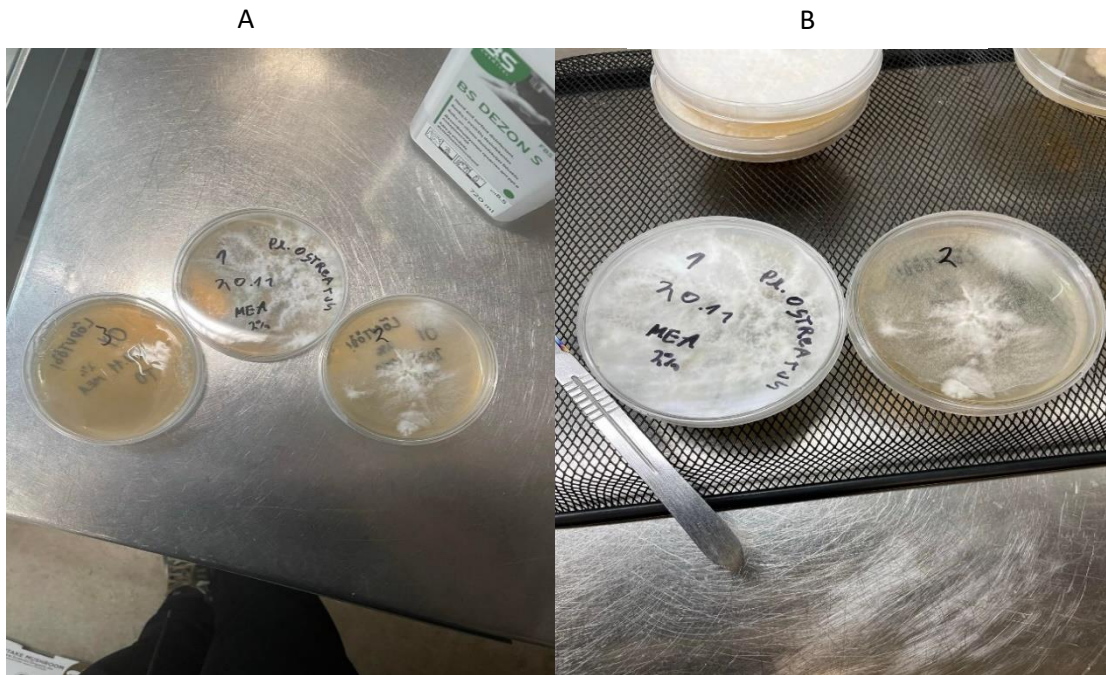
Joonis 5. A ja B. Hõbepaberile kogutud austerserviku eosed (A) ning nendega inokuleeritud Petri tassid (B).

Tabel 4. Petri tassidele märgitud info

Atribuut	Tähendus
Nimi	OY - ingl k. Oyster, ehk austerservik
Kuupäev	20.11 - inokuleerimiskuupäev
Agari tüüp	2% MEA (ingl k. Malt extract agar)
"Transferi" number, ehk mitmes ümberkõlv	T0 (eostest alustatud, T1 oleks sellelt Petri tassilt uuele söötmele viidav mütseeliproov, T2 omakorda sealt edasi viidav mütseeliproov jne.
Muud märkmed	Lõputöö

Austerservikuga inokuleeritud petri tassidele pandi parafilm ümber ning jäeti hea õhuringlusega ruumi, temperatuuril (22-25°C) seisma kolmeks nädalaks, et mütseel saaks kasvada ja areneda.

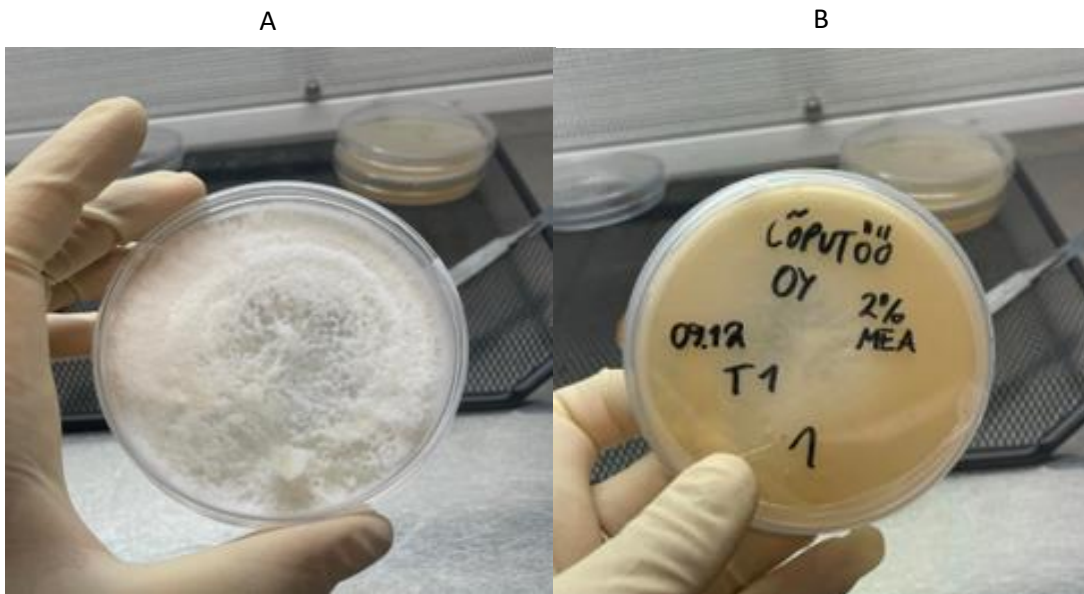
Austerserviku eostega inokuleeriti esialgu 3 Petri tassi ja uuriti, milline neist kolmest oleks parim kandidaat, mida kasutada edasistes etappides.



