

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra zahradnictví



**Ošetření substrátu pro pěstování hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*)
vybranými bakteriemi**

**Treatment of substrate for the cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) with
selected bacteria**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Eva Balíková
Vedoucí práce: Ing. Ivan Jablonský CSc

© 2015 ČZU v Praze

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Ošetření substrátu pro pěstování hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*) vybranými bakteriemi" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce, s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne

Bc. Eva Balíková - autor práce

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu mé diplomové práce panu Ing. Ivanu Jablonskému, CSc. za pomoc při organizaci a odborném vedení práce, za poskytnutí specializované literatury k tomuto tématu a ochotu pomoci. Dále bych chtěla poděkovat Výzkumnému ústavu rostlinné výroby v Ruzyni za pomoc a dodání potřebných organických materiálů k založení pokusů.

Ošetření substrátu pro pěstování hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*) vybranými bakteriemi

Souhrn

Tato diplomová práce je zaměřena na zkoumání prorůstání mycelia dřevokazné houby hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*) substrátem, který byl vytvořen ze pšeničných pelet ošetřených vybranými bakteriemi. K inokulaci substrátu byly použity bakterie *Bacillus subtilis*, *Bacillus macerans*, *Trichoderma pleurotum* a preparát EMa Super Comp firmy EM-Eko.

Hlavním cílem bylo zkoumání, jak tepelné ošetření a inokulace vybranými bakteriemi ovlivní substrát pro pěstování hlívy. Zkoumala se použitá teplota a délka fermentace bakteriemi. U prvního pokusu byly použity sterilizované pelety a jako kontrolní varianta se použily pelety nesterilizované. K inokulaci byla použita směs mikroorganismů EMa Super Comp firmy EM - EKO. U druhého a třetího pokusu byly použity bakterie *Bacillus subtilis* a *Bacillus macerans*. U ostatních pokusů se k základním bakteriím přidala suspence *Trichoderma pleurotum* aby se zkoumalo, jak tepelné ošetření substrátu potlačí její rozvoj. Základní tepelné ošetření substrátu u prvního a druhého pokusu probíhalo při 30°C po celou dobu fermentace, ale u ostatních se teplota po třech dnech fermentace zvýšila na 50°C. Pouze u šestého pokusu se zjišťovalo, zda snížení teploty z 50° na 45°C výrazně ovlivní substrát pro hlívu. U sedmého pokusu se zkoumalo, zda lze použít separát z bioplynové stanice jako substrát pro hlívu. V osmém pokusu se porovnávalo použití vyšších teplot a jejich působení na mikrobiální složení substrátu.

V pokusech byl porovnáván růst mycelia hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*) u všech použitých variant substrátů. Bylo prokázáno, že použitá teplota a doba fermentace výrazně ovlivní mikrobiální složení substrátu a omezí jejich rozvoj. U fermentace substrátu při teplotě 30°C se neprojevovalo, že by teplota pozitivně omezila rozvoj konkurenčních hub a ovlivnila prorůstání mycelia. Naopak došlo k rozvoji plísní a ke kontaminaci substrátu. Nejúčinnější teplota fermentace byla 50°C, která výrazně omezila rozvoj zelených plísní a ostatních konkurenčních hub.

Klíčová slova: *Pleurotus ostreatus*, *Trichoderma pleurotum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus macerans*, fermentace, mycelium

Treatment of substrate for the cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) with selected bacteria

Summary

This diploma thesis is focused on exploring the penetration of wood - decaying fungi mycelia of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) substrate, which was created from the wheat pellets treated with selected bacteria. The inoculation of the substrate were used *Bacillus subtilis*, *Bacillus macerans*, *Trichoderma pleurotum* and preparation EMA Super Comp firm EM-Eko.

