

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ ОВОЧІВНИЦТВА І БАШТАННИЦТВА

МЕТОДИКА  
наукових  
досліджень  
у **ГРИБІВНИЦТВІ**

*За редакцією  
академіка НААН  
В. В. Хареби*

Київ-2022

УДК 001.89:635.8

М 54

*Рекомендовано до друку  
Вченою радою Інституту овочівництва і баштанництва НААН  
21 січня 2022 р. (протокол №1)*

Рецензенти:

**В. В. Волкогон** – доктор біологічних наук, професор, академік НААН,  
завідувач відділу сільськогосподарської мікробіології  
(*Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва*);

**С. А. Вдовенко** – доктор сільськогосподарських наук, професор, професор  
кафедри садово-паркового господарства, садівництва та виноградарства  
(*Вінницький національний аграрний університет МОН України*);

**Т. В. Парамонова** – доктор сільськогосподарських наук,  
заступник директора з наукової роботи  
(*Інститут овочівництва і баштанництва НААН*)

**Методика наукових досліджень у грибівництві;** за редакцією академіка НААН Хареба В. В. / Автори: Бандура І. І., Бісько Н. А., Хареба В. В., Куц О. В., Хареба О. В., Цизь О. М., Кулик А. С. Київ, 2022. 128 с. [Methodology of scientific research in mushroom cultivation. Edited by Academician of the NAAS Khareba V. / Authors: Bandura I., Bisko N., Khareba V., Kuts O., Khareba O., Tsyzy O., Kulyk A. Kyiv, 2022. 128 p.]

**ISBN**

Викладено основи дослідної справи й особливості проведення дослідів у грибівництві. Описано загальні вимоги щодо організації досліджень за інтенсивних методів культивування грибів, методи дослідження елементів технології грибівництва, особливості проведення дослідження з чистою культурою та методи виготовлення і дослідження посівного матеріалу. Описано методи підготовки, аналізу та інтерпретації одержаних наукових даних у грибівництві, порядок ведення документації та звітності.

Методика розрахована на наукових працівників, викладачів закладів вищої освіти, дослідників, здобувачів освітнього рівня «Бакалавр» і «Магістр».

There were described the basics of research work and features of experiments in mushroom cultivation. The general requirements for the organization of research on intensive methods of mushroom cultivation, research methods for the elements of mushroom growing technology, features of conducting research with pure culture, and methods of manufacturing and researching seed material were shown as well. Also, there were described the methods of preparation, analysis, and interpretation of scientific data obtained in mushroom cultivation, and the procedure for keeping documentation and reporting.

The methodology is intended for researchers, teachers of institutions of higher education, and graduates of the «Bachelor» and «Master's» educational levels.

**УДК 001.89:635.8**

© І. І. Бандура, Н. А. Бісько, В. В. Хареба,  
О. В. Куц, О. В. Хареба, О. М. Цизь,  
А. С. Кулик, 2022

© Інститут овочівництва і баштанництва  
НААН, 2022

ISBN

# Зміст

Перелік умовних скорочень.....	5
Терміни.....	7
ПЕРЕДМОВА .....	10

## Розділ 1

<b>Мета та завдання досліджень .....</b>	<b>13</b>
--	-----------

## Розділ 2

<b>Загальні методи дослідження грибів як об'єкта штучного вирощування .....</b>	<b>15</b>
2.1. Особливості експериментів за дослідження екстенсивних методів вирощування грибів .....	18
2.2. Загальні вимоги щодо організації досліджень за інтенсивних методів культивування.....	19
2.3. Складання схеми дослідіу .....	21

## Розділ 3

<b>Методи досліджень елементів технології грибівництва .....</b>	<b>29</b>
3.1. Методи виділення чистої культури шапинкових грибів.....	29
3.2. Методи роботи з чистою культурою грибів.....	32
3.3. Методи виготовлення посівного матеріалу .....	46
3.4. Методи виготовлення субстратів.....	53
3.5. Методи визначення показників мікрокліматичних умов .....	61
3.6. Методи фізичного та хімічного аналізу сировини, субстратів, готової продукції грибівництва.....	63
3.7. Методи мікробіологічного оцінювання якості рослинної сировини, води та субстратів .....	84

## Розділ 4

<b>Методи дослідження біологічних та екологічних особливостей культури</b> .....	87
4.1. Морфологічні показники культури.....	87
4.2. Екологічні особливості культури.....	89

## Розділ 5

<b>Методи оцінювання умов та тривалості зберігання грибів</b> ....	91
--	----

## Розділ 6

<b>Методи досліджень з утилізації субстратів</b> .....	94
--	----

## Розділ 7

<b>Особливості підготовки та інтерпретації даних у грибівництві</b> .....	95
Список використаних джерел .....	100
Додатки .....	108

## Перелік умовних скорочень

- АФВШ – аеробна ферментація у високому шарі, метод термічної підготовки субстратів (твердофазна ферментація) для вирощування грибів роду Глива
- БЕ – біологічна ефективність – відношенням маси свіжезібраних плодових тіл грибів до маси абсолютно сухого субстрату
- БП – біологічна продуктивність – відношення маси свіжезібраних плодових тіл грибів до маси сирого субстрату
- ВЦ – вегетаційний цикл культури
- ВШ – висота шапинки – показник розміру шапинки, який для коректного морфологічного опису карпофорів з оглядом на асиметричність плодових тіл гливи визначали з точки переходу ніжки в шапинку до краю шапинки по прямому вектору від місця кріплення у зростку
- ГА – голодний агар
- ГПДА – глюкозо-пентозо декстриновий агар
- ГРБ – гідролізат рибного борошна – поживне середовище на основі агару та гідролізату рибного борошна та для культивування мікроорганізмів
- КУО – колонієутворююча одиниця, що визначається за пророслою одиничною колонією на щільних поживних середовищах
- МКО – мікроорганізми (бактерії, цвілеві гриби, одноклітинні тварини)
- ПТ – плодове тіло
- РВ – мікрокліматичні режими вирощування (підтримування необхідного рівня температури, відносної вологості повітря, освітлення)
- СР – сухі речовини (маса сухих речовин у субстраті)

- ТВП – тривалість вегетаційного періоду
- ТКС – тривалість колонізації субстрату, кількість діб від інокуляції до повного обростання субстрату міцелієм культури
- ТМ – тривалість морфогенезу
- ТТП – тривалість технологічного періоду ( кілька хвиль плодоношення)
- ТУП – термін утворення перших примордіїв
- ТЦ – технологічний цикл культури
- Ш – шапинка
- ШКС – швидкість колонізації субстрату, кількість діб від інокуляції до повного обростання субстрату міцелієм культури
- ШЛР – швидкість лінійного росту
- ШШ – ширина шапинки; з оглядом на асиметричність шапинки гливи, поняття діаметру шапинки не може задовольнити точному морфологічному опису плодових тіл гливи. За ширину мали показник розміру шапинки за перпендикуляром до вектору ніжки

## Терміни

**Алелопатичні властивості** – здатність грибів виділяти органічні сполуки, що пригнічують проростання, ріст, розвиток і здатність до розмноження інших організмів.

**Аліквота** (від латинського «aliquoties») – кілька разів; кілька частин). В аналітичній хімії А. – точно відмірена кратна частина зразка (об’єм розчину) для аналізу, яка зберігає властивості основного зразка.

**Базидієві гриби** – відділ вищих грибів, у яких вегетативне тіло представлено розгалуженим клітинним міцелієм. Вегетативні клітини гаплоїдні або дикаріонтичні, причому дикаріонтична стадія за тривалістю переважає. Статевий процес – соматогамія. Статеве спороношення – базидія з базидіоспорами. Монадні стадії повністю відсутні.

**Біологічна ефективність** культури – визначається відношенням маси свіжезібраних плодових тіл до абсолютно сухої речовини субстрату.

**Вегетаційний цикл** – кількість днів від дати інокуляції до дати закінчення збирання грибів першої хвилі плодоношення.

**Габітус** – сукупність морфологічних ознак плодового тіла.

**Гіменофор** – спеціалізовані тканини шапинки, звично пластинчастої або трубчастої форми, вкритої шаром гіменію, який складається з циліндричних трохи розширених доверху базидій та розташованих між ними парафіз.

**Зростки** плодових тіл (серед практичного грибовництва є вживаним термін – «друзи» від англ. *clusters*) – зібрані по кілька плодових тіл, що мають єдине кріплення до субстрату.

**Інкубація** – вегетативний розвиток грибної культури до повної колонізації субстратів завдяки створенню необхідних мікрокліматичних умов.

**Інокуляція** – введення чистої грибної культури в субстрат (поживне середовище).

**Карпофор** – плодове тіло гриба.

**Культивар** – від англ. *cultivar*, або різновид, що культивується – *cultivated variety*, за аналогією з сортом рослин – міжнародне визначення штаму, що культивується.

**Культивування грибів** – вирощування культур грибів на штучно виготовлених субстратах у штучно створених мікрокліматичних умовах, або в природних умовах за штучної інокуляції природної рослинної сировини чи ґрунтів до отримання плодових тіл.

**Мікрокліматичні умови** – штучно створені у камерах вирощування: температурний режим, рівень відносної вологості, інтенсивність освітлення, склад повітряної суміші, які задовольняють умовам активного розвитку культури гриба або стимуляції плодоношення.

**Міцелій** (також **грибниця**) – вегетативне тіло грибів, складається з тонких розгалужених гіфів.

**Міцелій посівний (інокулюм)** – вегетативна культура гриба, вирощена на поживному субстраті (рідині; щільному середовищі; зерні; неорганічній основі, збагаченій поживними речовинами; деревині чи рослинних залишках).

**Морфогенез** плодового тіла – сукупність процесів диференціації вегетативних клітин гриба та розвитку плодового тіла від примордія до розміру, що відповідає збиральній стиглості.

**Примордії** – зачатки плодових тіл, які утворюються на міцелії у вигляді ущільнень.

**Продуктивність культури** - визначається за двома показниками: тривалість технологічного циклу та біологічна ефективність.

**Рафлінг** – від англ. *ruffling* – брижіння або гофрування, техніка розпушування компосту або покривного ґрунту на глибину від 10 до 70 мм.

**Скретчинг** – від англ. *scratching* – дряпання, знімання шару повітряного міцелію на поверхні субстрату.

**Субстрат** – поживне середовище для культивування грибів, виготовлене з природних або штучних матеріалів і води різними методами, що передбачають елімінацію конкурентних мікроорганізмів (бактерій та плісневих грибів) та доступність поживних речовин, необхідних грибу для розвитку та утворення плодових тіл.

**Технологічний цикл** – загальна тривалість виробничого процесу грибовиробництва; визначається з дати інокуляції субстрату культурою гриба до дати закінчення збирання врожаю свіжих плодових тіл та утилізації використаного субстрату.

**Урожайність** – відношення маси зібраних грибів до маси субстрату. Звичайно використовують відсотковий показник урожайності (помножують отриманий показник на 100). В іноземних наукових виданнях цей показник виражають у грамах на кілограм субстрату.

**Чиста культура гриба** – вегетативний міцелій, що росте за відсутності інших видів.

**Шапинкові гриби** – це група вищих грибів, характерною ознакою яких є наявність плодового тіла.

**Швидкість колонізації** – кількість днів від інокуляції до повного обростання субстрату міцелієм культури.

**Штам** – чиста культура гриба, виділена з певного природного об'єкта, або отримана методом генної модифікації, що має морфологічні, фізіологічні та екологічні ознаки, які не змінюються при тривалому культивуванні.

---

## ПЕРЕДМОВА

Грибівництво є важливою складовою прикладної мікології, яка вивчає численних представників Царства грибів (*Fungi* або *Mycota*) з погляду їх застосування у галузі сільського господарства, виробництва харчових продуктів та екології. Основним об'єктом наукових досліджень у грибівництві є їстівні та лікарські шапинкові гриби, але додатково вивчаються мікроскопічні цвілі, що є конкурентами або паразитами базидієвих грибів та істотно впливають на ефективність технології їхнього культивування. Предметом грибівництва є процеси промислового вирощування грибів у штучних умовах, післязбиральних процедур та зберігання.

Українці споживають культивовану печерицю двоспорову (*Agaricus bisporus* (J.Lge) Imbach) з 80-х років XX ст., але в останні десять років вітчизняний асортимент їстівних та лікарських грибів, що вирощуються штучно, значно розширився. Опанування інноваційних методів культивування дало можливість грибовиробникам отримувати стабільні урожаї різних, зокрема, екзотичних видів гливи (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., *P. pulmonarius* (Fr.) Quél., *P. eryngii* (DC.) Quél., *P. djamor* (Rumph. ex Fr.) Boedijn, *P. citrinopileatus* Singer), шіітаке (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler), різних видів опеньків (зимового – *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer; тополевого – *Cyclocybe aegerita* (V. Brig.) Vizzini; намяко – *Pholiota nameko* (T. Itô) S. Ito & S. Imai; в'язового – *Hypsizyguis ulmarius* (Bull.) Redhead; букового: білого – *H. marmoreus* (Peck) H. E. Bigelow і темного – *H. tessulatus* (Bull.) Singer); гериція (*Hericium erinaceus* (Bull.) Pers, *H. coralloides* (Scop.) Pers.), лікарських трутовиків або «рейші» (*Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst.; *G. applanatum* (Pers.) Pat.; *G. tsugae* Murrill) та тропічного виду «молочного гриба» (*Calocybe indica* Purkay. & A. Chandra) (*Index Fungorum – Search Page*, б. д.) [1, 2–4]. Нині є реальна можливість подальшого розширення видового різноманіття їстівних та лікарських грибів, що можуть бути введені до промислового

виробництва в Україні, та відповідно, отримання продуктів їх переробки, що мають функціональну харчову цінність завдяки вмісту в плодових тілах унікальних біологічно активних речовин. Поживні та лікарські властивості культивованих грибів неодноразово доведені результатами наукових та практичних досліджень, але відомо, що кількість біоактивних компонентів залежить як від складу природних та штучних субстратів, так і від умов вирощування [5–8]. Враховуючи фізіологічні особливості живлення грибних культур можна прогнозовано підвищувати вміст есенціальних елементів у плодових тілах і так задовольнити потреби населення у мікроелементному живленні [9,10]. Природно, що кожний з видів промислово вирощуваних грибів має певні особливості щодо оптимального складу субстратів, вимог до умов навколишнього середовища, а також індивідуальні характеристики продуктивності, біологічної ефективності освоєння субстратів, морфологічних показників плодових тіл (карпофорів) [11–13].