Joonis 6. A ja B. Austerserviku mütseeli areng peale kahte (A) ja kolme (B) nädalat.

Peale kolme nädalat olid Petri tassid number 1 ja 2 hea kasvuga, aga number 3 petri tassil oli arvatavasti mingi muu organism kasvama hakanud ning see visati peale teist nädalat juba ära. Edasisteks etappideks valitud Petri tassiks osutus petri tass numbriga 1, sest sellel tundus olevat palju kiirem ja agressiivsem kasv võrreldes number 2-ga.

Kui viia kohe TO petri tass edasisele meediumile kasvama, ei tea kas meil on seal ka mingeid konkureerivaid hallitusi või muid organisme peidus. Petri tassilt number 1 tehti ümberkülv ning lasti sellel inkubeerida samadel eelnimetatud tingimustel.



Joonis 7. A ja B. *Transfer 1* (T1) ehk esimene ümberkülvi Petri tassi pealt (A) ja alt (B) vaadatuna.

Transfer 1 tehti 09.12.2021 ning sellise ühtlase mütseeli tekkeks, nagu pildil on näha, kulus kokku 11 päeva. Kui enne kulus plaadi täielikuks koloniseerimiseks mütseeliga 3 nädalat, siis nüüd alla 2 nädala. Põhjuseks oleks, et esialgu pidid eosid idanema ning fuseeruma ja alles arenes mütseeli võrgustik. *Transfer 1* puhul nakatatakse aga 2 n mütseeliga, mis tähendab, et fuseerimise protsess jäi täielikult ära. See protsess on identne kloonimisele, aga kloonimise all mõistetakse reeglina mükoloogias koeproovi võtmist seene viljakehalt, mis siis viiakse söötmele kasvama, mitte olemasoleva mütseeli ümberkülvi.

Nüüdseks võiks selle Petri tassi juba järgmisesse etappi viia ning sammukese lähemale viljakeha kasvatamisele. Kui Petri tassil saame me kasvatada 2-mõõtmeliselt ning seda kasutatakse pigem kultuuri puhtuse hindamisel ning puhastamisel ja mütseeli paljundamisel, siis järgmisena peaksime seda mütseeli välja kasvatama mahulisemal söötmel kui selleks on Petri tassil olev MEA sööde.

Järgmises etapis kasutati söötmena niisutatud rukkiterasid. Rukkil (või mistahes teraviljal) saame kasvatada kolmemõõtmeliselt, aga enne mütseeli teraviljale viimist peame täielikult kindlad olema, et seal ei ole ka mingit muud organismi kasvamas. Rukist kasutati just sellepärast, et sellega on varasemalt kokkupuude olnud ning see on ka väga häid tulemusi andnud. Rukis sisaldab kõiki seene poolt lihtsasti seeditavaid süsivesikuid ning on üks kõige usaldusväärsemaid variante mistahes seente kultiveerimisel. Saab ka kasutada muid teraviljalisi, näiteks mais, oder, tatar, jne, aga eelnimetatud põhjustel sai valitud rukis.

Esialgu keedeti rukist 15 minutit ning seejärel pandi toatingimustes kuivama (22-25°C, hea õhuringlus ning õhuniiskus 40% juures) umbes kaheks tunniks. Selle eesmärk on rukkiterade pinnalt vee aurustumine, kuid mitte terast endast. Keetmine muudab rukise pehmemaks ning tagab toitainete kättesaadavuse mütseelile. Liigne vesi aga rukise pinnal on kontaminatsioonivektoriks ning see vähendab tõenäosust, et mütseel edukalt kasvab. Samuti kui keeta rukist vähem kui 15 minutit, jäävad

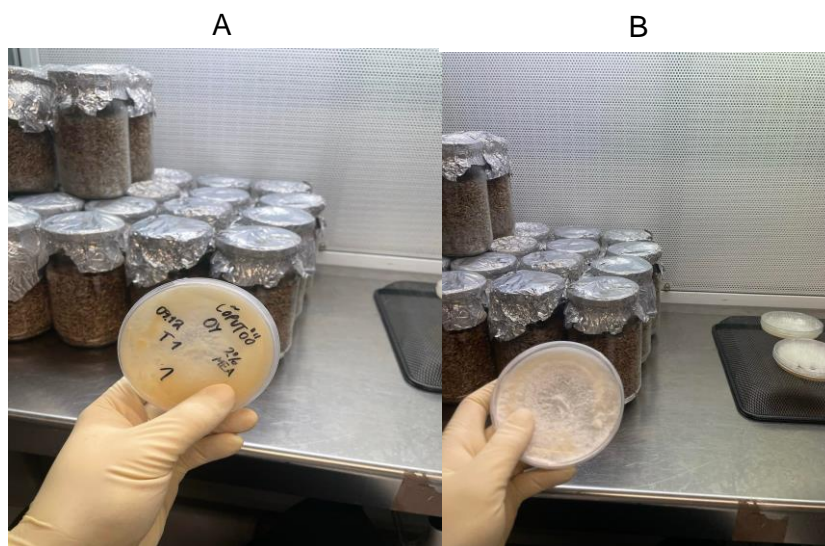
rukkiterad kõvaks ning mütseelil on raskusi tungida läbi rukkiteri ümbritsevat kesta, et vajalikud toitained kätte saada. Rukise optimaalne niiskusesisaldus peaks olema 45%-55% vahemikus mütseeli arenguks, antud diplomitöös oli rukise niiskusesisaldus 58%. Liiga vähene niiskusesisaldus tähendab aeglast mütseeli arengut ning kui see oleks liiga suure niiskusesisaldusega, siis oleks soodsad tingimused mingi muu organismi kasvuks [25].