The main objective was to investigate, how heat treatment and inoculation selected bacteria affect the substrate for oyster cultivation. In the first experiment, straw pellets sterilized in an autoclave, but in other experiments not treated. Examined the temperature used and length of fermentation bacteria. In the first experiment were used a sterilized pellets and as a control option pellets were used unsterilized. The inoculation was used a mixture of microorganisms EMA Super Comp firm EM-Eko. In the second and third experiment were used the bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus macerans*. In other experiments, the bacteria added to a suspension of *Trichoderma pleurotum* to examine how the heat treatment of the substrate suppresses their development. The heat treatment of the substrate at the first and second experiment was carried out at 30°C throughout the fermentation, but other temperature after three days fermentation increased to 50°C. Only in sixth of the experiment it was examined, whether the decrease in temperature from 50°C at 45°C can significantly affect substrate for oyster mushroom. In the seventh experiment examined whether the use of a reprint of biogas plants as a substrate for oyster mushroom. In the eighth experiment compared the use of higher temperatures and their effects on the microbial composition of the substrate.

In experiments compared the growth of mycelia of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) for all the variants substrates. It has been shown that the temperature used and the fermentation time significantly affects microbial composition of the substrate and restrict their development. For the fermentation of the substrate at 30 ° C did not manifest that positively limit the temperature development of competing fungi and affected ingrowth mycelia. Conversely, there was a development of green mold and contamination of the

substrate. The most efficient fermentation temperature was 50 ° C, which greatly limited the development of mold and other competing fungi.

Keywords: *Pleurotus ostreatus*, *Trichoderma pleurotum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus macerans*, fermentation, mycelium

OBSAH

1 ÚVOD	- 1 -
2 CÍL PRÁCE A HYPOTÉZA.....	- 2 -
2.1 CÍL PRÁCE	- 2 -
2.2 HYPOTÉZA	- 2 -
3 LITERÁRNÍ REŠERŠE.....	- 3 -
3.1 HOUBY.....	- 3 -
3.1.1 CO JE HOUBA	- 3 -
3.1.2 CHARAKTERISTIKA HUB.....	- 3 -
3.1.3 OBSAHOVÉ LÁTKY A JEJICH ÚČINKY	- 4 -
3.1.3.1 ZÁKLADNÍ STAVEBNÍ LÁTKY.....	- 4 -
3.1.3.2 SPECIFICKÉ LÁTKY	- 6 -
3.2 HLÍVA ÚSTŘIČNÁ (PLEUROTUS OSTREATUS).....	- 8 -
3.2.1 DŘEVOKAZNÉ HOUBY	- 9 -
3.2.2 FYZIOLOGICKÉ POŽADAVKY HLÍVY	- 9 -
3.2.2.1 POŽADAVKY NA VÝŽIVU	- 9 -
3.2.2.1.1 MINERÁLNÍ VÝŽIVA	- 10 -
3.2.2.1.2 DUSÍK	- 10 -
3.2.2.1.3 UHLÍK	- 10 -
3.2.3 POŽADAVKY NA PROSTŘEDÍ	- 11 -
3.2.3.1 VLIV TEPLoty	- 11 -
3.2.3.2 VLIV PH NA RŮST MYCELIA.....	- 11 -
3.2.3.3 VLIV SVĚTLA.....	- 12 -
3.2.3.4 VLIV OXIDU UHLIČITÉHO	- 12 -
3.2.4 VZTAH HLÍVY A MIKROORGANISMŮ V TLEJÍCÍM DŘEVĚ A PĚSTEBNÍM SUBSTRÁTU.....	- 13 -
3.2.5 PĚSTOVÁNÍ HLÍVY.....	- 13 -
3.2.5.1 PĚSTOVANÉ DRUHY HLÍV	- 13 -
3.2.5.2 ZPŮSOBY PĚSTOVÁNÍ	- 15 -
3.2.5.2.1 PĚSTOVÁNÍ NA DŘEVĚ	- 15 -
3.2.5.2.2 PĚSTOVÁNÍ NA SLÁMĚ V DROBNÉM	- 16 -
3.2.6 PODMÍNKY KOLONIZACE SUBSTRÁTU	- 16 -
3.2.7 SUBSTRÁTY.....	- 17 -
3.2.7.1 PŘÍPRAVA SUBSTRÁTU	- 17 -
3.2.7.1.1 STERILIZACE ČI PASTERIZACE?	- 18 -