Відомо, що для отримання плодових тіл видів їстівних та лікарських грибів використовують два методи: *екстенсивний* та *інтенсивний*. *Екстенсивний метод* культивування передбачає вирощування грибів у природних умовах завдяки рахунок закладанню певних ділянок або площ, де культуру гриба до деревини або саджанців додають штучно: інокулюють деревину міцелієм, висаджують саджанці з наявною мікоризою, вносять міцелій мікоризоутворювальних грибів у процесі висаджування саджанців тощо. *Інтенсивний метод* передбачає штучне виготовлення субстратів з доступних рослинних матеріалів та відходів тваринництва, застосування спеціалізованих або пристосованих до штучного вирощування споруд, у яких запроваджуються мікрокліматичні зміни відповідно до фізіологічних потреб культиварів на кожному з етапів життєвого циклу: колонізації субстрату, формування плодових тіл (морфогенезу) та плодоношення [14–16].

Дослідники, що мають за мету вивчення екстенсивних методів культивування грибів, мають враховувати сезонні зміни кліматичних показників навколишнього середовища: температури, відносної вологості повітря, кількості опадів, інтенсивності освітлення, а також характеристики ґрунтів чи породи деревини, де вирощуються гриби.

Слід зауважити, що за умов екстенсивного вирощування відсутня можливість точного прогнозування технологічного циклу культури, біохімічного складу плодових тіл, дослідження стабільності морфологічних ознак тощо. Але екстенсивні методи вирощування – це єдиний шанс отримувати та досліджувати плодові тіла тих цінних видів грибів, які не можна виростити на штучних субстратах завдяки високій фізіологічній залежності від симбіотичних зв'язків з оточуючою біотою (наприклад, гриби роду трюфеля (*Tuber P. Micheli* ex F.H. Wigg.), болетуса або білого гриба (*Boletus edulis* Bull.) та багато інших) [17–19]. Ці види грибів потребують додаткових агротехнологічних випробувань та оптимізації складу ґрунтів, застосування біотехнологій спільного вирощування чистих культур рослин та грибів. Це окремих і дуже цікавий напрям сучасного грибівництва.

Розвиток інтенсивних методів культивування пов'язаний з можливістю використання локальних сільськогосподарських відходів, удосконаленням техніки їх температурної підготовки та механізацією процесів виготовлення штучних субстратів, процесів вирощування, збирання урожаїв та передпродажної підготовки. Окремим напрямом наукових пошуків є дослідження особливостей та умов збереження грибної сировини, її харчової та лікарської цінності [20–22].

Найсучасніший аспект прикладної мікології – застосування грибів у фітодизайні. Але такий наочний та візуально привабливий кластер наукових досліджень потребує врахування високої інвазивності дереворуйнівних грибів та можливості неконтрольованого пошкодження оточуючих садових насаджень.

Отже, дослідження у сфері грибівництва потребують детальної систематизації та розвитку методології. Прогрес у промисловому виробництві їстівних та лікарських грибів потребує змін у наукових підходах до предмету та об'єктів мікологічних досліджень, введення нових практик збирання даних, удосконалення методики експериментальної роботи, опанування нових видів аналізу отриманих даних: генетичних, фізико-хімічних, статистичних тощо.

Слід зазначити, що організація та проведення наукових випробувань у грибівництві потребують знань з математики, фізики, біології, хімії, економічної статистики тощо.

# Розділ 1

---

## Мета та завдання досліджень

Основною метою досліджень з грибівництва є розробка нових та удосконалення наявних технологій ефективного культивування грибів, що мають доведену харчову та лікарську цінність, дослідження впливу складу субстратних композицій та мікрокліматичних умов вирощування на урожайність та підвищення вмісту біоактивних речовин у карпофорах, визначення умов збагачення грибної біомаси есенціальними елементами та вітамінами, встановлення оптимальних для збереження харчової та лікарської цінності параметрів зберігання грибної продукції.

Відповідно до мети досліджень висувуються завдання, виконання яких дає змогу вирішувати поставлені теоретичні та практичні питання.

До теоретичних проблем сучасного грибівництва належать питання проектування та розрахунку ергономічних потужностей для отримання грибної сировини, математичного моделювання та прогнозування продуктивності та ефективності вирощування грибів, розрахунки формул субстратних композицій та прогнозування змін біохімічного складу грибної сировини, отриманої на таких субстратах тощо.

Дослідження практичних питань зводиться до кількох напрямів:

1) удосконалення технологій ефективного культивування грибів: виготовлення елективних субстратів, оптимізація мікрокліматичних умов, моніторинг та профілактика ушкодження грибів шкідниками, апробація методів, що запобігають або зменшують вплив інфекційних хвороб грибів тощо;

2) розширення асортименту культур грибів, що вирощують штучно (гібридизація, скринінг, розроблення технологічних регламентів тощо);

3) дослідження фізіологічних особливостей видів, що є перспективними для культивування, аналіз морфологічних ознак плодових

тіл таких видів, дослідження змін фізіології та морфології штамів, що культивуються, під впливом зовнішніх умов;

4) визначення оптимальних умов збору урожаю та особливостей післязбиральної підготовки, зберігання і первинної переробки грибної сировини;

5) розробка та обґрунтування методів використання, переробки або утилізації відпрацьованих субстратів (для біологічного захисту овочевих та ягідних культур, для годівлі сільськогосподарських тварин, для відновлення ґрунтів тощо).

Окремої уваги потребують напрями досліджень, що утворюються на галузевих перетинах: економічні, фінансові, маркетингові, логістичні, які мають певні особливості, пов'язані з додатковими вимогами харчової безпеки щодо якості та тривалості зберігання грибної сировини.

Інтенсивний розвиток сучасного грибівництва зумовив потреби в науковому обґрунтуванні ефективних методів переробки грибів як джерела біоактивних речовин для розвитку функціонального харчування. Актуальність цього наукового напрямку підтверджується численними роботами та публікаціями вітчизняних та закордонних науковців. Можливість примноження вмісту вітамінів, зокрема групи D, активних глюкозів з імуномодельовальною, онкопротекторною, гіпоглікемічною дією, есенціальних елементів (цинку, селену тощо) у плодових тілах культивованих грибів вже багаторазово доведена [23–27]. Отже, удосконалення методів консервування та розробки ліній виробництва харчових продуктів на основі грибної сировини, пошук оптимальних рішень щодо збереження поживної цінності та лікарських властивостей грибів, умови та особливості збагачення повсякденних продуктів унікальними складовими грибів для надання їм оздоровчих властивостей – це неповний перелік нагальних питань, які необхідно вирішити сучасним дослідникам найближчим часом. Методика дослідної справи у грибівництві тісно пов'язана з методиками дослідження агротехнологій у захищеному ґрунті та методикою досліджень з первинної переробки та зберігання сільськогосподарської продукції [28–30].

## Розділ 2

---

# Загальні методи дослідження грибів як об'єкта штучного вирощування

Гриби, які належать до окремого царства організмів, мають певні особливості будови та розвитку, і тому не можуть вивчатися подібно до рослинних об'єктів овочівництва. Відповідно, методика експериментів з овочівництва захищеного ґрунту, яка звичайно використовувалася для проведення дослідів з грибівництва, має бути істотно доповнена і включати такі методи:

1. **Агротехнічні** – дослідження технічних особливостей виготовлення субстратів, посівного міцелію та покривних матеріалів, методів і режимів інокуляції та інкубації субстратів, режимів та способів нанесення покривного ґрунту та поливів, формування якості плодових тіл упродовж періоду плодоношення, порівняльне вивчення штамів-культivarів та перспективних до введення в культуру штамів як виділених з природних об'єктів, так і отриманих штучно, визначення регламенту вирощування певного виду (штаму) тощо.

2. **Агроексплуатаційні та інженерні** – порівняльне дослідження різних конструкційних рішень для камер вирощування, способів організації та автоматизації мікрокліматичних умов, удосконалення механізації процесів виготовлення субстратів, вирощування грибів, збирання та пакування урожаю тощо.

3. **Агрохімічні** – визначення оптимальних формул субстратних композицій (вмісту та балансу поживних речовин, рН, мінеральних компонентів тощо), аналіз впливу органічних та мінеральних добавок на продуктивність культури, оптимізація складу відпрацьованих субстратів для подальшого використання в агротехнологіях чи для годівлі тварин тощо.

4. **Біохімічні** – дослідження органолептичних показників та біохімічного складу плодових тіл, визначення вмісту біоактивних

речовин та причин і способів їхнього накопичення, аналіз впливу складу субстратів та умов вирощування на зміни біохімічних параметрів плодових тіл, стійкість біоактивних речовин до температурного впливу, зневоднення та умов зберігання тощо.

5. **Агрофізичні** – визначення оптимальних параметрів мікроклімату для культивування певних видів грибів та способів його регулювання, аналіз впливу інтенсивності та спектрів освітлення, фізичних параметрів субстратів і покривних матеріалів, зокрема щільності тощо.

6. **Агробіологічні** – дослідження з біології культур грибів, вивчення культуральних та морфологічних особливостей міцелію, визначення оптимального складу поживних середовищ та умов підтримання життєдіяльності культури впродовж тривалого зберігання тощо. Дослідження культур потребує двоступеневого підходу: *по-перше*, культура вивчається у лабораторних умовах та визначається можливість її багаторазового вегетативного розмноження через різні носії (рідинну культуру, зерновий або синтетичний посівний міцелій) тощо; *по-друге*, вивчається біологія культури в умовах культиваційних камер. Методи розмноження культури та її ефективність у промисловому виробництві визначається такими біологічними методами, як:

а) **фізіологічні** – дослідження фізіологічних особливостей штамів, дослідження факторів, що впливають на зміну стадій розвитку культури гриба та способів їхнього регулювання, впливу хімічних і фізичних особливостей субстратів на ферментативну активність грибів, процеси дихання, накопичення біоактивних речовин тощо;

б) **біометричні** – опис зовнішніх параметрів та визначення варіативності морфологічних ознак штамів, дослідження їхньої стабільності за умов довготривалого культивування, аналіз впливу умов вирощування на параметри плодових тіл, визначення тривалості кожної стадії розвитку культури тощо;

в) **генетичні** – дослідження генотипів сучасних культур грибів та їх генетичних зв'язків, дослідження закономірностей зберігання генетичної інформації та її передачі нащадкам, дослі-

дження залежності проявів спадкової інформації у фенотипі від певних умов навколишнього середовища, встановлення причин змін спадкової інформації та механізмів їх виникнення тощо;

г) **мікробіологічні** – дослідження мікробіологічного складу субстратів та впливу супутньої мікробіоти на розвиток культури грибів, виявлення проявів мікробіологічних захворювань та аналіз способів підвищення резистентності культур грибів до патогенних мікроорганізмів, дослідження біологічного та хімічного захисту культур від мікробіологічних контамінантів – вірусів, бактерій, цвілі.

7. **Економічні** – аналіз ринку грибів, прогнозування варіантів його розширення та дослідження можливостей стабілізації його хвилеподібного характеру, дослідження маркетингових особливостей формування ціни та продажу грибів, вивчення логістики грибного бізнесу, пов'язаної з особливими вимогами до зберігання та транспортування тендітних плодових тіл грибів тощо.

За місцем проведення методи досліджень у грибівництві поділяють на *лабораторні*, *лабораторно-виробничі* та *виробничі*.

Лабораторний метод у грибівництві на відміну від загально-овочівництва має базове значення. Дослідження особливостей культури, умов її зберігання та розмноження, первинний аналіз формул субстратних композицій та можливостей їхнього удосконалення, дослідження ефективності різних способів температурної обробки субстратів, швидкості їх колонізації та багато інших первинних тестів для промислово перспективних культур грибів проводяться у лабораторії. Лабораторний метод досліджень використовують також для визначення характеристик субстратів, мікробіологічних аналізів, для визначення біохімічних параметрів продукції тощо. Для можливості статистичного аналізу отриманих даних лабораторні досліди проводяться у 3–9 кратній повторності, залежно від прогнозованої варіативності даних.

Лабораторно-виробничі досліди проводяться як перехідні до виробничих у 3–6 кратній повторності. Зазвичай, такі досліди проводяться у пристосованих лабораторіях, де перевіряється початковий склад субстратної композиції, її фізичні, біохімічні параметри,

зміни цих параметрів упродовж культивування; максимально відтворюються мікрокліматичні умови, необхідні для розвитку культури; у цих приміщеннях для фіксації показників як оточуючого середовища, так і фізичних параметрів субстратів та вирощеної продукції (ваги, температури) необхідна наявність певного обладнання. Дослідною ділянкою можуть бути як певні об'єми субстратів (кількість субстрату на певну площу або об'єм приміщення), так і одиниці субстрату (блоки, мішки, ящики тощо). Для визначення продуктивності культури проводять збір даних не менш як з 8–10 субстратних одиниць або 8–10 ділянок з визначеною масою (не менше 10 кг субстрату на одній ділянці).

Результати, отримані в лабораторно-виробничому досліді, перевіряють у виробничих умовах. Виробничі досліді проводять з невеликою (25) кількістю варіантів у 3-кратній повторності на порівняно великих площах (мінімально 200 м<sup>2</sup>, максимально – до 1500 м<sup>2</sup>). Такі досліді передбачають урахування загальної маси субстратів у приміщенні, визначення фізичних та хімічних характеристик субстратів (лабораторним методом), моніторинг умов вирощування, визначення маси зібраного урожаю та тривалості загального циклу культури (від розміщення субстрату у приміщенні до збору грибів останньої хвилі плодоношення).

## **2.1. Особливості експериментів за дослідження екстенсивних методів вирощування грибів**

Досліді з аналізу продуктивності культур, морфологічних та фізіологічних особливостей, біохімічного складу плодових тіл за умов екстенсивного методу культивування не можуть бути однофакторними. Такі досліді потребують урахування кліматичних факторів (моніторингу температури зовнішнього середовища, відносної вологості повітря, інтенсивності освітлення, швидкості вітру (за необхідності), кількості опадів тощо), видового складу та властивостей деревини (щільності, структури, вмісту вологи та їх сезонних змін, хімічного складу) для ксилотрофів та характеристику ґрунтів для ґрунтових та підстилкових сапротрофів, мікоризних грибів (рис. 2.1). Такі досліді мають бути довготривалими: не менше трьох

років для визначення ефективності культиварів, а для виявлення загальних тенденцій не менше 10–15 років. Аналіз отриманих даних за таких умов є складним та потребує спеціальних статистичних методів, тому ще на етапі планування дослідів мають бути залучені фахівці, здатні побудувати матрицю таких багатofакторних експериментів та визначити критерії статистичного оцінювання майбутніх даних.



Рис. 2.1. Вирощування гливи на деревині

[Джерело: фото з інтернет-ресурсів]

## 2.2. Загальні вимоги щодо організації досліджень за інтенсивних методів культивування

Інтенсифікація вирощування культури грибів передбачає можливість її культивування у штучних мікрокліматичних умовах з метою збільшення урожайності та біологічної ефективності, а також



Рис. 2.2. Промислове вирощування печериці на компості 4 фази (Champinter, Іспанія)

[Джерело: фото Бандури І. І.]