Seejärel viidi hüdreeritud rukis modifitseeritud kaantega purkidesse. Purgid täideti $\frac{3}{4}$ oma mahust rukkisega, et pärast oleks mütseeli poolt kokkupõimitud rukkiteri lihtsam eraldada üksteisest.

Peale rukise modifitseeritud kaanega purkidesse viimist, suleti purgid tihedalt ning kaanele pandi hõbepaberist mütsike peale, mis takistab kondensaadi sattumist purgi kaanele autoklaavi seintelt ning filtrina käituvat vati märgumist. Rukkiteri autoklaaviti 1.5 h, autoklaavi töö rõhul 1 bar, temperatuuril 121°C, et tagada täielik steriilsus meediumis.

Peale autoklaavimise protsessi lõppu oodati umbes 20 tundi, kuniks autoklaavitav meedium oli täielikult maha jahtunud, et neid austerserviku mütseeliga inokuleerida. Kui oleks koheselt peale autoklaavimist inokuleerinud, oleks rukkiterad liiga kuumad olnud ning austerserviku mütseel oleks kuumašoki tõttu ära surnud ning kasutuskõlbmatuks muutunud.

Autoklaav viidi töötava, eelnevalt 70% isopropanooliga töödeldud ning UV-steriliseeritud, laminaarkapi ette, purgid võeti ettevaatlikult autoklaavist välja ning pandi laminaarkapi alla.

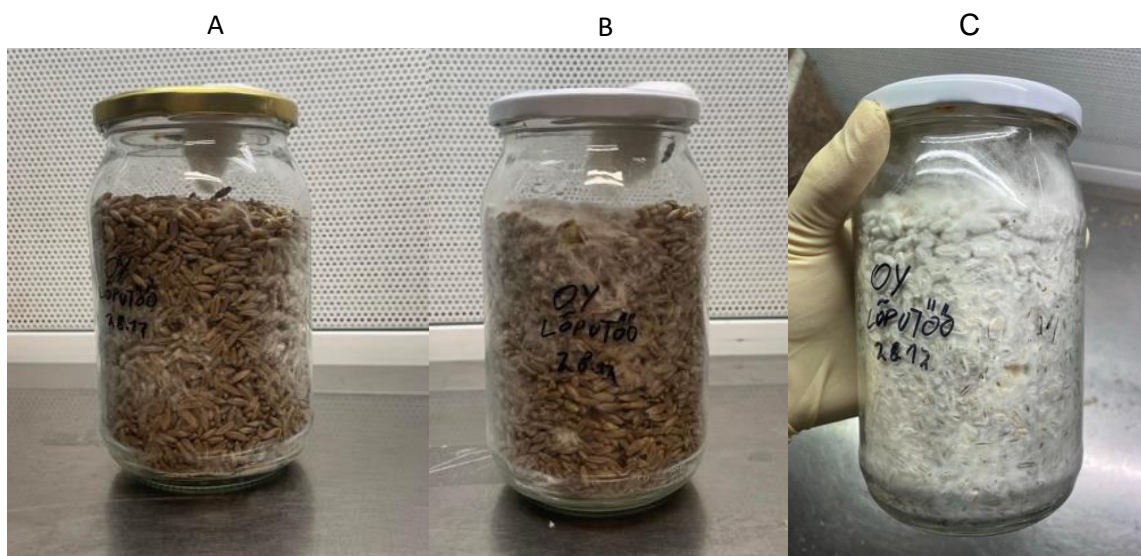


Joonis 8. A ja B. Täielikult koloniseerunud Petri tass alt vaadatuna (A) ning pealt vaadatuna (B), enne sellega rukkiterade inokuleerimist.

Enne töö alustamist võeti Petri tass koos kultuuriga ning see pihustati üle 70% isopropanooliga, samuti pandi valmis ka skalpell ning gaasipõleti, millega siis skalpelli peale igat proovi võtmist steriliseeriti.

Ühe austerservikuga koloniseerunud Petri tassi kasutati kolme purgi inokuleerimiseks. Skalpelliga lõigati petri tassil olev meedium kolmeks ning need omakorda väiksemateks tükkideks ning viidi purkidesse, et steriliseeritud rukkiteradega purgis oleks mitu inokulatsioonipunkti. See kiirendab inokulandi (steriliseeritud rukkiterad) koloniasitsiooniaega austerserviku mütseeliga ning see omakorda mütseeli kasvu efektiivsust.

Inokuleeritud purgid pandi inkubeerima samadel tingimustel, milles Petri tassid olid- 22-25°C juures, hea õhuringlusega ruumis, õhuniiskusel 50%.