3.2.7.1.1.1	STERILIZACE	- 19 -
3.2.7.1.1.2	PASTERIZACE.....	- 19 -
3.2.7.2	OŠETŘENÍ SUROVIN PRO PŘÍPRAVU SUBSTRÁTŮ	- 20 -
3.2.7.2.1	HORKOU VODOU	- 20 -
3.2.7.2.2	NAMÁČENÍ V ALKALICKÉ VODĚ	- 21 -
3.2.7.2.3	CHEMICKÝM POSTŘÍKEM.....	- 21 -
3.2.7.2.4	SUCHOU PAROU	- 22 -
3.2.7.3	KULTIVACE PODHOUBÍ NA SUBSTRÁTU	- 22 -
3.2.7.3.1	BAKTERIE.....	- 22 -
3.2.7.3.1.1	BACILLUS SUBTILIS.....	- 23 -
3.2.7.3.1.2	BACILLUS MACERANS	- 25 -
3.2.7.3.2	TRICHODERMA SP. - ZELENATKA.....	- 26 -
3.2.7.3.2.1	TRICHODERMA PLEUROTUM.....	- 26 -
3.2.7.4	VYUŽITÍ VYPLOZENÉHO SUBSTRÁTU	- 28 -
3.2.8	SADBA	- 28 -
4	METODIKA.....	- 30 -
4.1	RŮSTOVÉ ZKOUŠKY MYCELIA PLEUROTUS OSTREATUS PŘI OŠETŘENÍ SUBSTRÁTU VYBRANÝMI BAKTERIEMI.....	- 30 -
4.1.1	HARMONOGRAM POKUSŮ	- 30 -
4.1.2	MATERIÁL A METODY	- 31 -
4.1.2.1	POKUS Č. 1.....	- 33 -
4.1.2.2	POKUS Č. 2.....	- 35 -
4.1.2.3	POKUS Č. 3.....	- 36 -
4.1.2.4	POKUS Č. 4.....	- 37 -
4.1.2.5	POKUS Č. 5.....	- 39 -
4.1.2.6	POKUS Č. 6.....	- 40 -
4.1.2.7	POKUS Č. 7.....	- 41 -
4.1.2.8	POKUS Č. 8.....	- 42 -
5	VÝSLEDKY	- 44 -
5.1	POKUS Č. 1	- 44 -
5.2	POKUS Č. 2	- 46 -
5.3	POKUS Č. 3	- 48 -
5.4	POKUS Č. 4	- 50 -
5.5	POKUS Č. 5	- 52 -
5.6	POKUS Č. 6	- 55 -

5.7	POKUS Č. 7	- 58 -
5.8	POKUS Č. 8	- 58 -
6	DISKUSE	- 61 -
7	ZÁVĚR	- 66 -
8	SEZNAM LITERATURY.....	- 67 -
8.1	KNIŽNÍ PUBLIKACE	- 67 -
8.2	DOKUMENTY	- 68 -
8.3	BAKALÁŘSKÉ A DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	- 69 -
8.4	WEBOVÉ ZDROJE.....	- 69 -
9	PŘÍLOHY	- 70 -
9.1	GRAFY A TABULKY	- 73 -
9.1.1	POKUS Č. 1	- 73 -
9.1.2	POKUS Č. 2	- 76 -
9.1.3	POKUS Č. 3	- 79 -
9.1.4	POKUS Č. 4	- 81 -
9.1.5	POKUS Č. 5	- 84 -
9.1.6	POKUS Č. 6	- 87 -
9.1.7	POKUS Č. 8	- 90 -
9.2	FOTODOKUMENTACE	- 93 -

1 ÚVOD

Tato diplomová práce se zabývá zkoumáním vlivu inokulovaných bakteriální populace na použitý substrát. V práci bylo studováno, zda použité bakterie ovlivní substrát negativně, pozitivně či neutrálně. V substrátu jsou přítomny již některé nespecifikované bakterie a kromě vzájemného působení se zkoumalo, zda ovlivňuje přítomnost ostatních bakterií i použitý způsob fermentace. Je otázka, jakých teplot lze při fermentaci využít a to zejména zdali stačí nižší teploty, které jsou pro velkopěstitele energeticky méně náročné a lépe využitelné než vysoké teploty.