**Рис. 2.3. Вирощування гливи у пристосованих приміщеннях методом підвішування субстратних блоків**  
(Мелітополь, Україна)

[Джерело: фото Бандури І. І.]

підвішувань) (рис. 2.2–2.3). Системи вентиляції таких приміщень мають забезпечувати постійний рух повітря для активної аспірації як з поверхні субстрату, так і плодових тіл, що розвиваються. За такої вентиляції температура повітря біля підлоги та на висоті 3 м може коливатися до 5 °С. Цей факт зумовлює необхідність рандомізації дослідних ділянок або одиниць субстрату в лабораторно-виробничих дослідах. За можливості експериментальні дані збирають з субстратних одиниць, що розташовані на одному рівні.

Особливим напрямом інтенсифікації грибівництва є скринінг природних штамів видів грибів, що придатні для введення у культуру, а також штучно створених штамів, отриманих методами генетичної модифікації, гібридизації тощо.

Окремою ланкою інтенсивного методу є дослідження способів використання чи утилізації відпрацьованих субстратів.

підвищення кількості технологічних циклів культури впродовж року завдяки скороченню їхньої тривалості. Для такого методу використовуються як спеціалізовані, так і пристосовані приміщення. Для можливості об'єктивного оцінювання впливу певних факторів необхідно враховувати як параметри мікрокліматичних умов (температуру та склад повітря, освітлення тощо), так і якість штучних субстратів (фізичні, хімічні та мікробіологічні показники). Повторення дослідів з визначення впливу певних факторів потрібно проводити в однакових мікрокліматичних умовах та використовувати субстрати з однієї сировини й аналогічного складу. Однією з особливостей культивування грибів є використання полиць (стелажів або

### 2.3. Складання схеми дослідіду

У методиці дослідів з грибівництва, як і в інших методиках з овочівництва, досліді можуть бути однофакторними, коли вивчають лише один фактор впливу, та багатфакторними, коли вивчають два або кілька факторів чи технологічних заходів.

Основні **фактори**, що впливають на ефективність культивування грибів умовно поділяються на 4 групи: **фізичні** (температура, світло, вологість тощо), **хімічні** (рН, вміст органічних та неорганічних компонентів тощо), **біологічні** (особливості фізіології та морфології культури, хвороботворні та шкідливі організми – комахи, гризуни, цвілі тощо), **економічні** (вартість матеріалів та забезпечення умов вирощування, вартість переробки та механізації процесів, сезонне коливання ціни тощо). Для оцінювання впливу факторів використовують розширену систему характеристик культури за показниками, які необхідно фіксувати та аналізувати у необхідному для дослідіу обсязі. Основні з таких показників умовно поділяються на групи:

#### а) *технічні*:

- *швидкість вегетативного розвитку* у міліметрах на добу (мм/доба). У лабораторних дослідіах визначають щоденний (або через рівний проміжок часу) приріст культури, для лабораторно-виробничого та виробничого дослідіів фіксують швидкість розростання міцелію у субстраті від точки інокуляції;

- *тривалість вегетаційного циклу культури* (ВЦ) визначають за кількістю діб від дати інокуляції до дати закінчення збирання грибів першої хвилі плодоношення. Він характеризує швидкість отримання урожаю та дає можливість розрахувати кількість можливих річних циклів у технології вирощування культури;

- *швидкість колонізації субстрату* (ТКС або ШКС) – це кількість діб від інокуляції до повного обростання субстрату міцелієм культури, що характеризується відсутністю не колонізованих (незахоплених) міцелієм ділянок. Цей показник характеризує тривалість підтримання оптимальних умов вегетативного розвитку культури (інкубації). Колонізовані субстрати стають білими (або з відтінком,

що є характерним для вегетативного міцелію певного виду) та щільними. За проведення виробничих дослідів з субстратами, що виготовляються нестерильними методами, можлива наявність ураження конкурентними плісневими грибами, шкідниками або бактеріями. Тоді субстрати мають видимі плями таких уражень. У цьому разі датою визначення терміну повної колонізації субстрату вважається день, коли 90 % субстрату є захопленими культурою гриба. За наявності контамінації більше ніж на 10 % дослідної ділянки експеримент з визначення ефективності вирощування культури не може вважатися проведеним, його потрібно повторити;

- *термін утворення перших примордіїв (ТУП)*. Його визначають за кількістю діб від інокуляції до розвитку зачатків плодових тіл на 30 % субстрату, що досліджується. Цей показник характеризує швидкість переходу культури від вегетативної до генеративної стадії та є необхідним для визначення критичної дати зміни мікрокліматичних умов у камерах вирощування;

- *тривалість морфогенезу (ТМ)* – це кількість діб, що є необхідною для розвитку примордіїв до розміру, який визначений оптимальним для збирання плодових тіл. Він характеризує швидкість досягнення плодовими тілами технічної стиглості та початок хвили плодоношення. Звичайно гриби збирають до початку спороношення (закритий покривалом гіменій), але для деяких видів (глива, опеньок зимовий) цей термін визначити складно, бо гіменій є відкритим. У такому разі контролюють початок спороношення візуально; визначають цей показник для кожної одиниці дослідів за визначеною кількістю повторень, яких має бути не менше п'яти (*Додаток А*);

- *тривалість кожної хвили плодоношення*: у лабораторному – індивідуально для кожної одиниці, у виробничому – визначається доба збору 90 % загального урожаю за хвилию;

- *загальний цикл культури* зазвичай визначають за датою закінчення збору урожаю плодових тіл після 3-х хвиль плодоношення, але цей термін може бути подовжено до 5–6 хвиль;

- *урожайність культури* визначають за відношенням маси зібраних грибів до маси виготовленого субстрату. Виражають у грамах на 1000 г субстрату або у відсотках:

$$Ур = \frac{m_{ep}}{m_{cub}} \times 100 \%,$$

де  $m_{ep}$  – маса зібраних грибів;  $m_{cub}$  – маса субстрату.

Цей показник не враховує технічні показники субстрату (вологість, рН тощо). Для його розрахунку визначають масу субстрату, який закладається на вирощування та масу зібраного урожаю відповідно до варіантів досліду. Для статистичного оцінювання урожаю необхідно мінімум 5 одиниць субстрату (ділянок) на кожний варіант досліду. Урожай грибів звичайно оцінюють за масою грибів по першій хвилі (закінчення вегетаційного циклу), але за необхідності визначають масу грибів, отриманих з кожної окремої хвилі плодоношення. Потрібно враховувати масу всього субстрату, навіть тих одиниць, які були уражені хворобами та видалені з дослідної ділянки. Зрозуміло, що для повної характеристики культури та визначення ефективності її вирощування зазначають всі особливості виготовлення субстратів, кількість внесеного посівного матеріалу, способи інокуляції, можливі причини контамінації та кількість відбракованого субстрату тощо;

- *біологічна ефективність* (БЕ) культури характеризує ступінь використання культурою поживних речовин субстрату, тому розраховується як відношення маси отриманих грибів до маси сухих речовин:

$$БЕ = \frac{m_{ep}}{m_{CP}} \times 100 \%,$$

де  $m_{ep}$  – маса зібраних грибів;  $m_{CP}$  – маса сухих речовин у субстраті.

Цей показник є більш вагомим для визначення особливостей технології культивування, бо враховує показники субстрату, такі як вологість, вміст сухих речовин (СР), водневий показник (рН), кількість мінеральних речовин тощо. Біологічна ефективність є необхідною складовою загальної характеристики нових штамів, перевірки їх на стабільність та доцільність впровадження у промислову культуру (*Додаток Б*). Однак за проведення виробничих дослідів, спрямованих на визначення економічних показників впровадження штаму у промислову культуру за умов використання субстратів

зі стандартизованими показниками, достатньо визначення урожайності штаму. Це спрощує отримання даних, але потребує оцінювання не менше п'яти циклів вирощування у різні сезони або не менше трьох років, якщо культура буде вирощуватися у певний сезон;

- *коефіцієнт втрати маси після очищення* або інспектування отриманої маси грибів (розраховується за відношенням маси очищених (інспектованих) грибів до загальної маси зібраних (з окремої одиниці субстрату, площі, об'єму);

- *коефіцієнт втрати маси при зберіганні*. Особливістю грибів є продовження фізіологічних процесів дихання та спороутворення навіть за умов низьких температур зберігання. Тому для промислового оцінювання культури визначають втрати маси грибів за відношенням маси грибів після певного часу зберігання до маси грибів, закладених у холодильну камеру;

- *коефіцієнт втрати маси за первинної переробки* є додатковою характеристикою культури, що залежить від умов дослідження, і є вагомим показником для впровадження культури у промислове виробництво. Визначається за відношенням маси отриманого продукту (напівфабрикату) до маси сировини (свіжих інспектованих грибів).

#### б) *біологічні* [31–33]:

- тип плодоношення (утворення зростків (друз) або індивідуальні плодові тіла);

- морфологічні ознаки культури (зовнішній вигляд, маса та розміри зростків та окремих плодових тіл, типи розташування гіменофору тощо);

- кількість плодових тіл з одиниці субстрату (окремих або у зростках);

- інтенсивність дихання за культивування та зберігання;

- характеристика ферментних комплексів культури та ферментна активність;

- резистентність або її відсутність до збудників вірусних, бактеріальних або плісневих хвороб, морфологічні або фізіологічні вияви хвороб;

- особливості розвитку шкідників та характерні ушкодження.

в) *хімічні* [34–36]:

- вміст вологи (сухих речовин) у плодових тілах;
- вміст основних та специфічних органічних речовин (протеїнів, ліпідів, карбон-гідратів: екзо- та ендо-полісахаридів, редукованих цукрів, амінокислот та жирних кислот тощо);
- вміст золи та неорганічних елементів, зокрема есенціальних (фосфор, калій, цинк, селен тощо);
- вміст небезпечних елементів (важких металів) та радіонуклідів тощо.

г) *економічні* [37–40]:

- собівартість грибної продукції, складовими якої є загальні витрати на один цикл культури та сукупний дохід виробництва до та після удосконалення технології;
- рентабельність виробництва грибів розраховується як відносний показник прибутковості, що характеризує ефективність запроваджених заходів. Показники рентабельності розраховуються як відношення різноманітних показників прибутку до вкладених коштів на організацію виробництва (спеціалізовані будівлі, сировину для субстратів, садивний матеріал, підтримання мікроклімату, утилізацію відпрацьованого субстрату) та враховують обсяг продаж, використані ресурси, здійснені поточні витрати тощо.

Складання схеми досліду передбачає збір даних за переліченими показниками, кількість яких може бути зменшено або розширено відповідно до мети та завдань досліду.

Як зазначено вище, схема однофакторного досліду у грибівництві передбачає зміну лише одного з параметрів вирощування: однієї складової субстрату чи одного елемента мікроклімату, або дослідження ефективності кількох штамів на субстраті одного складу та в однакових умовах. У таких схемах діє принцип єдиної відмінності, за якої зміна одного фактора відбувається за незмінності всіх інших елементів дослідження. У таких дослідах вивчають не більше 10–12 варіантів з обов'язковим контрольним варіантом, у якому досліджуваний фактор виключено. Для об'єктивного оцінювання отриманих даних статистичними та порівняльними методами у кожному варіанті роблять 3–5 повторень. Наприклад,

дослідження впливу концентрації будь-якого мікроелемента на вегетативний розвиток міцелію передбачає введення в поживне середовище елемента, концентрація якого поступово зростає; вивчення впливу щільності субстратів на продуктивність штаму передбачає використання субстрату одного складу, але ущільненого механічно різною мірою. Звичайно, що матриця для збору даних передбачає врахування результатів з усіх повторень для можливості подальшого статистичного аналізу (*Додаток А*).

Зазвичай, за однофакторних дослідів у грибівництві визначають максимальну кількість характеристик культури за групами для виявлення впливу досліджуваного фактора (див. Додатки А–В, Е–М).

У багатофакторних дослідіах передбачають рівність усіх умов, окрім факторів, що вивчають. Планування таких дослідів передбачає чітке визначення параметрів оцінювання культури, оскільки статистичний аналіз таких дослідів звичайно ускладняється великим масивом даних.

Кількість варіантів у досліді залежить від можливості дослідника підтримувати на всій дослідній ділянці задані умови мікроклімату, одночасність і рівноцінність проведення агротехнічних заходів та облік даних. Тому не рекомендується планувати більше 4 варіантів (1 контрольний та 3 дослідні) у багатофакторних дослідіах.

Досліді у грибівництві звичайно проводять упродовж трьох – п'яти циклів вирощування культури з повторами у різні сезони. Інколи, наприклад, для дослідження стабільності гібрида або визначення змін складу рослинної сировини за роками термін проведення дослідіу подовжується до визначення певних тенденцій або виявлення статистично доведених даних про відсутність впливу досліджуваного фактора. Тому у схемі дослідіу потрібно передбачити можливу пролонгацію, якщо отримані дані не дають чіткої відповіді про наявність чи відсутність впливу фактора.

Для отримання достовірних даних повторення дослідіу у грибівництві є обов'язковим. Кількість повторень, зазвичай, три- або п'ятикратна у лабораторному та лабораторно-виробничому дослідіі, трикратна для виробничих дослідіу в кожному сезоні, але може бути збільшеною за наявності широкої варіативності отриманих даних.

На відміну від методики овочівництва *дослідною ділянкою* у грибовництві є певна маса субстрату, з якої отримують урожай (у лабораторному досліді це може бути від 200 г до 10 кг, у виробничому – не менше 500 кг субстрату на «дослідну ділянку»). Наприклад, для печериці є стандартним розміщення від 80 до 110 кг або 4–5 брикетів на 1 м<sup>2</sup> площі полиць. Для шіїтаке ці показники є значно меншими за необхідності розташовувати невеликі за масою блоки (звичайно від 1 до 4 кг) на відстані 20 см один від одного, що не перевищує 40 кг субстрату на квадратний метр полиці. Кількість полиць у культивацийній споруді залежить від висоти приміщення та ергономічності їхнього обслуговування. Для гливи кількість субстрату на площу споруди залежить від способу розміщення одиниць субстрату (блоків, мішків, брикетів) та наявності системи підтримки мікрокліматичних параметрів і може коливатися від 50 до 150 кг на квадратний метр приміщення. Отже, визначення біологічної продуктивності (урожайності) та біологічної ефективності культури грибів у розрахунку на площу приміщень є непридатним. Ці показники розраховують на масу природних або штучних субстратів, одиниці яких рандомно розміщують у культивацийних спорудах (або виділяють ділянки у природних умовах). Для об'єктивного статистичного аналізу «дослідна ділянка» має складатися з 5–10 таких одиниць субстрату (від 1 до 50 кг) для кожного з варіантів досліді у випадку лабораторних випробувань, а для виробничого досліді загальна маса «ділянки» вираховується від 300–500 кг, що відповідає 30–50 одиницям субстрату для гливи, або за площею полиць, де розміщено від 250 до 550 кг для печериці та інших видів, що культивуються подібним способом (*Додаток В* – схема).