Joonis 9. A, B ja C. Austerserviku kasv 13 (A), 15 (B) ja 30 (C) päeva peale inokulatsiooni (28.12.2021-27.01.2022)

Täielik kolonisatsioon steriliseeritud rukkiteradel võttis aega 30 päeva (28.12-27.01). Nüüdseks ajahetkeks on mütseelil omastatavad toitained rukkiteradest kõik omastatud ning need tuleks edasi viia sobilikku substraati viljakehade tekkeks. Viljakehad saaks ka esile kutsuda otse purgist kui värske õhu kogust suurendada (näiteks kaan pealt ära võtta), aga kuna tegemist mütseeli kasvuks sobiva toitainelise keskkonnaga, siis sellel keskkonnal seente saagikus on halb võrreldes optimaalsega, milleks on surnud lehtpuu.

Kuna austerservik on oma olemuselt saprofiilne seen ning eelistab oma kasvuks lehtpuid, siis sai sobilikuks substraadiks valitud pöõgi saepuru, mida siis rikastati põhugraanulitega. Põhugraanulid, peale selle, et need veidikese toitaineid lisavad substraati, aitavad kaasa ka substraadi struktuurile, et substraadis sees toimuks adekvaatsem õhu ringlus. Kasutatud põhugraanulite läbimõõt oli 8,0 mm.

Austerserviku viljakeha koosneb keskmiselt 88,75% veest [23], siis peaks kasutatava substraadi veesisaldus jääma c.a 60-70% veesisalduse juurde kogu substraadi massist. See tagab, et seenel oleks kasvamiseks ja arenemiseks piisavalt vett ning samaaegselt simuleerib looduses olevat surnut puud. Respiratoorsel hingamisel tekib ka vett, aga kuna see ei ole piisav, et substraadis niiskusesisaldust

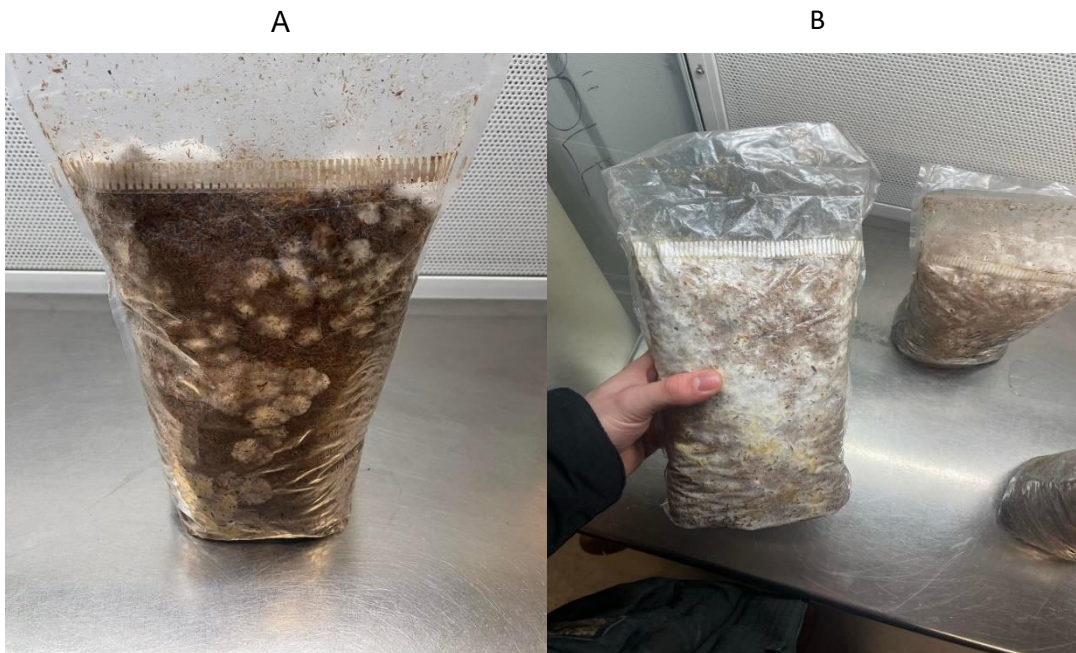
säilitada – aurub ära kiiremini kui tekkida jõuab, peame tagama, et tooraine oleks piisavalt kõrge niiskusesisaldusega, et seenel oleks eluks seda vajalik koguses.



Joonis 10. Substraat filterkotis

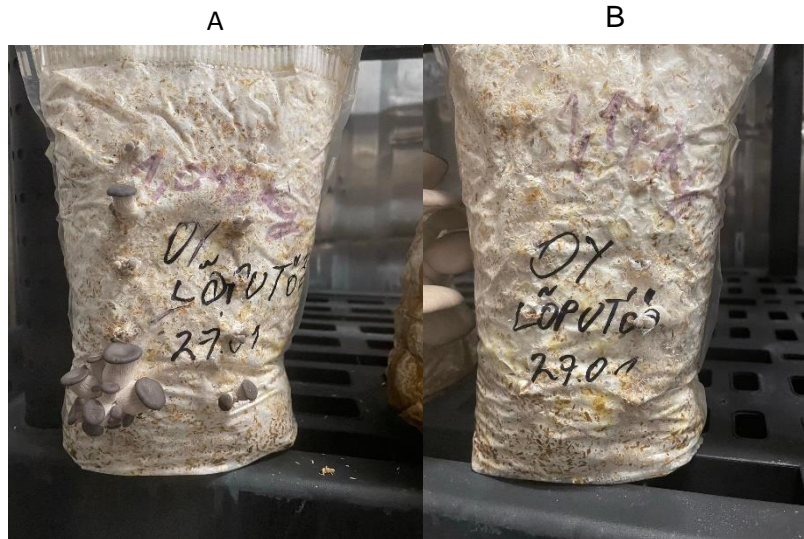
Kotid eemaldati autoklaavist ning asetati eelnevalt 70% isopropanooliga ning UV-kiirgusega töödeldud töötava laminaarkapi alla, kus siis need inokuleeriti eelnevalt nakatatud rukkiteradega.