Досліді проводять зі штамми, які депоновано у Національну колекцію культур шапинкових грибів ІВК (Інституту ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України), та штамми, внесеними до Державного реєстру сортів рослин, придатних для поширення в Україні, і рекомендованими для вирощування. Допускається робота з новими штамми, які виділено з природних об'єктів для визначення перспективи введення культури у промислове виробництво. У такому разі обов'язковою є характеристика природного

об'єкта (середовища) із зазначенням географії місця збору плодівих тіл: дата збору; детальні погодні умови; вид(и) рослин(и), з якого(яких) зібрані плодіві тіла; приблизний вік рослин(и); стан деревини тощо.

Визначення промислової стабільності нової культури та її характеристики завжди проводять за порівнянням з контрольним штамом, депонованим до колекції ІВК або внесеним до Державного реєстру сортів рослин, придатних для поширення в Україні, або культурою з вивченими характеристиками, результати яких було опубліковано у фахових наукових виданнях.

Контрольними варіантами субстратних композицій можна вважати ті, що були попередньо досліджені, а результати опубліковано у рецензованих наукових журналах. За контрольні мікрокліматичні умови приймають рекомендовані фірмою виробником посівного матеріалу культури або визначені як оптимальні попередніми дослідженнями, що підтверджені публікаціями у фахових виданнях.

## Розділ 3

---

# Методи досліджень елементів технології грибівництва

Методи, що використовують у грибівництві, передбачають роботу: з чистою культурою гриба; посівним матеріалом, що використовується для інокуляції субстратів та звичайно називається «посівний міцелій»; субстратами для отримання біомаси або плодових тіл грибною культурою; безпосередньо з плодовими тілами та продуктами переробки грибів. За проведення досліджень та застосування стандартних агротехнологічних методів потрібно враховувати біологічні особливості культур грибів, які є аеробними гетеротрофними організмами, що живляться органічними сполуками, тому можуть мати патогенний, нейтральний або взаємовигідний симбіоз із рослинами, тваринами та мікробами. Гриби утворюють біомасу міцелію через колонізацію субстратів за допомогою гіф різної товщини та довжини. Ростуть гіфи апікально, можуть розгалужуватися, формуючи тримірну мережу. Розміри колоній грибів можуть варіювати у межах від мікрметра до кількох кілометрів.

### 3.1. Методи виділення чистої культури шапинкових грибів

Отримання чистих міцеліальних культур здійснюють методом виділення тканин з плодових тіл або пророщуванням спор.

Для виділення чистої культури з плодових тіл грибів їх збирають у стадії технічної стиглості, коли тканини достатньо пружні. Якщо гриби забруднені залишками субстрату, або рослинних часток, їх обов'язково промивають у проточній воді. Промивання роблять швидко, щоб запобігти насиченню тканин водою. Потім ополіскують плодове тіло стерильною водою та підсушують на паперових рушниках (серветках, фільтрувальному папері). Підсушений від

залишків вологи гриб протирають розчином спирту (70 %). Інколи, при серйозному забрудненні, плодове тіло протирають підпаленою бавовною, попередньо змоченою у спирті (96 %). Плодове тіло, що обробляється, та смолоскип з бавовни утримують спеціальними кліщами.

Підготовлений зразок розламують, за допомогою стерильного скальпеля, ланцета або спису акуратно вирізають шматочок тканини з м'якоти гриба (шапинки або ніжки), не торкаючись поверхні гриба, та переносять на стерильне поживне середовище. Краще обирати найтовщу частину плодового тіла.

Виділення тканин у грибів з тонкими та маленькими плодовими тілами провести складно. Тому їх додатково занурюють у свіжовиготовлений розчин перекису водню (5 %) та вирізають досить великий шматок плодового тіла від 5 до 15 мм у діаметрі. Звичайно, для роботи з такими грибами готують спеціальні поживні середовища з додаванням антибіотиків (пеніцилін – 200 од. в 1 мл; ампіцилін – 1 г на 1 л поживного середовища), щоб запобігти розвитку бактерій, або підкислюють його до рН 4,5–5,0 лимонною або оцтовою кислотою.

Дуже часто разом з виділеною культурою починають рости колонії плісневих грибів. У такому разі їх потрібно чистити методом пересіву з обов'язковим мікроскопічним контролем.

Для виділення культур з повільно ростучих видів, шматочок тканини спочатку розміщують у стерильній чашці Петрі на клаптику зволоженого фільтрувального паперу, так званій «вологій камері». Після появи повітряних гіф на поверхні шматочка, його переносять на поживне середовище.

Пророшують виділені культури зазвичай за температури 26–28 °С, але деякі види потребують попереднього витримування у холодильнику (4–10 °С) в умовах «вологої камери».

Деякі види дуже складно виділити у чисту культуру наведеним методом, тому використовують посів спорами. Для цього шапинку або частину шапинки у великих плодових тіл, або декілька шапинок для маленьких грибів приліплюють до кришки стерильної чашки Петрі за допомогою вазеліну або двостороннього скотчу. Агарове середовище розливають в інші чашки Петрі і потім на 5 хв

замінюють кришки на попередньо підготовлені, з прикріпленими шапинками. За цей час на поверхню чашки висипається від 100 до кількох тисяч базидіоспор.

Більш детально виділення чистих культур розглядається у монографії «Вищі їстівні базидіоміцети в поверхневій та глибинній культурі» [41].

Зберігають більшість чистих культур грибів в активному стані за температури 2–4 °С, але деякі види: *Agaricus blazei* Murrill; *C. indica*; *P. djamor*; *Volvariella volvacea* (Bull.) Singer та багато інших, що ростуть у природі в умовах високих температур (26–36 °С) потрібно підтримувати за температури не нижче 10–15 °С. Режим проведення пересівів (пасажів) регламентується умовами зберігання та особливостями культури і становить від 3 до 24 місяців.

Деякі недорогі методи зберігання, такі як зберігання в дистильованій воді або силікагелі, є допустимими, якщо це задовольняє завдання дослідження. Максимальна тривалість зберігання варіює у кожному окремому методі і залежить від видових особливостей. За можливості, штами грибів мають бути збережені одним з довгострокових методів: ліофілізація або кріоконсервація. Довготривале зберігання особливо актуальне для штамів з критично важливими характеристиками або для типових зразків.

Кожний штамп у колекції культур повинен мати інформацію за такими пунктами:

- 1) номер за порядком;
- 2) рід;
- 3) вид;
- 4) різновид (назва) штаму;
- 5) таксономічне джерело (посилання на протокол ПЛР аналізу чи ключі визначення);
- 6) вимоги до умов вирощування;
- 7) дата ізоляції;
- 8) місце ізоляції;
- 9) назва субстрату або організму, з якого було отримано культуру для виділення;
- 10) дані на особу, яка виділила культуру (ПІБ, місце роботи, координати та ін.);

11) походження штаму (наприклад, ізольований Грегорі А., у 2021 р., або номери ізоляту в інших колекціях, з яких отримано штаму);

12) дані про особу, яка ідентифікувала штаму;

13) дані про особу (якщо є), хто зробив це повторно;

14) синоніми суб'єкта колекції (інші імена), якщо є;

15) інша корисна інформація, що могла б підтримати включені опубліковані посилання про ізоляти, утворені метаболіти, зміни і т. д. Спосіб зберігання кожного штаму також записується зазвичай в розділених базах даних, описується процедура довготривалого зберігання штаму, номери послідовних копій – пасажів, дати їх проведення, результати тестів життєздатності організму. На додаток, якщо культура знаходиться в загальнодоступному користуванні, корисно зберегти інформацію про відповідальних осіб лабораторій, кому були надіслані копії [42].

## 3.2. Методи роботи з чистою культурою грибів

**3.2.1. Дослідження вегетативного росту наземних міцеліальних грибів в умовах штучної культури** коректно проводити на щільних агаризованих середовищах, оскільки такий спосіб культивування є досить наближеним до умов росту цих грибів у природі. Щільні поживні середовища широко застосовуються для інтродукції макроміцетів у культуру, збереження їх у колекціях і під час проведення культуральних, морфологічних та інших експериментальних досліджень. Такі середовища певного складу використовують у виробництві посівного міцелію на стадії виготовлення інокульому або так званої «маточної культури» [41].

Рецептура поживних середовищ складається так, щоб забезпечити культуру необхідними для росту елементами. Для підтримання життєздатності та активного розвитку культури застосовують різноманітні рецепти (табл. 3.1), але у дослідженнях, які спрямовані на визначення певних закономірностей, потрібно використовувати стандартизовані та описані у науковій літературі середовища.

Таблиця 3.1. Рецептури поживних середовищ\*

Складові	Кількість, г	Нотатки щодо особливостей виготовлення
1	2	3
<b><i>R7 (для сапрофітних видів)</i></b>		
Вода (H <sub>2</sub> O)	500	
Магнію сульфат безводн.	0,25	
Агар-агар	8,5	
Вугілля активоване (порошок)	1,25	
Гумус (порошок)	2,5	
Солодовий екстракт (порошок) <b>скорочення – СЕ</b>	12,5	
Гідроксид калію КОН (1%)	10 мл	
<b><i>Середовище з антибіотиком (АВ)</i></b>		
H <sub>2</sub> O	500	<b>Антибіотики додаються після стерилізації середовища у кількості:</b> 500 мг на 500 мл розчину 1) перетерти антибіотик у порошок у стерильному посуді в асептичних умовах; 2) додати 10–15 мл стерильної води; 3) ретельно перемішати; 4) охолодити середовище до ~ 50–60 °С, додати антибіотик; 5) ретельно перемішати, розлити у чашки Петрі.
Pre-mixed АВ (або будь-яке поживне середовище, що застосовується у дослідженні з стандартизованим складом)	25 (за рецептом)	
<b>Levaquin (левофлуксацин): L</b>		
<b>Doxycycline (доксидциклін): D</b>		
<b>Amoxicillin (амоксцилін): А</b>		
<b>Sefdinir (цефдінір): CEF</b>		
<b>Ciprofloxacin (ципрофлуксацин): CIP</b>		
<b>Azithromycin (азитроміцин): Azi</b>		
<b>Cephalexin (цефалексин): CLX</b>		
<b><i>Солод/просо (Malt-extract<sup>™</sup>/Milo – MEM)</i></b>		
H <sub>2</sub> O	500	
Агар-агар	10	
СЕ	10	
Просо (перемелене)	10	

Продовження табл. 3.1

1	2	3
<b>Зерновий (просяний) агар (Milo Agar – MA)</b>		
H <sub>2</sub> O	500	
Агар-агар	10	
Просо (перемелене)	10	
<b>Солодово-пептоно-дріжджовий агар (Malt extract <sup>™</sup>/Yeast&amp;Peptone – MYAP)</b>		
H <sub>2</sub> O	500	
Агар-агар	10	
СЕ	10	
Дріжджовий екстракт (сухий) <b>скорочення – ДЕ</b>	1	
Пептон	1	
<b>Солодовий агар (Malt extract – ME)</b>		
H <sub>2</sub> O	500	
Агар-агар	10	
СЕ	10	
<b>Солодово-дріжджовий екстракт (Malt-yeast extract – MYA)</b>		
H <sub>2</sub> O	500	
Агар-агар	10	
СЕ	10	
ДЕ	1	
Гідроксид калію КОН (1%)	3 мл	
<b>Солодово-пептонний агар (Malt-extract <sup>™</sup>/Peptone – MEP)</b>		
H <sub>2</sub> O	500	
Агар-агар	10	
СЕ	10	
Пептон	1	
<b>Солодово-вуглецевий агар (Malt-extract <sup>™</sup>/ Activated Carbon MEAC)</b>		
H <sub>2</sub> O	500	
Агар-агар	10	

Закінчення табл. 3.1

1	2	3
СЕ	10	
Вуголь активований (порошок)	1	
<i><b>Агар з мотиля (Bloodworm Agar BW)</b></i>		
H <sub>2</sub> O	500	
Агар-агар	8,5	
Мотиль (сухий у порошок)	5	
<i><b>Комбіноване середовище (Malt-extract "/&gt; </b></i>		

\* Назви середовищ з рецептури наведені у прямому перекладі із зазначенням авторських скорочень. Джерело: Ronald, M., 2010, за перекладом з Книги рецептур компанії «Aloha Medicinals Inc.» (Невада, США) [43]

Їх використовують у лабораторних дослідженнях для визначення оптимальних умов розвитку культури (температури, рівня активної кислотності, освітлення тощо). Визначення швидкості вегетативного росту культури на агаризованих середовищах, що містять елементи майбутніх субстратів (рослинні залишки, тирсу, поживні добавки, мінеральні компоненти тощо), або речовини, здатні зашкодити колонізації субстрату культурою, наприклад різні види пестицидів, дозволяє уже на етапі лабораторного дослідження визначити вплив фактора на культуру, окреслити діапазон концентрацій або спрогнозувати формули субстратів для проведення лабораторно-виробничих та виробничих дослідів.

Існують певні вимоги до таких середовищ та методики досліджень з їх використанням. Оскільки клітина грибів – гіфа росте подовжуючись у верхівці, ріст колоній грибів завжди спрямований радіально від центру (точки інокуляції) і шляхом вимірювання радіального розростання колоній може бути встановлена швидкість росту організму у заданих конкретних умовах [44]. При цьому слід враховувати загальні закономірності кінетики росту грибних колоній. Після інокуляції середовища спорами або агаровими висічками із вегетативним міцелієм, як правило, швидкого росту гіф не спостерігається за рахунок «лаг-фази». Це період спокою різної тривалості для різних культур, який відображає час проростання спор, час адаптації до нових умов, активації ферментів, необхідних для росту і т. п. Після цього відбувається короткий період експоненціального збільшення радіусу колоній, а потім швидкість радіального росту стає постійною у часі. Швидкість збільшення радіусу колоній у період, коли приріст довжини міцеліальної гіфи має постійне значення, тобто лінійно залежить від часу культивування, є тим критерієм, який об'єктивно характеризує швидкість зростання організму в конкретних умовах культивування. Швидкість лінійного росту (ШЛР) залежить від виду і штаму гриба, пов'язана з частотою розгалуження гіф та іншими, ще не цілком визначеними, особливостями грибних культур [44]. Цей показник дає змогу кількісно оцінити вплив різних екологічних факторів на ріст грибів, порівняти швидкість росту штамів одного виду і визначити окремі оптимальні умови культивування організму, тому вважається

одним з важливих критеріїв для скринінгу штамів, перспективних для подальшого практичного використання у грибівництві і біотехнології [46, 47].

Для швидкоростучих штамів з щоденним приростом понад 5 мм тривалість дослідження лімітована розмірами чашок Петрі, хоча останнім часом їх типорозміри значно розширені (від 40 до 200 мм у діаметрі). Звичайно використовують більш доступний за ціною одноразовий пластиковий чи скляний посуд (85–100 мм). Тому відповідно до вимог тривалості досліду доцільно застосовувати два підходи до визначення показника ШЛР:

1) для культур грибів, ШЛР яких не перевищує 5 мм/добу (*Grifola frondosa*, *Hericium erinaceus*, *Hypsizyguis marmoreus*, *Lentinus edodes* та ін.) як посівний матеріал використовують активно ростучі 5–8-добові культури, вирощені на поживному агарі (картопляно-глюкозний, солодовий тощо). Диски міцелію діаметром 5 мм вирізають стерильною сталевую трубкою (різаком) на відстані 8–10 мм від краю активно зростаючої колонії. Диски переносять і міцелієм вниз розміщують у центрі чашки Петрі з різними щільними середовищами (рис. 3.1, а). Посіви інкубують у термостаті за необхідної температури (звичайно 24–26 °С). Точно фіксують час початку росту культури на середовищі (поява міцелію за межами посівного диска). Радіуси колоній вимірюють у двох взаємно перпендикулярних напрямках через добу, до повного обростання середовища. Для розрахунку середньої швидкості радіального зростання ( $VR$ , мм/добу) будують криві залежності радіуса міцеліальної колонії від часу культивування на підставі 8–12 паралельних вимірювань та визначають середню швидкість росту (мм/добу) за формулою:

$$VR = \frac{R_1 - R_0}{t_1 - t_0},$$

де  $R_1$  – радіус колонії у кінці зростання, мм;  $R_0$  – радіус колонії на початку фази лінійного росту, мм;  $t_1 - t_0$  – тривалість лінійної фази зростання, доба;

2) для культур грибів, ШЛР яких перевищує 5 мм/добу (*Ganoderma lucidum*, *P. djamor*, *P. ostreatus*, *Panus tigrinus*, *V. volvaceae*, *Trametes multicolor* та ін.) доцільно проводити посів диска міцелію

біля краю поживного середовища за способом, що описано вище. Після закріплення кришки з нижньою частиною чашки (парафілом, клейкими стрічками) на поверхні проводять чітку центральну лінію, а від точки, де розміщено диск з культурою, з двох протилежних сторін проводять дві лінії під кутом 40–45° до центральної лінії (рис. 3.1, б). Такий метод дає можливість збільшити кількість точок вимірювань та тривалість досліду, отже, поліпшити об'єктивність цього показника.

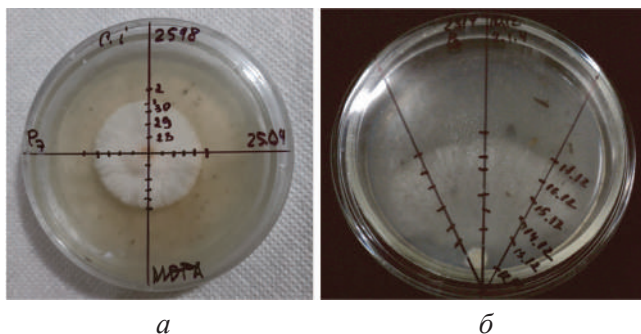


Рис. 3.1. Способи визначення швидкості вегетативного росту культури: а) для культур грибів, ШЛР яких не перевищує 5 мм/добу; б) для культур грибів, ШЛР яких перевищує 5 мм/добу  
[Джерело: фото Бандури І. І.]

Для досліджень впливу певних компонентів та умов на накопичення біомаси або вивчення інтенсивності поглинання деяких елементів використовують поверхневі або глибинні культури з використанням рідинних середовищ:

- а) середовище з молочною сироваткою: молочна депротеїнізована сироватка – 2 %; меляса – 1 ; амоній сульфат  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 0,5 %;
- б) екстракт дріжджів або кукурудзяний – 0,1 %, вода – 1 л;
- в) середовище з молочною сироваткою без меляси;
- г) напівсинтетичне глюкозо-пептонне середовище, г/л: глюкоза – 30 г, пептон – 3 г, калій дигідрогенортофосфат  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1 г; калій гідрогенортофосфат  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1 г; магній сульфат гептагідрат  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,25 г, кукурудзяний екстракт – 20 мл, вода – 1 л;
- д) синтетичне середовище Сонга [48].

Культури вирощують на вищезгаданих середовищах у колбах Ерленмейєра на качалці (180 об./хв) або в ферментерах (АК-10, інші різновиди) за температури 20–30 °С впродовж 5–10 діб (залежно від культури). Можливо збагачення поживних середовищ органічними та неорганічними складовими відповідно до мети та завдань дослідження. Наприклад, до складу середовищ для культивування *Ganoderma lucidum* додавали молочну сироватку (5 %) та соняшниковий шрот (0,7 %), а для *Laetiporus sulphureus* – житнє борошно (3 %) та крохмаль (1 %) [33].

Потрібно зауважити, що швидкість перемішування також впливає на розвиток культури, тому потрібно визначати оптимальну кількість обертів окремо для кожного об'єкта досліджень.

**3.2.2. Дослідження взаємовідносин з іншими організмами** (плісеневі гриби, бактерії) проводять методом зустрічних культур. Наприклад, для визначення взаємного впливу культур та конкурентних плісневих грибів у чашку Петрі на поживне середовище оптимального для вегетативного росту грибів складу (КГА, ГПА, СА тощо) з різних боків розміщують агарові диски, вирізані з колоній культур у стадії активного росту (5–7-ма доба після інокуляції) діаметром 5–8 мм (рис. 3.2).

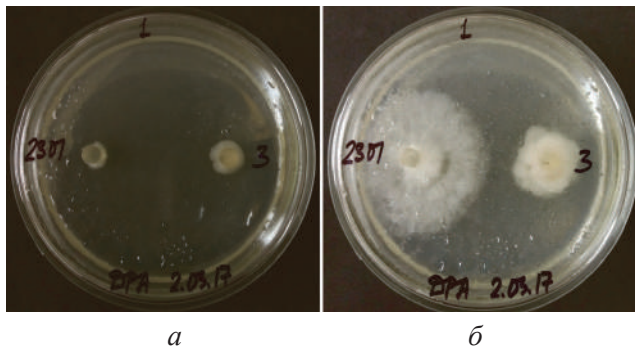


Рис. 3.2. Метод зустрічних культур:

а) 1-ша доба після інокуляції; б) 4-та доба після інокуляції

[Джерело: фото Бандури І. І.]

Спостереження росту зустрічних культур проводять щодня, за необхідності проводять мікроскопію зони взаємодії, щоб визначити зміни структури клітин тощо.

За результатами проведеного аналізування визначені типи конкурентних взаємовідносин *P. ostreatus* (штам 2301) з цвілевими культурами, що були виділені із субстратів, повітря та поверхні обладнання камер культивування шести українських компаній, які займаються вирощуванням гливи:

1) *відсутня конкуренція* – міцелій гливи росте активно, без візуального зменшення швидкості колонізації середовища; після перетину з колонією цвілевої культури продовжує ріст по її поверхні (рис. 3.3, а);

2) *виражена конкуренція* – утворюється виражена зона пригнічення чи повного припинення росту міцелію гливи (рис. 3.3, б);

3) *наявний антагонізм* – колонія плісеневої культури пригнічує ріст культури гливи і навіть використовує її для власного живлення (рис. 3.3, в).

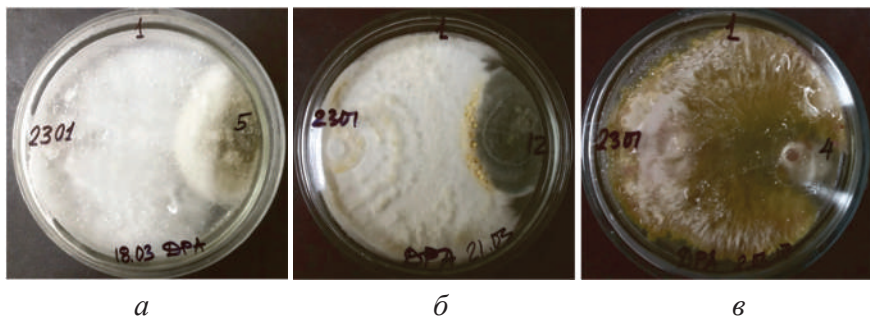


Рис. 3.3. Результати застосування методу зустрічних культур на прикладі взаємодії *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. (глива звичайна) штам 2301 ІБК та колоній плісенивих грибів: а) *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl; б) *Penicillium roqueforti* Thom.; в) *Cladobotryum mycophilum* (Oudem.) W. Gams & Hooz на 10 добу з дати інокуляції [Джерело: фото Бандури І. І.]

До першої групи віднесли досліджені види роду *Aspergillus*, вид *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl, а також виділений вид *Coniothyrium pyrimum* (Sacc.) J. Sheld., більше відомий під назвою *Phyllosticta pirina* Sacc. (збудник філостиктозу або бурі плямистості плодівих дерев).

Найбільш виражене пригнічення росту міцелію гливи з виділенням метаболічної рідини на поверхні контактної зони спостерігали у досліді з *Penicillium roqueforti* Thom (рис. 3.3, б), хоча у чашках Петрі з іншими виділеними культурами роду *Penicillium* визначали лише зони підвищеної щільності та припинення росту *P. ostreatus*. За характером наявної конкурентної взаємодії до цієї групи зараховано також *Fusarium oxysporum* Schltdl.

Прояв антагонізму з повним припиненням росту культури *P. ostreatus* спостерігали на зустрічних культурах з видами цвілі: *Cladobotryum mycophilum*, *Trichoderma pleuroticola*, *Tr. harzianum*, *Tr. atroviride*. Якщо прояв антагонізму грибів роду *Trichoderma* по відношенню до культур вищих грибів достатньо вивчено, то патогенний ефект *Cl. mycophilum* по відношенню до гливи звичайної доведено вперше (рис. 3.3, в). Вже відомо про негативні наслідки інфікування плодових тіл *Agaricus bisporus* (J. E. Lange) Imbach, та *P. eryngii* значеним видом, описи подібної контамінації *P. ostreatus* у сучасній науковій літературі з'явилися вже після наших досліджень [8, 9].

Перевірку впливу бактеріальних мікроорганізмів на розвиток базидієвих грибів також проводять модифікованим методом зустрічних культур (рис. 3.4).

Наприклад, для перевірки впливу бактерій роду *Bacillus*, які були виділені з субстратів виготовлених методом аеробної ферментації за різних температур, а саме *Bacillus subtilis* за температури пастеризації 62 °С та *Bacillus licheniformis* за температури пастеризації 75 °С на розвиток колоній *P. ostreatus* (штам НК-35) та *L. edodes* (штам 363 ІВК) наносили на поживне середовище методом штрихування культури мікроорганізмів на відстані 40–50 мм, а у центрі розташовували диск з культурою штаму гриба. Якщо колонії *B. subtilis* лімітували або зовсім гальмували ріст базидієвих грибів (рис. 3.4, а), то колонії *B. licheniformis* не перешкождали їхньому росту (рис. 3.4, б).

Для мікроскопічних досліджень базидієвих або плісєневих грибів зручно використовувати метод із застосуванням покривних скелець, які після стерилізації розміщують стерильним пінцетом поряд з колонією так, щоб отримати на поверхні повітряні гіфи досліджуваної культури (рис. 3.5).

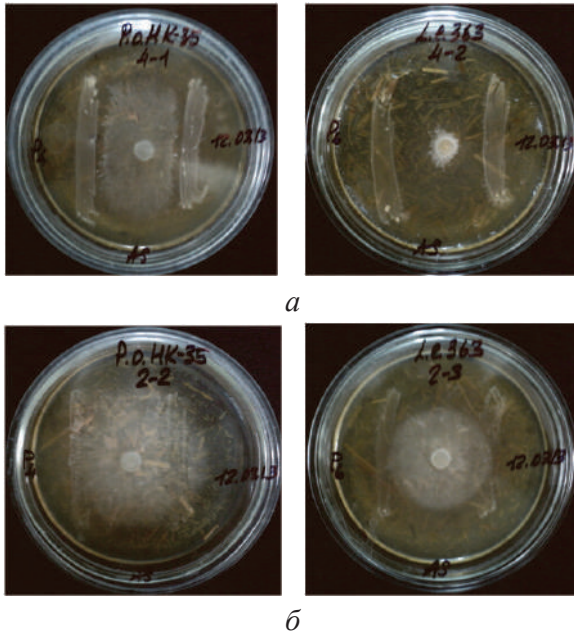


Рис. 3.4. Метод перевірки взаємодії з бактеріальними колоніями:  
 а) *Bacillus subtilis*; б) *Bacillus licheniformis*  
 [Джерело: фото Бандури І. І.]

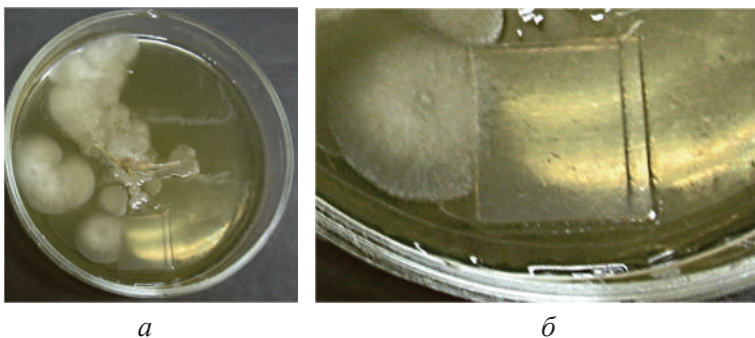


Рис. 3.5. Метод накладання покривних скелець  
 на поживне середовище:  
 а) загальний вигляд; б) гіфи «заповзають» на покривне скло  
 [Джерело: фото Бандури І. І.]

Інколи потрібно занурити скельце у розплавлене поживне середовище, щоб отримати на його поверхні тонкий шар агарового полімеру. Таким методом дуже зручно ідентифікувати родові ознаки плісеневих грибів за будовою оідій, конідієносців чи спорангіїв.

**3.2.3. Дослідження впливу критичних температур** проводять за необхідності визначення екстремальних значень температури на життєздатність культури. Інокульовані міцеліальною культурою пробірки зі скошеним середовищем СА поміщають у термостати за температури від 36 до 42 °С з кроком в 1 °С. Після 10 діб інкубації фіксують наявність чи відсутність росту вегетативного міцелію. Пробірки, в яких спостерігають відсутність приросту міцелію, переносять у термостат з температурою 26 °С для перевірки життєздатності культури. Поновлення росту або втрату життєздатності оцінюють після 10 діб інкубації.

**3.2.4. Дослідження аделопатичної активності грибів** проводять за необхідності визначення впливу метаболічних речовин культури на інші організми [49].