Kuna purgis olevad rukkiterad on hästi kõvasti kokku põimunud tänu mütseelile, siis tuli need üksteisest eraldada ning seda tehti tagudes purki labakäega. Seejärel töödeldi purgi pind 70% isopropanooliga ning viidi koos substraadi kottidega töötava laminaarkapi alla. Substraadi kott avati ettevaatlikult ning lisati umbkaudselt 6-8% rukkiteri substraadi mahu suhtes, ehk umbes 60-80 g rukkiteri 1 kg substraadi kohta. Seejärel võeti substraadi kotisuu äärtest kinni ning viidi kilekeevitusseadme alla ning kotisuu sulatati kinni. Valmis substraadid muditi läbi, et niiskus oleks ühtlasemalt kotis jaotunud ning ka et rukkiterad oleks võimalikult palju koti eri punktides, et maksimiseerida kotis erinevate kolonisatsioonipunktide arvu. Substraatide kaalud tulid peale inokuleerimist vastavalt 1,04 kg ning 1,10 kg. Valmis “nakatatud” substraadikotid viidi inkubeerima spetsiaalsesse ruumi, kus suhteline õhuniiskus oli stabiilselt 70% peal ning temperatuur 25°C juures.



Joonis 11. A, B. Austerserviku substraat, mis on 5 päeva koloniseerunud (A) ning täielikult koloniseerunud austerserviku substraat 14 päeva peale inokuleerimist (B).

Substraadid koloniseerusid vahemikus 27.01.2022 - 10.02.2022 ning peale seda perioodi olid nad valmis viljumistingimustesse viimiseks. Viljumise initsieerimiseks oli lihtsalt vaja suurendada hapniku kättesaadavust mütseelile. Läbi filtrite tulenev hapnik pole piisav, et viljumist initsieerida ning seetõttu sai substraadi kotile paar auku sisse lõigatud noaga, mille tera oli eelnevalt töödeldud 70% isopropanooliga. Substraadid viidi viljumisruumi, kus hoiti suhtelist õhuniiskust stabiilselt 90-95% juures ning temperatuurivahemikuks jäi 20-22°C. Eelnevalt töödeldi ka riuleid, kus seeni kasvatati 3% H₂O₂ lahusega.



Joonis 12. A, B. Substraadid 12 päeva peale viljumise initsierimist. Peale 12 päeva on substraadil A näha seene viljakehade teket, aga substraadil B pole veel silmaga nähtavat seene viljakeha kasvu tekkinud, paralleelkatse.



Joonis 13. A, B. Substraadid 14 päeva peale viljumise initsierimist. Peale 14 päeva on substraadil A näha täiesti küpsed, korjeks valmis, viljakeha, see-eest substraadil B pole veel viljakehad küpseks saanud, paralleelkatse.

Substraadid viljusid vahemikus 10.02.2022 – 24.02.2022. Nagu piltidelt näha, on tulemused väga erinevad üksteisest. Kuigi neil olid täpselt samad kasvutingimused ning identne substraadikooslus, erinevad nende välimus ja saagikus visuaalselt märkimisväärselt.

4. Tulemused ja arutelu

Kogu protsess austerserviku kasvatamisel eosest viljakehani toimus perioodil 20.11.2021 - 24.02.2022, ehk selleks kulus ajaliselt kokku 66 päeva. Reaalset tööd selle aja vältel oli umbes 12 tundi, selle alla lähevad: agari söötme valmistamine, teravilja valmistamine, substraadide valmistamine, erinevatel tasemetel inokuleerimine, jne. Lõviosa ajast moodustas seene koloniseerumise ootamine erinevatel meediumitel (agarisöötme, teraviljal ja substraadil).

Lõppsaagikus kahe paralleelkatsega, mis lähtusid ühest kolooniast:

Tabel 5. Lõppsaagikus.

Substraadi kaal (kg)	Saagikus (kg)	Saagikuse % substraadist
1,04	0,14	13,46%
1,10	0,09	8,18%

Tabel 6. Lõppsaagikus. Kuiva substraadi kohta (substraatides 68% vett).

Substraadi kaal, kuiv (kg)	Saagikus (kg)	Saagikuse % kuivast substraadist
0,62	0,14	22,58%
0,65	0,09	13,85%

Tabel 7. Lõppsaagikus. Kuiv seenemass kuiva substraadi kohta.

Substraadi kaal, kuiv (kg)	Saagikus, kuiv (kg)	Saagikuse %, kuivast viljakeha ja kuivast substraadist
0,62	0,014	6,73%
0,65	0,009	4,32%

Saadud saagikus oli väga kehv, eriti austerserviku kohta, millele anti paberil ideaalsed tingimused kasvaks [26].

Samuti ühest kolooniast lähtunud paralleelkatse tulemused, erinesid substraadilt saadud seened üksteisest eriti märkimisväärselt nii saagikuse kui ka seene üldise profiili poolest (kuju, värvitoon ja mass), kuigi substraadikooslus oli mõlemil substraadil identne.