Для визначення аделопатичного ефекту міцеліальної біомаси використовують модифіковану методику – «сендвіч» метод, описаний А. Osivand і співавт. [50]. Суху біомасу (0,1 г) подрібнюють до порошкоподібного стану і стерилізують під ультрафіолетовим випромінюванням упродовж 2 годин. Як субстрат використовують агаризоване середовище без поживних речовин та мікроелементів, так званий «голодний» агар (ГА). Підготовлену біомасу міцелію рівномірним шаром наносять у чашку Петрі, заливають 8–10 мл розплавленого ГА та залишають до повного застигання. Потім додають ще 8–10 мл розплавленого середовища зверху і залишають до затвердіння. Насіння рослин, культури мікроорганізмів чи інших базидієвих грибів розкладають (пересаджують) на поверхню агаризованого середовища на однаковій відстані. Як контроль використовують чашки Петрі з ГА без додавання біомаси міцелію. До них вносять ідентичну кількість досліджуваного матеріалу (насіння, дисків з культурами).

На третю добу фіксують кількість пророщених насінин та вимірюють довжину коренів та пагонів рослин, приріст колонії.

Аналізування впливу проводять також за такими параметрами: довжина кореня, його опушення, розвиток бічних коренів, довжина пагонів, загальна довжина рослин.

Відсоток коефіцієнта росту корінців та гіпокотилів паростків розраховують для кожної проби порівняно з контролем за такою формулою:

$$\text{коефіцієнт росту, (\%)} = 100 \times (\text{середнє значення довжини досліджуваної групи} / \text{середнє значення довжини контрольної групи}).$$

**3.2.5. Дослідження антиоксидантної активності біомаси культури** проводять двома методами.

*1 метод.* Визначення активності знешкодження радикалів за допомогою 1,1-дифеніл-2-пікрілгідразу (DPPH реагент) виконують за методом K. Elfahri зі співавторами [51].

Додають 800 мкл реагенту DPPH (0,1 мМ DPPH, розчиненого у 95 % метанолі) до 200 мкл метанольного екстракту біомаси у скляних пробірках. Зразки енергійно струшують та інкубують у темряві за кімнатної температури (18–22 °С) протягом 30 хв. Абсолютний метиловий спирт використовують як контроль. Поглинання зразків вимірюють при 517 нм на спектрофотометрі SF 46 LOMO.

Величину активності з видалення вільних радикалів  $S$  (%) визначають за формулою:

$$S = \left( \frac{P_c - P_s}{P_c} \right) \cdot 100,$$

де  $S$  – величина активності з видалення вільних радикалів;  $P_c$  – показник поглинання контрольного зразка;  $P_s$  – показник поглинання досліджуваного зразка [51].

*2 метод.* Визначення активності знешкодження радикалів за допомогою 2,2-азино-біс (3-етилбензо-тіазолін-6-сульфонової кислоти) (ABTS<sup>+</sup> реагент) визначають згідно з методом Sah зі співав. [52]. Основний розчин ABTS готують способом змішування вихідних розчинів: 7,4 мМ водного розчину ABTS та 2,6 мМ водного розчину калій пероксодисульфату (персульфату калію) у рівних кількостях (молярне співвідношення = 1:0,35), залишаючи суміш

прореагувати впродовж 12 год у темряві за кімнатної температури. Свіжий реагент АВТS готують змішуванням 1 мл вихідного розчину АВТS<sup>+</sup> з 50–60 мл метилового спирту для отримання поглинання  $0,70 \pm 0,02$  при 734 нм. додають До 2 мл реагенту АВТS додають 20 мкл метанольного екстракту біомаси та інкубують за 30 °С впродовж 6 хв. Поглинання суміші вимірюють при 734 нм на спектрофотометрі SF 46 LOMO (СРСР). Як контроль використовують 20 мкл чистого метилового спирту. Величину активності з видалення вільних радикалів  $S$  (%) визначають за формулою:

$$S = \left( \frac{P_c - P_s}{P_c} \right) \cdot 100,$$

де  $S$  – величина активності з видалення вільних радикалів;  $P_c$  – показник поглинання контрольного зразка;  $P_s$  – показник поглинання досліджуваного зразка [52].

**3.2.6. Дослідження фунгіцидної резистентності збудників хвороб** пропонуємо проводити за прикладом дослідження фунгіцидної резистентності штамів *Cladobotryum mycophilum* (*Hypocreales, Ascomycota*). Для дослідів використовують найбільш застосовувані у вітчизняному грибівництві діючі речовини фунгіцидів – флуазінам, метрафенон, карбендазим, прохлораз, беноміл та ін. Як основу рекомендують брати глюкозо-пентозо декстриновий агар (ГПДА), на якому визначено високу швидкість росту цвілевих грибів, зокрема штамів-збудників «павутинної плісняви». Дослідження стійкості різних штамів *C. mycophilum* до фунгіцидів проводять за допомогою модифікованого дифузійного методу. Блоки з фунгіцидами виготовляють способом агаризації стерильного розчину препарату. Після полімеризації із середовища вирізають блоки діаметром 5 мм і заввишки 3 мм. Вміст фунгіцидів у блоках дорівнює максимальній дозі, рекомендованій для виробництва печериць (інших грибів). Блоки з фунгіцидом розміщують на поверхні ГПДА-середовища на відстані 20–25 мм від інокулюма досліджуваного штаму. В одній чашці розміщують не більше двох блоків з одним препаратом. Інокуляцію проводять, використовуючи споровий матеріал, який наносять на задану точку на

поверхні середовища методом проколу. Культивування проводять при  $25 \pm 1$  °C. Зону інгібування вимірюють на момент повного припинення росту міцелію, що для всіх штамів відбувається на 7 добу культивування. З огляду на те, що зона інгібування не завжди має правильну округлу форму, її розміри обчислюють за площею (см<sup>2</sup>) за допомогою програми ImageJ.

Штам вважають чутливим, якщо середнє значення зони інгібування становить понад 2 см<sup>2</sup> (що відповідає середньому діаметру зони 16 мм); помірно стійким – якщо вона є більшою за 1,5 см<sup>2</sup> і меншою ніж 2 см<sup>2</sup> (що відповідає діапазону діаметрів 14–16 мм); якщо розмір зони не перевищує 1,5 см<sup>2</sup> (діаметр менше 14 мм), штам вважають стійким до відповідного фунгіциду. Зону інгібування визначають як таку, в якій не спостерігають жодних ознак росту міцелію. Зону пригнічення визначають як таку за наявності зміненої по відношенню до контролю морфології колонії. У випадках, коли фіксували інгібуючу дію фунгіцидів на ріст *C. mycophilum*, проводили додаткові дослідження впливу фунгіцидів на мікроморфологію штаму. У зазначеному експерименті фунгіциди у максимальних рекомендованих дозах додавали безпосередньо до ГПДА-середовища, використовуючи фільтри для стерильної фільтрації з розміром пор 0,2 мкм (Filtres Fioroni, Китай). Фунгіциди додавали у розплавлене (50 °C) агаризоване середовище та швидко розливали у стерильні чашки Петрі з метою уникнення термічного розкладу препарату [53].

### 3.3. Методи виготовлення посівного матеріалу

Для досліджень використовують кілька різновидів посівного матеріалу (інокулюма): *рідинний, зерновий, на мінеральних носіях*.

**3.3.1. Отримання рідинного інокулюма глибинним методом.** У лабораторних дослідженнях звичайно використовують кругові качалки з 180–220 об./хв, колби Ерленмеєра – ємності з плоским дном, конічним корпусом і циліндричним горлом. Можливо застосування інших ємностей з відповідними показниками. Під час промислових досліджень рідинний інокулюм отримують у ферментерах необхідного об'єму (від 6 л робочого середовища до 500 л). Постійність

перемішування біомаси у таких ферментерах досягається різними способами: механічне перемішування мішалками турбінного типу зі швидкістю від 300 до 500 об./хв; барботаажний метод очищення повітрям для аеробних культур, інші варіанти, застосування яких дає змогу отримати активну монокультуру штаму, що досліджується.

Як поживне середовище використовують розчин сусла (у концентрації 4 ° за Баллінгом), зернові відвари, штучні середовища тощо. За опублікованими даними, відвари кормових рослин, що додають у поживний розчин у концентрації 0,1 % підвищують швидкість накопичення біомаси. Відбір біомаси для досліджень глибинної культури проводять на 5–7-му добу росту за температури 25–26 °С.

Слід зауважити, що при застосуванні методу глибинного нарощування біомаси потрібно проводити мікробіологічний контроль за чистотою середовища та станом культури, визначати наявність характерних ознак: розгалуженість та ширину гіфів, пряжки [41].

Обов'язковою умовою для аналізування результатів є фіксація фізичних умов отримання біомаси, хімічного складу поживного середовища, рН, концентрації кисню чи інших газів тощо.

**3.3.2. Отримання міцелію зернового посівного.** Одним з перших запропонував метод виробництва зернового міцелію Г. Лемке (G. Lemke) у 1971 році. Цей метод покладено в основу лабораторних та малооб'ємних способів отримання посівного міцелію [14, 54, 55]. Для розмноження культивованих грибів використовують посівний міцелій, вирощений на різних субстратах: рідинних, зернових, рослинних (тирса, солома тощо), мінеральних (вермікуліт, перліт) з додаванням поживних речовин, та їх сумішах. Для стерильних технологій промислового виробництва грибів останнім часом впроваджується використання рідинного інокулюма, виготовленого за методом рідинної культури, який наведено вище, з використанням промислових біореакторів (рис. 3.6). Але найпоширенішим залишається посівний зерновий міцелій. Промислове виробництво зернового міцелію постійно удосконалюється завдяки механізації процесів та використанню сучасного обладнання, розширюється список інгредієнтів, які додають до посівного матеріалу для поліпшення його якості.

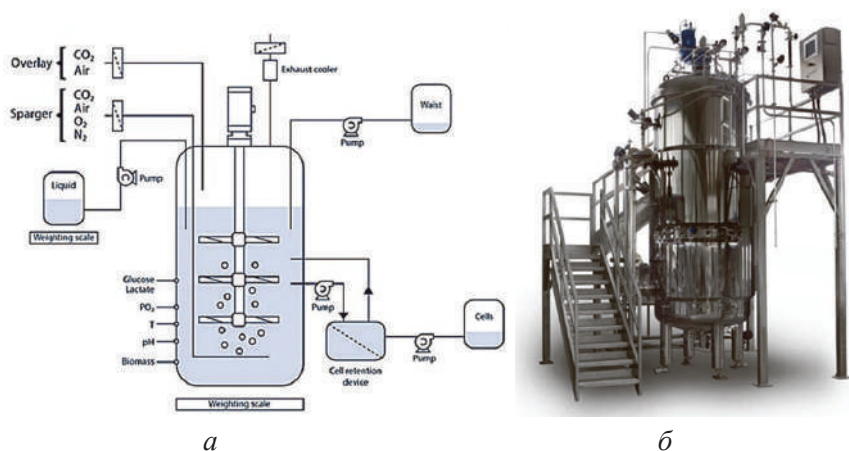


Рис. 3.6. Схема будови (а) та приклад промислового біореактора (б) для виготовлення рідинного інокулюма (біомаси міцелію)

[Джерело: схема та фото з інтернет-ресурсів]

Основні правила виготовлення такого міцелію у лабораторних умовах:

1) зерно для посівного міцелію має бути цілим і зберігатися у сухих умовах; не допускається використання зерна, ураженого цвілевими або бактеріальними хворобами;

2) зерно зволожується двома способами: замочуванням у холодній воді та відварюванням. У будь-якому варіанті зернівки мають бути зволожені до 42–45 %, коли залишок незволоженого ендосперму не перевищує 2 мм у діаметрі (рис. 3.7);

3) не допускається наявності поверхневої вологи на зерні, щоб запобігти склеюванню зернівок у процесі стерилізації. Для цього зерно підсушують та додають гіпс, вермикуліт або сухі зерна льону (залежно від визначеної формули зернового міцелію);

4) ємності зі скла або термостійких матеріалів готують таким чином, щоб забезпечити постійну аерацію зернової суміші. Це питання вирішується наявністю фільтрів у кришках, пробками або використанням синтетичних матеріалів з фільтрувальною здатністю (агроволокно тощо) (рис. 3.8);



Рис. 3.7. Оптимальне зволоження зернівок для виготовлення посівного зернового міцелію: а) ячмінь; б) пшениця  
[Джерело: фото Бандури І. І.]

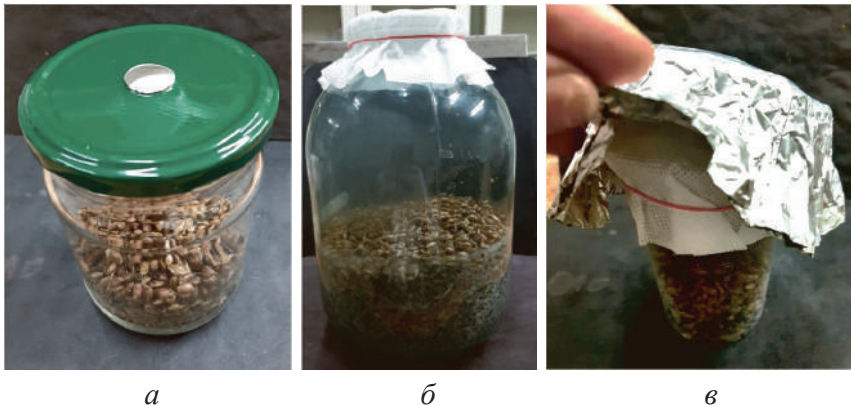


Рис. 3.8. Методи закріплення фільтрів на ємностях за різних способів закривання: а) металева кришка; б) агроволокно; в) фольга  
[Джерело: фото Бандури І. І.]

5) насипають зернову суміш так, щоб загальний об'єм ємності був заповнений на одну третину – для кращого перемішування вмісту впродовж підготовки посівного міцелію. Рекомендується накривати фільтри фольгою, яку нещільно притискають, щоб запобігти осадженню бактерій та спор плісневих грибів безпосередньо на фільтр та контамінації під час перемішування;

б) терміни стерилізації різняться залежно від маси зернової суміші у ємності, але для зразків до 500 г достатньо режиму, що триває 90 хв. за температури 121–125 °С;

7) охолодження підготовлених ємностей проводять в асептичних умовах. Інколи буде потрібне легке струшування суміші після остигання до температури 45–50 °С, щоб запобігти грудкуванню;

8) за правилами асептики інокують охолоджений до температури 26–28 °С зерновий матеріал агаровими сегментами з активною культурою штамів, рідинною культурою тощо. На відміну від методу Лемке, коли для інокуляції зерна використовується вміст пробірки, вважаємо більш зручним використання сегментів



**Рис. 3.9. Оптимальне розташування агарового сегмента з культурою гриба в ємності із зерном**

[Джерело: фото Бандури І. І.]

з культурою розміром до 30–50 мм у найширшій частині, отриманих на поживному середовищі у чашках Петрі. Поверхня інкубованої культури розрізається скальпелем на 4–8 частин і разом із залишками агарового середовища переноситься до ємності із зерном. Такий сегмент бажано розмістити у середині зернової суміші, але так, щоб можна було спостерігати розвиток культури (рис. 3.9). Кожна одиниця посівного матеріалу маркується: код культури, номер пасажу (пересіву), дата посіву; за необхідності додають код поживного середовища та інші дослідні дані;

9) на 5–10-ту добу інкубації культури у зерновій суміші (термін залежить від індивідуальних особливостей вегетативного розвитку культури), коли діаметр колонії досягає 100–120 мм, ємність струшують для рівномірного розподілу гіф колонії по об'єму зерна. Через 3–7 діб після струшування після повної колонізації зерна міцелієм його використовують для інокуляції субстратів або передають на зберігання;

10) за необхідності, через день після струшування, коли механічно пошкоджена культура знову починає активний розвиток у

субстраті, можна легко визначити наявність мікробіологічної контамінації, зокрема бактерій, які складно ідентифікуються візуальним контролем. Для цього в асептичних умовах емність відкривають (попередньо оброблені спиртовим розчином (70 %) пакети розрізають стерильним скальпелем так, щоб утворився клапан) і стерильним інструментом (ложка з довгою ручкою, шпатель тощо) відбирають приблизно 50–100 зернівок. Обережно переносять на стерильне поживне середовище так, щоб зернівки розподілилися рівномірно. Бажано використовувати середовище ГРБ – гідролізат рибного борошна, яке є базовим для визначення бактеріальної контамінації. Чашки з відібраними пробами розміщують у термостаті за температури  $36 \pm 1$  °С на 24 години. Така температура сприяє розвитку бактерій, але є досить високою для розвитку культури грибів. Тому за наявності інфекції вже через добу бактеріальні колонії розвиваються навколо зернівок (рис. 3.10).

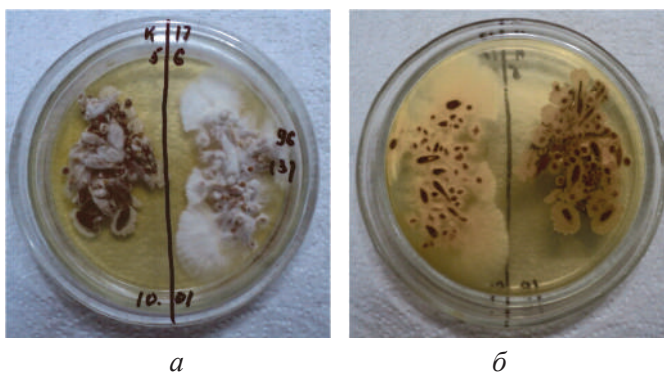


Рис. 3.10. Результати аналізування на визначення контамінації зернової суміші: *a* – вид зверху; *б* – вид знизу

[Джерело: фото Бандури І. І.]

Наступну добу проби витримують у термостаті за температури  $26 \pm 1$  °С, яка є оптимальною для розвитку грибів. Наявність повітряного шару міцелію на кожній зернівці через дві доби після відбору зразків за витримування наведених умов свідчить про достатню активність культури і можливість її використання для інокуляції субстратів. На жаль, таким методом не можна виявити наявність

дріжджів, тому прискорення вегетативного розвитку штаму, що контролюється, порівняно зі звичайними його характеристиками, вказує на необхідність проведення додаткового мікроскопічного аналізу;

11) зазвичай посівний зерновий міцелій зберігають за температури 0–2 °С, але деякі культури потребують індивідуальних умов. Наприклад, зерновий міцелій *A. blazei*, *C. indica* та інших тропічних видів втрачає свою активність і навіть гине за температури нижче 10 °С. Тому умови зберігання посівного матеріалу мають відповідати особливостям культури і забезпечувати швидкий її перехід на субстрат. Тривалість зберігання коливається від 10 до 90 діб. Терміни залежать як від особливостей культури, так і від складу зернового субстрату. Потрібно пам'ятати, що навіть за низьких температур культура використовує поживні речовини зерна та накопичує метаболіти, що потім негативно впливає на швидкість колонізації рослинних субстратів.

Усі операції та основні елементи методики обов'язково фіксують у журналі дослідження: вид зернового носія, співвідношення компонентів у формулі, результати хімічного аналізування сировини, масу зернового матеріалу, умови стерилізації, тощо.

**3.3.3. Посівний матеріал на мінеральних носіях** готують за необхідності збільшення кількості одиниць інокуляції або для об'єктивної оцінки активності культури, коли не можна забезпечити однорідність складу зернових носіїв. Звичайно використовують вермікуліт з частинками необхідного розміру або перліт. У мінеральні компоненти поступово додають розраховану кількість рідини до досягнення вологості на рівні 50–60 % та ретельно перемішують. Формулу рідини готують відповідно до умов досліду, з певною концентрацією поживних речовин, відварів, добавок тощо. Підготовлену суміш фасують у ємності або пакети за алгоритмом виготовлення зернового посівного матеріалу, стерилізують та інокулюють описаним вище методом (п.п. 3.3.2). Можливим варіантом є стерилізація мінерального носія з наступною інокуляцією його рідинною культурою у такій кількості, яка забезпечує необхідний для підтримання життєздатності культури вміст вологи у готовому продукті.

### 3.4. Методи виготовлення субстратів

Для досліджень за екстенсивним методом вирощування грибів визначають властивості натуральних ґрунтів, деревини та елементи їхньої підготовки до інокуляції культурою гриба (див. нижче п. 3.6 «Методи аналізу сировини» нижче).

Інтенсивний метод вирощування передбачає виготовлення штучних субстратів способами: компостування, хімічним (так званим «холодним»), пастеризацією у воді, пастеризацією паром, аеробною або анаеробною ферментацією, стерилізацією тощо [32, 56–58].

Найпоширеніші методи наводимо нижче.

**Стерилізація** субстратів є найбільш популярним методом для проведення лабораторних дослідів, але сучасні вимоги до якості субстратів зумовили широке впровадження стерилізації у промислове грибівництво. Метод дає можливість значно підвищити ефективність використання субстратів культурою гриба, забезпечує зниження мікробіологічної контамінації, дає змогу чітко проводити технологічні операції та прогнозувати дату отримання урожаю. Звичайно, що впровадження такого методу у виробництво потребує професійної організації асептичної зони інокуляції та підвищених вимог до мікробіологічної чистоти у приміщеннях для інкубації субстратів (*Додаток Д*).

Сировину (подрібнені рослинні залишки, тирсу тощо) заливають надлишком холодної води на 8–10 годин. Змочену сировину складають в ємності та ретельно змішують зволожені компоненти, додаючи необхідні добавки та мінеральні речовини. Підготовлений матеріал насипають у термостійкі поліпропіленові пакети, банки, іншу тару, яка витримує температуру до  $128 \pm 2$  °C.



**Підготовка банок до стерилізації передбачає обов'язкове формування каналів для інокуляції**

Стерилізацію субстратів проводять в автоклаві (стерилізаторі) за температури  $125 \pm 3$  °C впродовж 120–180 хвилин відповідно до маси ємності та характеристики сировини. Субстратні одиниці охолоджують до температури  $27 \pm 1$  °C в асептичних умовах. Інокуляцію субстратів проводять у ламінарному потоці очищеного повітря (до 2 м/с). Для цього використовують ламінарні бокси з НЕРА-фільтрами не менше ніж 13 клас очищення, що затримує до 99,75 % мікроорганізмів. Зазвичай зерновий міцелій вносять від 1 до 3 % до маси сирого субстрату, але цей показник може змінюватися відповідно до завдання дослідження. Стерилізовані субстрати можна інокулювати рідинним міцелієм, що значно спрощує процедуру розподілення інокуляту. Для зернового субстрату потрібно проводити додаткову операцію струшування, оскільки поверхнєве внесення посівного матеріалу часто зумовлює зниження швидкості колонізації через утворення на поверхні шару повітряного міцелію, який перешкоджає вільному проникненню повітря у нижні шари субстрату.

*Аеробна ферментація у високому шарі* зволоженої сировини (рослинних залишків та агровідходів) проводиться у камерах пастеризації. На відміну від промислового тунельного методу, об'єм таких камер дає змогу отримувати від 1 до 7 т субстрату одночасно впродовж 3–7 діб, що достатньо для проведення виробничих досліджень (рис. 3.11). Слід зауважити, що для проведення як лабораторних, так і виробничих дослідів з печерицею або іншими сапрофітними грибами отримують субстрат лише відомим методом попереднього компостування і пастеризації та кондиціювання в тунелях, який дуже детально описаний у літературі [57, 58].

Замочування сировини проводять підігрітою до  $45\text{--}50$  °C водою, щоб забезпечити достатнє зволоження. На сітку, яка відокремлює об'єм камери пастеризації від піддону з підігрітою водою, наносять шар подрібненої соломи. Ця операція виконує подвійну функцію: з одного боку, створює своєрідний механічний фільтр для очищення повітря від пилу та спор мікроорганізмів, а з другого – не дає малим фракціям подрібненої соломи закривати отвори сітки, що забезпечує вентиляцію субстрату впродовж усього процесу.

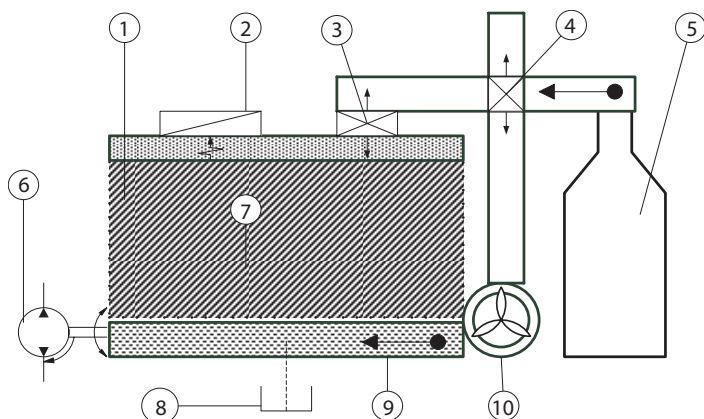


Рис. 3.11. Схема пастеризаційної камери для проведення термічної обробки сировини методом аеробної твердофазної ферментації у високому шарі: 1 – камера; 2 – вентиляційний люк для викиду повітря при охолодженні; 3 – шиберна засувка рециркуляції; 4 – шиберна засувка свіжого повітря або пари; 5 – парогенератор; 6 – насос; 7 – субстрат висотою не менше 1200 мм; 8 – злив залишкової води; 9 – резервуар для води; 10 – вентилятор

[Джерело: Бандура І. І.]

Сировину наносять шарами до 500 мм, які ретельно проливають водою під тиском 4–5 атм та ущільнюють. Заповнюють камеру до висоти 2000 мм, поступово встановлюють температурні датчики.

За активної вентиляції знижують температуру до 35–40 °С для проведення першої фази підготовки субстрату. Мікроорганізми, що починають розвиватися у рослинній сировині, розігрівають субстрат, відповідно вентиляцію організовують так, щоб забезпечити підтримання температури на зазначеному рівні впродовж 24–72 год залежно від якості сировини. Тривалість першої фази залежить як від титру плісеньових форм, так і від структури, тому необхідним є попереднє аналізування показників рослинних залишків (див. нижче).

Для проведення наступного етапу – пастеризації, субстрат активно вентилюють свіжим повітрям, за необхідності підігрівають паром та поступово збільшують температуру до 65–80 °С (відповідно до технічного завдання). Пастеризація триває від 12 до

24 год, після чого за рахунок вентиляції свіжим повітрям температуру поступово знижують до 50–55 °С та витримують у такому режимі від 24 до 48 год для сприяння розвитку термофільних форм мікроорганізмів [59].

Для сировини з високим титром плісневих форм (понад  $10^5$  КУО у грамі сировини) після пастеризації субстрат поступово (до 6 год) охолоджують до температури 28–35 °С завдяки примусовій вентиляції, витримують добу в такому режимі та знову підігривають парою до температури 60–65 °С (різновид тиндалізації). Пастеризують субстрат ще 10–18 год, відповідно до технічного завдання, швидко охолоджують до 28–32 °С та одразу інокують. Механізація процесу інокуляції позитивно впливає на якість субстрату завдяки зменшенню терміну зберігання виготовленого субстрату за температури 20–28 °С, яка є оптимальною для розвитку мезофільних мікроорганізмів – конкурентів грибів за елементи живлення.

*«Холодний», або точніше – хімічний метод* передбачає замочування рослинних складових субстратів у розчинах хімічних речовин: пероксиду водню, гіпохлориту натрію або кальцію з вмістом активного хлору, формаліну, речовин з фунгіцидною активністю [60]. Відомо, що використання подібних хімічних сполук зумовлює невідконтрольне нагромадження цих речовин та їхніх залишків у плодкових тілах, а також потребує впровадження особливих засобів захисту робітників під час роботи з субстратом. Ми нагадуємо про цей метод як можливий для проведення наукових дослідів, але в такому випадку необхідно враховувати обов'язкове дослідження характеристик харчової безпеки отриманого урожаю.

*Пастеризація гарячою водою* (гідротермічна технологія) є досить поширеним методом термічної підготовки субстратів, оскільки дає змогу отримати достатню ефективність культивуару на рослинній сировині з низьким титром мікробіоти. Замочування рослинних решток або їхніх сумішей проводять у воді з температурою від 70 до 90 °С тривалістю від 1 до 5 год відповідно до характеристик сировини. Надалі воду швидко зливають, дають час на стікання залишкової води та після охолодження до температури 26–28 °С субстрат інокують 2,5–5,0 % зернового міцелію від сирої маси.

Інколи додатково промивають субстрат холодною водою для швидкого охолодження, вимивання розчинних цукрів та зниження титру мікроорганізмів. Формування одиниць субстрату проводять як в ручному режимі, так із застосуванням механізації процесу.

Метод жорсткої *пастеризації паром* (ксеротермічна технологія) був започаткований в Угорщині як один із швидких та висококомеханізованих методів термічної обробки сировини. Рослинні матеріали подрібнюють та завантажують у ємності, що обладнані механізмом перемішування або обертаються навколо своєї осі (рис. 3.12).



Рис. 3.12. Субстратні машини СМ-8 та СМ1-РС виробництва компанії «Технік»

[Джерело: фото із сайту компанії «Технік»]

Пара подається у ємність, нагріває сировину до температури 100–105 °С, яку потім упродовж 1–1,5 год періодично перемішують. Після режиму температурного впливу сировину зволожують та охолоджують мікробіологічно чистою холодною водою за постійного перемішування. Субстрат інокулюють та формують брикети в асептичних умовах. Недоліком цього методу є низький показник вологості субстрату (63–67 %), який не дає змоги отримати максимальну ефективність використання культиваром сухої речовини субстрату.