Üheks põhjuseks saaks tuua selle, et seen, millest eosed võeti oli ise juba metsas geneetiliselt võrdlemisi nõrk. Eoste kasutamine ei ole sama mis kloonimine- seene kloonimisel peaksid selle kasvatatavad järglased olema võrdlemisi identsed seenele, millelt kloon võeti. Eoseid aga saaks võrrelda loto mängimisega- seen võib ööpäeva jooksul välja paisata miljardeid eoseid ning erinevaid eoste paare, mis tekkida saavad on ka umbes samas suurusjärgus. Kõigil nendel eostel on DNA järjestused identsed, aga väikeste nüanssidega, mis siis määravad selle seene iseärasusi- seente suurus, saagikus, kuju, jne. Kui juba esialgu valiti nõrk kandidaat, millelt eosed võeti, siis see juba viib tõenäosuse märkimisväärselt alla, et sealt mingi hea, kommersiaalselt kasutatav kultuur tuleb.

Samas võib ka mingil määral substraadi koostises ning segavuses peituda madal saagikus. Substraadisegu segati käsitsi 30 minutit ning võibolla sattus ühte substraati märkimisväärselt vähem lämmastikuallikana käituvat põhku.

Ning viimaseks kõige tõenäolisemaks põhjuseks on see, et mõlemalt seenepakult sai seened ära korjatud samal päeval. Pildilt on näha kuidas vasakpoolsel seenepakul (1,04kg kaalutisega) on seened täielikult küpsed ning kübarad on hallikaks muutunud. Parempoolsel seenepakul (1,10 kaalutisega) on aga seened veel noored ning kübarad võrdlemisi tumesinakad. Tõenäoliselt oleks ka sellel viljakus suurem olnud, kui oleks veel oodatud mõni päev nende küpsenemiseks.

Samuti annavad reeglina koloniseerunud substraadid 1-5 saaki, mis siis arvutatakse kogu saagikuse protsendi alla. Tehtud töös piirduti ainult ühe saagiga ning tõenäoliselt oleks see saagikus märkimisväärselt kõrgem olnud, aga esimest saaki juba võrreldes teiste kultuuride antud esimese saagiga, oli tulemus suhteliselt maaletu.

Võrreldes kirjandusega, peaks saagikus jääma 75%-200% juurde substraadist (värske seene kaal kuiva substraadi kohta)- küll aga mitme saagi peale kokku. [27]

Teiste olemasolevate austerserviku kultuuridega ei saaks antud tulemust pea üldse võrrelda. Näiteks on Belgia, mütseeli tootva firma, Mycelia poolt aretatud M2191 *Pleurotus ostreatus* keskmine saagikus seni olnud keskmiselt 32,8% substraadi massist esimese saagi kohta identses keskkonnatingimustes (värske seene kaal niiske substraadi kohta). Nendel juhtel on kasutatud aga suurema mahutavusega SacO2 PPD75/REH6/V37*53 autoklaavitavaid filterkotte (8L mahutavusega) ning samuti on nendesse kottidesse 3x rohkem substraati pandud.

Kokkuvõte

Pärnu metsast leitud austerservik sai kasvatatud eostest viljakehani ning seda võiks lugeda tehnilise poole pealt võiduks. Kultuuri kahe paralleelkatse saagikus jäi aga oluliselt madalamaks kui kommertsiaalsetel tüvedel. Iseenesest on see ka loogiline ning tagant järele mõeldes, oodatav. Tulevikus arvatavasti seda kultuuri enam ei kasutata ning kasutatakse edasi kultuure, mis on spetsiaalselt aretatud kommertsiaalseks kultiveerimiseks. Töö sujus algusest lõpuni võrdlemisi edukalt. Kui tavaliselt peale eoste panemist söötmele Petri tassil on ka palju konkureerivaid organisme sellega kaasas: erinevad bakterid, pärmseened, muu kontaminatsioon. Selles töös aga ei olnud ühtegi kontaminatsiooniga seonduvat probleemi, mis on erakordne, sest eosed sai võetud metsas kasvavalt austerservikult.

Töö käigus ei tekkinud ka muid tehnilisi probleeme ning kuna mul oli eelnevalt sellele tööle juba poole aasta jagu kogemust seentega töötamisel, siis said ka tekkinud minoorsed probleemid kiire lahenduse.

Ise olen tööga väga rahul, sest polnud varem sellist pikka ettevõtmist varem teinud kui eosest viljakehani kasvatada seent. Alati on olnud kultuur juba kultuuripangast hangitud, mida siis edasi aretada on saadud.

Abstract

The oyster mushroom, which was collected from a forest in Pärnu, was successfully cultivated from spore to fruit body. From a technical standpoint, it can be considered a win. However, the yield was quite bad, compared to other commercial strains of *Pleurotus ostreatus*. It is also logical and, looking back, expected. In the future, this particular culture will probably no longer be used, and cultures specifically bred for commercial cultivation will continue to be used. The work went relatively successfully from start to finish. Usually, after placing the spores on the medium in the Petri dish, there also come many competing organisms with it, ranging from: various bacteria, yeasts, other contamination. In this work, however, there were no problems related to contamination, which is extraordinary, because the spores were taken from an oyster mushroom which grew in a forest.

No other technical problems arose during the work, and since I already had half a years' worth of experience working with mushrooms prior to this bachelor's thesis, the problems that arose were quickly resolved.

I am very satisfied with the work, because I had never done such a long undertaking before, as growing a mushroom fruit body starting from spores. The culture had always been acquired from a culture bank from a well-established cultivator, which has been then bred further to accommodate it to our conditions.

Tänuavaldused

Suur tänu juhendajatele Toomas Paalme ja Siim Raadik, kes olid nõus juhendaja rolli astuma tehtud bakalaaurusetöös ning parajalt kriitikat jagasid, et lõputöö saaks edukalt tehtud. Suured tänud ka kogu Scandic Organic OÜ kollektiivile, kelle ruumides tehtud lõputöö sai läbi viidud, eriti suur tänu Siim Raadikule, kes esialgu suunas mind, et kuidas üldse praktiliselt seeni kasvatada. Eelnevalt Scandic Organic OÜ ruumidesse sisenedes oli mul ainult teoreetiline osa seente kasvatamisest enam-vähem arusaadav.

Tänan ka veel oma kursusekaaslasid motivatsiooni jagamises ning oma perekonda, kes alati mind jälle töötama surusid, et asi õigeaegselt valmis saaks.

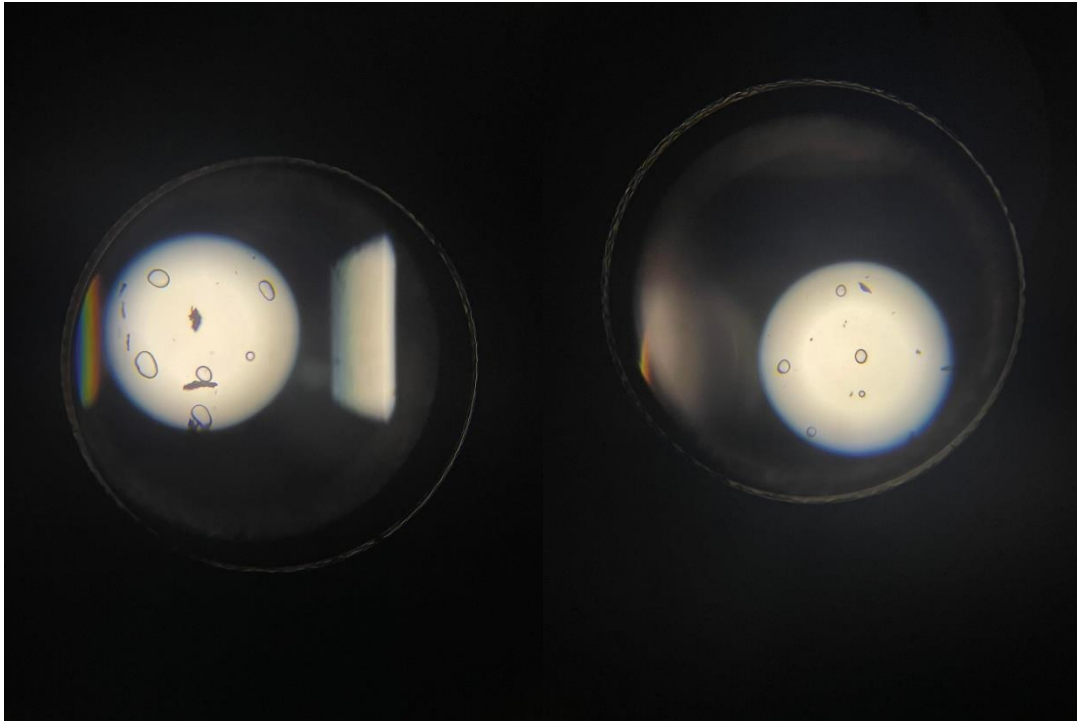
Kasutatud kirjandus

- [1] Lee, C.-H., Chang, H.-W., Yang, C.-T., Wali, N., Shie, J.-J., & Hsueh, Y.-P. (2020). Sensory cilia as the Achilles heel of nematodes when attacked by carnivorous mushrooms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201918473. doi:10.1073/pnas.1918473117
- [2] Rhodes, Christopher J. (2014). "Mycoremediation (bioremediation with fungi) – growing mushrooms to clean the earth". *Chemical Speciation & Bioavailability*. 26 (3): 196–198. doi:10.3184/095422914X14047407349335. ISSN 0954-2299. S2CID 97081821.
- [3] Brown, K. (2004). *Penicillin Man: Alexander Fleming and the Antibiotic Revolution*. Stroud, Gloucestershire: Sutton Pub. ISBN 0750931523.
- [4] Classifications of Fungi – Introductory Biology: Evolutionary and Ecological Perspectives (umn.edu). The five true phyla of fungi are the Chytridiomycota (Chytrids), the Zygomycota (conjugated fungi), the Ascomycota (sac fungi), the Basidiomycota (club fungi) and the recently described Phylum Glomeromycota (Figure 1).
- [5] Schoch, et al. (2009). "The Ascomycota Tree of Life: A Phylum-wide Phylogeny Clarifies the Origin and Evolution of Fundamental Reproductive and Ecological Traits". *Systematic Biology*, Volume 58, Issue 2, p. 224-239. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syp020>.
- [6] Rivera-Mariani, F.E.; Bolaños-Rosero, B. (2011). "Allergenicity of airborne basidiospores and ascospores: need for further studies". *Aerobiologia*. p. 83–97. doi:10.1007/s10453-011-9234-y.
- [7] Wong. (2003). "Spore Dispersal in Fungi". botany.hawaii.edu. University of Hawaii, Mānoa Botany Department.
- [8] Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA (2008). *Dictionary of the Fungi* (10th ed.). Wallingford, UK: CAB International. ISBN 978-0-85199-826-8.
- [9] Stewart (2020), *The Fungus Files*, 2nd ed. p. 37 "Wheel of life", https://namyco.org/docs/The_Fungus_Files.pdf.
- [10] Varghese, R., Dalvi, Y. B., Lamrood, P. Y., Shinde, B. P., & Nair, C. K. K. (2019). Historical and current perspectives on therapeutic potential of higher basidiomycetes: an overview. *3 Biotech*, 9(10). doi:10.1007/s13205-019-1886-2.
- [11] Carod-Artal, F. J. (2015). Hallucinogenic drugs in pre-Columbian Mesoamerican cultures. *Neurología (English Edition)*, 30(1), 42–49. doi:10.1016/j.nrleng.2011.07.010.