Вибір методу термічної підготовки субстрату для культивування грибів залежить від біологічних особливостей культивуару, характеристик сировини, необхідного рівня мікробіологічної чистоти,

наявності відповідного обладнання тощо. У будь-якому разі підготовлений субстрат має бути елективним, тобто мати відповідний до умов досліду рівень поживності, бути вільним від конкурентних мікроорганізмів або мати достатній титр термофільних бактерій роду *Bacillus*: *B. macerans*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*. На думку сучасних дослідників, бактерії роду *Bacillus* у ферментованих субстратах здатні фіксувати азот навколишнього повітря у метаболічних речовинах, чим збільшують поживну цінність субстратів як джерела додаткового азотного живлення для грибів, зменшують ризик контамінації субстрату цвілями [33, 61–64].

У журналі досліду фіксують схему процесу та режими температурної обробки сировини, склад компонентів та розрахунок формули композиції, фактичний результат додавання певних інгредієнтів і фізичні, хімічні та мікробіологічні показники якості виготовленого субстрату (див. п.п. 3.6, 3.7).

**Виготовлення субстратів** для вирощування сапротрофних грибів, зокрема печериці, у практичному грибівництві називають *компостуванням*. Субстрати для культивування печериці називають компостами, а процес їх приготування – *ферментаційним процесом*. Компостування полягає у перетворенні мікроорганізмами поживних речовин складових компонентів компосту на форми, доступні для міцелію гриба, та знищенні під впливом підвищеної температури патогенних мікроорганізмів і шкідників.

Існує три види компостів: *натуральні*, *напівсинтетичні* та *синтетичні*. *Натуральні* готують на основі кінського гною. Основою *напівсинтетичних* (містять до 20% кінського гною) і *синтетичних* (кінський гній взагалі відсутній) є солома злаків. До неї додають органічні матеріали і мінеральні добрива, які забезпечують суміші подібність за структурою і вмістом елементів до натурального компосту. Метою підбору компонентів субстратів є досягнення в них оптимальної структури і вмісту елементів живлення.

Для отримання повноцінного компосту суміш його складових частин потрібно піддати ферментації. Її метою є створення селективного середовища для росту міцелію печериці, яке забезпечувало б поживними речовинами грибницю, але було непридатним для конкуруючих мікроорганізмів. Під впливом ряду факторів

(температури, вологості, аерації і рН) проходить активна життєдіяльність мікроорганізмів, які використовують органічні речовини вихідного субстрату, одночасно утворюючи поживні речовини (лігнін-протеїновий комплекс) для розвитку міцелію печериці. Розрахунки компонентів субстрату проводяться так, щоб досягти оптимальної вологості та балансу вуглецю і азоту. Приклад такого розрахунку наведено у (табл. 3.2 б). Існує декілька програм таких розрахунків та вони постійно вдосконалюються.

Таблиця 3.2. Розрахунки компонентів субстрату на початок компостування

Складові елементи	Маса, кг	Вологість матеріалу, %	Суха речовина, кг	Вміст нітрогену, %	Маса нітрогену у сировині (Nm), кг	Вміст золи, %	Маса золи у сировині, кг	Маса компосту	
								за вологості, %	кг
Солома	6000	9	5460	0,64	34,9	6,01	328,2	70%	31003
Курачий послід	4000	12	3520	4,5	158,4	6	211,2	75%	37204
Карбамід	10	7	9,3	35	3,26	6	0,6	65%	26574
Гіпс	200	8	184	0	0	97	178,5	60%	23252
Ріпак	10	8	9,2	3,36	0,31	4	0,4	C/N	22,5
Кукурудза	100	10	90	0,9	0,81	4,3	3,9		
Висівки	10	0	10	1,3	0,13	18	1,8	N	2,13
Крейда	20	8	18,4	0	0	99	18,2		
<b>Разом</b>	<b>10350</b>		<b>9300,9</b>		<b>197,8</b>		<b>742,6</b>		

**Примітка.** Зеленим кольором виділені стовпці, куди вносять результати аналізування сировини. Інші дані розраховують за допомогою програми Excel за формулами, що наведено у п.п. 3.6

[Джерело: розраховано Бандурою І. І.]

Відомі кілька способів *компостування*, але найпоширенішими були два: традиційний і сучасний. За традиційного методу, який у промисловому грибівництві нині не використовується, процес ферментації закінчувався у бурті за 30–38 діб, його ще називали

«буртовий» або «довгий» метод. Таким методом ще можуть користуватися поодинокі невеликі виробники, що мають власну базу сировини. Але якість такого компосту залежить від зовнішніх факторів і є дуже нестабільною. Інколи у зимові місяці процес компостування може тривати до 90 діб.

Сучасний метод передбачає дві фази компостування: перша «спонтанна ферментація» – проходить у буртах або спеціалізованих бункерах «індорах», які мають спеціалізовану підлогу, що забезпечує необхідну аерацію компостної маси.

Друга фаза складається з власне пастеризації і кондиціонування, які проводять у закритих пастеризаційних тунелях за контрольованих умов. Завданням обох фаз компостування є підготовка субстрату з певними фізико-хімічними властивостями:

- відповідною пружністю: солома має легко розриватись і мати поверхню темно-коричневого кольору;
- відповідною вологістю: після першої фази – 72–74 % (за стискування компосту в руці між пальцями витікає вода); після другої – 65–68 % (за стискування – між пальцями з'являються краплі води);
- оптимальною реакцією середовища: рН 7,3–7,5;
- відсутністю запаху амоніаку.

Важливу роль в отриманні компостів відіграє попереднє зволоження основного компонента – соломи впродовж 3–5 діб. За цей період 1 т її вбирає біля 3 т води. Зволожену солому з додаванням курячого посліду укладають в бурт, де проходить перша фаза компостування – спонтанна ферментація. Ширина бурта – 1,5–2,5 м, висота – 1,5–2,0 м, довжина – довільна. У бурт вносять гіпс і мінеральні добавки. Поступово температура всередині його досягає 50–60 °С. Через кожні 3–5 діб необхідно перебивати (перелопачувати) компост. Поливають бурт увесь час, але після третього перебивання – дуже обережно, оскільки при надмірному зволоженні компост може стати клейким. Після закінчення першої фази компост перевозять у спеціальні приміщення – пастеризаційні тунелі, де проводять другу фазу – пастеризацію та кондиціонування.

*Пастеризація* починається, коли температуру компосту підвищують до 56–60 °С на 6–12 год, що є достатнім для знищення

небажаних мікроорганізмів і шкідників. Така температура сприяє розвитку корисних термофільних бактерій та актиноміцетів.

*Кондиціонування* проходить у наступні 2–7 діб за температури 45–55 °С. Метою його є стимуляція росту корисних термофільних мікроорганізмів, а також завершення виділення амоніаку. Після цього охолоджують субстрат до температури 25–28 °С через регульовану вентиляцію очищеним повітрям. Компост вважається готовим і його інокують зерновим посівним міцелієм, формують у брикети або (і) завозять у приміщення, де буде проходити культивування, та розташовують на стелажах. З введенням пастеризації та кондиціонування субстратів середня врожайність грибів зросла більше ніж на 100 % [58].

Сучасне промислове вирощування печериці – високотехнологічний процес, у якому передбачається можливість проведення інкубації компостної маси взагалом для отримання колонізованого культурою гриба субстрату. Такий субстрат прийнято називати компостом 3-ї фази. У цьому разі після інокуляції зерновим міцелієм у кількості 0,5–0,6 % по відношенню до маси компосту його інкубація проводиться у спеціалізованій камері, де підтримують оптимальний режим мікрокліматичних умов, які сприяють розвитку культури гриба. Колонізований компост не потребує додаткової інкубації в грибницях, тому після розташування на полицях шаром у 180–200 мм, зразу наносять покривний ґрунт. Звичайно, що за такого методу виготовлення ведення культури скорочується час вегетаційного циклу у камерах вирощування. Наукові досліді з використанням таких компостів передбачають тісні зв'язки з виробниками та можливість проведення загальних аналізів сировинних матеріалів, умов виготовлення компосту тощо.

### **3.5. Методи визначення показників мікрокліматичних умов**

Для моніторингу оптимальних чи дослідних режимів інкубації та плодоношення вимірюють такі показники мікроклімату приміщень: температуру у градусах за Цельсієм, відносну вологість повітря у відсотках, інтенсивність освітлення (люкс), вміст

вуглекислого газу (у відсотках або *ppm* – що є одною мільйонною частиною будь-чого загалом;  $1 \text{ ppm} = 0,0001 \%$ ). За умовами досліду можливе вимірювання додаткових показників: швидкості повітряних потоків (м/с), потужності вентиляційної системи ( $\text{м}^3/\text{год}$ ), тиску (у Паскалях – Па (*Pa*) чи атмосферах – атм) тощо.

Температуру повітря фіксують спиртовими або електронними термометрами, що перебувають безпосередньо у зонах вирощування (інкубації) культури. Для вимірювання температури у субстраті використовують щупові термометри. Обов'язково вимірюють температуру субстратів у центрі одиниці субстрату (блока чи брикету) та на периферії (у 10-міліметровій зоні від поверхні субстрату). За наявності системи автоматичного контролю зберігають файли з відповідними графіками, за відсутності – будують графіки вручну (Додатки *И, К, Л, рис. И.6, И.7*). Зібрану інформацію аналізують після проведення досліду з урахуванням кореляційних зв'язків між мікрокліматичними умовами та змінами фізичних та хімічних параметрів у субстраті, впливу факторів мікроклімату на ефективність росту культивура тощо.

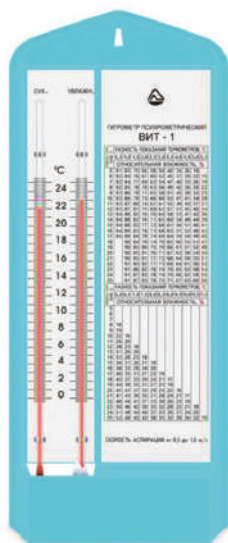


Рис. 3.13. Гігрометр психрометричний ВІТ-1

Відносну вологість повітря вимірюють психрометром Асмана, комбінованим гігрометром психрометричним ВІТ-1 (рис. 3.13), для вирощування тропічних видів – ВІТ-2. Допускається використання резистивних та електронних гігрометрів, але потрібно врахувати їх низьку точність за умов високих показників відносної вологості. Оптичні датчики є найбільш точними, але значно дорожчі за попередні.

Освітленість вимірюють люксометром на рівні полиць дослідного вирощування. Повторність вимірювань у кожній зоні 3–4 кратно. За використання освітлення з різними хвилями випромінювання до журналів записують відповідні дані (довжину хвилі, тривалість застосування тощо).

Вміст вуглекислого газу ( $\text{CO}_2$ ) у повітрі камери вирощування вимірюють мобільними приладами (рис. 3.14), оскільки цей параметр є дуже залежним від зони вимірювання показника. Наприклад, за недосконалої вентиляції у проходах між стелажми або полицями прилад показуватиме  $700 \text{ ppm}$ , а біля грибів  $3000 \text{ ppm}$ . На етапі інкубації вимірювання  $\text{CO}_2$  проводять біля нижніх полиць камер вирощування, а на етапі вирощування, за активної вентиляції камери, проводять виміри на відстані  $0,5 \text{ м}$  від підлоги, на рівні  $1\text{--}1,5 \text{ м}$  від підлоги та за необхідності на рівні  $3 \text{ м}$  від підлоги у безпосередній близькості до грибів та визначають середній показник. За умови проведення дослідів на окремих полицях вміст  $\text{CO}_2$  фіксують саме біля грибів дослідної ділянки, але впродовж досліду постійно у чітко визначених місцях.



Рис. 3.14. Прилад для вимірювання вмісту  $\text{CO}_2$

### 3.6. Методи фізичного та хімічного аналізу сировини, субстратів, готової продукції грибівництва

Аналіз *фізичних показників* – щільності, окисно-відновного або редокс-потенціалу, активної кислотності (pH) тощо, та аналіз *хімічного і біохімічного* складу – вміст мінеральних складових (золи), вміст нітрогену, карбону, полісахаридів (целюлози та лігніну), амінокислот та жирних кислот, ферментів тощо проводять відповідно до алгоритмів стандартизованих методів, опублікованих у рецензованих наукових журналах, ДСТУ тощо. До цієї групи методів належать визначення харчової цінності грибів – вмісту органічних речовин: протеїнів, ліпідів, цукрів та мінеральних: золи й води. Розрахунок енергетичної цінності грибів та продуктів їхньої переробки (калорійності) проводять відповідно до показників їхньої засвоюваності в організмі людини [33].

**Масу одиниць субстрату** (прямокутних брикетів, циліндричних блоків) визначають способом прямого зважування на вагах

2–3-го класів точності. Для аналізу ефективності вирощування культивару необхідно визначати початкову масу субстратної одиниці; масу після першої хвили плодоношення, а за необхідності кореляційного аналізу – після кожної хвили; масу після останнього збору. За умов нанесення покривного ґрунту визначають його масу та масу субстрату окремо; фіксують масу субстрату з покривним ґрунтом на проміжних етапах (після певної хвили плодоношення); по закінченні досліду визначають масу покривного ґрунту та субстрату окремо. Важливо проводити зважування ґрунту з аналогічними показниками вологості. Аналіз зміни маси субстрату впродовж культивування є необхідним для визначення ефективності розвитку культури у період інкубації та впродовж циклу вирощування в цілому, для дослідження впливу оточуючих факторів та оптимізації процесів підтримання мікроклімату.

**Щільність субстратів** визначають за формулою:

$$\rho = m / V,$$

де  $\rho$  – щільність субстрату,  $\text{кг}/\text{м}^3$ ;  $V$  – об'єм субстратного блока,  $\text{м}^3$ ;  $m$  – маса субстратного блока,  $\text{кг}$ .

Об'єм одиниці субстрату визначається залежно від форми пакування, найпоширенішими є прямокутна та циліндрична. Об'єм прямокутного пакування субстрату визначають за формулою:

$$V = a \times b \times h,$$

де  $V$  – об'єм,  $\text{м}^3$ ;  $a$  – ширина,  $\text{м}$ ;  $b$  – довжина,  $\text{м}$ ;  $h$  – висота брикету,  $\text{м}$ .

Об'єм циліндричного блока (наближений) визначають за формулою:

$$V = \pi \times r^2 \times h,$$

де  $V$  – об'єм субстратного блока,  $\text{м}^3$ ;  $\pi$  – 3,14;  $r$  – радіус блока,  $\text{м}$ ;  $h$  – висота блока,  $\text{м}$ .

Визначення **окисно-відновного потенціалу** проводять для аналізу ферментаційних процесів у субстратах, активності ферментного комплексу культиварів, фізіологічних процесів у плодкових тілах упродовж зберігання тощо. Окисно-відновний потенціал залежить від відносного вмісту окисненої ( $a_{ox}$ ) і відновленої ( $a_{red}$ ) речовини та вимірюється потенціометричним методом визначення