- [12] Valverde, M. E., Hernández-Pérez, T., & Paredes-López, O. (2015). Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life. *International Journal of Microbiology*, 2015, 1–14. doi:10.1155/2015/376387.
- [13] International Narcotics Control Board. (2003). "List of psychotropic substances under international control".
- [14] Wong, K.-H., Naidu, M., David, R. P., Bakar, R., & Sabaratnam, V. (2012). Neuroregenerative Potential of Lion's Mane Mushroom, *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. (Higher Basidiomycetes), in the Treatment of Peripheral Nerve Injury (Review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 14(5), 427–446. doi:10.1615/intjmedmushr.v14.i5.10.
- [15] Lu, Y., Jia, Y., Xue, Z., Li, N., Liu, J., & Chen, H. (2021). Recent Developments in *Inonotus obliquus* (Chaga mushroom) Polysaccharides: Isolation, Structural Characteristics, Biological Activities and Application. *Polymers*, 13(9), 1441. doi:10.3390/polym13091441
- [16] National Cancer Institute, US National Institutes of Health. (2020). "Turkey tail and polysaccharide-K", https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/cam/hp/mushrooms-pdq#_7.
- [17] Drugs.com. 2020."Turkey tail", <https://www.drugs.com/npp/turkey-tail.html>.
- [18] Memorial Sloan Kettering Cancer Center. (2021). "Coriolus versicolor", <https://www.mskcc.org/cancer-care/integrative-medicine/herbs/coriolus-versicolor>.
- [19] Habtemariam, S. (2020). *Trametes versicolor* (Synn. *Coriolus versicolor*) Polysaccharides in Cancer Therapy: Targets and Efficacy. *Biomedicines*, 8(5), 135. doi:10.3390/biomedicines8050135
- [20] Tilak, Shantanu (2019). The Shiitake Mushroom-A History in Magic & Folklore". *The Mycophile*. Vol. 59, no. 1. pp. 1, 4.
- [21] Spencer DM, et al. (1985). "The mushroom—its history and importance". *The Biology and Technology of the Cultivated Mushroom*: Chichester, p. 1-8.
- [22] USDA National Nutrient data base, Oyster mushroom nutrition (*P. ostreatus*), fresh, values per 100 g, <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/168580/nutrients>.
- [23] Tolera, K. D., & Abera, S. (2017). Nutritional quality of Oyster Mushroom (*Pleurotus Ostreatus*) as affected by osmotic pretreatments and drying methods. *Food Science & Nutrition*, 5(5), 989–996. doi:10.1002/fsn3.484
- [24] Muntions Applications Database, Organic Spraymalt Light, Nutritional information, <https://app.muntions.com/customer/products/organic-spraymalt-light>.

- [25] Stamets. (1993). *Growing gourmet and medicinal mushrooms*, 1st ed., p. 129 “Formulas for creating grain spawn”.
- [26] Stamets. (1993). *Growing gourmet and medicinal mushrooms*, 1st ed., p. 317 “Substrates for Fruiting”.
- [27] Stamets. (1993). *Growing gourmet and medicinal mushrooms*, 1st ed., p. 312, “Yield potentials”.

Lisa 1



Joonis 14. Austerserviku eosed mikroskoobi all

Lisa
rektori 07.04.2020 käskkirjale nr 1-8/17

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks¹

Mina Carlos-Christian Künnapas

1. Annan Tallinna Tehnikaülikooliletasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose Austerserviku (*Pleurotus ostreatus*) kultiveerimine eostest viljakehani,

mille juhendaja on Toomas Paalme,

1.1 reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

11.01.2023

¹ Lihtlitsents ei kehti juurdepääsupiirangu kehtivuse ajal vastavalt üliõpilase taotlusele lõputööle juurdepääsupiirangu kehtestamiseks, mis on allkirjastatud teaduskonna dekaani poolt, välja arvatud ülikooli õigus lõputööd reprodutseerida üksnes säilitamise eesmärgil. Kui lõputöö on loonud kaks või enam isikut oma ühise loomingu tegevusega ning lõputöö kaas- või ühisautor(id) ei ole andnud lõputööd kaitsvale üliõpilasele kindlaksmääratud tähtajaks nõusolekut lõputöö reprodutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktidele 1.1. ja 1.2, siis lihtlitsents nimetatud tähtaja jooksul ei kehti.