Z tohoto důvodu se zkoumalo použití nižších teplot a celková doba fermentace substrátu. Do substrátu se inokulovaly vybrané druhy bakterií a sledovalo se jejich ovlivnění na ostatní přítomné organismy. Povrch substrátu byl naočkován sadbou hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*) a v týdenních intervalech se pozoroval průběh prorůstání mycelia substrátem. Zjištěné výsledky růstu mycelia a výskytu kontaminace byly vyhodnoceny.

2 CÍL PRÁCE A HYPOTÉZA

2.1 CÍL PRÁCE

Ošetření substrátu pro pěstování hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*) vybranými bakteriemi

Cílem této práce je zjištění, které bakterie či organismy více ovlivňují růst mycelia hlívy (*Pleurotus ostreatus*) v substrátu vytvořeném z pelet z nadrcené pšeničné slámy. K nalezení požadovaných informací byly založené pokusy, ve kterých se zkoumala rychlost prorůstání mycelia hlívy. Hlavním cílem bylo ověřit schopnost bakterií rodu *Bacillus* kolonizovat substrát a vytvořit tak ze substrátu selektivní medium vhodné pro mycelium hlívy a chránit před kontaminací jinými konkurenčními druhy hub.

2.2 HYPOTÉZA

Řízená fermentace pelet z nadrcené pšeničné slámy pro přípravu substrátu hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*) zlepší podmínky růstu mycelia hlívy a zabrání vývoji konkurenčních hub.

3 LITERÁRNÍ REŠERŠE

3.1 HOUBY

3.1.1 CO JE HOUBA

Historicky byly houby zařazeny mezi tzv. nižší v rostliny v oddělení *Thallophyta* podle Linnaeuse. To bylo z velké části způsobeno relativně jednoduchými, anatomicky nekomplikovanými strukturálními vlastnostmi (nedostatek pravých kořenů, pravého stonku, pravých listů, pravých květů a pravých semen). Moderní studie prokázaly, že biota hub, spolu s dalšími houbami mají svoje vlastnosti, které jsou dostatečné a výrazné, k odlišnému umístění do samostatného houbového království. Houby se liší od rostlinné a živočišné říší složením jejich buněčné stěny a způsobem výživy, která je heterotrofní, na rozdíl od zvířat, je absorpční než trávicí (Chang at Miles, 2004).

Na rozdíl od rostlin houby nemají chlorofyl a nejsou proto schopné využívat energii slunečního záření k tvorbě organických molekul. Na rozdíl od živočichů, kteří tráví potravu uvnitř těla v trávicím ústrojí, houby rozkládají organické složky vně své stélky tím, že do okolí vylučují hydrolytické enzymy, které štěpí substrát na menší části a ty jsou absorbovány dovnitř houbové stélky.

Dalším znakem, kterým se odlišují houby od rostlin, jsou zásobní a transportní látky. U rostlin je zásobní látkou škrob a transportními formami cukru je glukóza, sacharóza a fruktóza. U hub jsou hlavní zásobními látkami tuky, glykogen a sacharidy, které se transportují stélkou ve formě cukerných alkoholů (manitolu a arabitolu) a disacharidu trehalózy (Jablonský a Šašek, 2004).

3.1.2 CHARAKTERISTIKA HUB

Houby v procesu životního cyklu jsou schopné se reprodukovat stejně jako všechny ostatní živé věci. V případě hub, reprodukční orgán může mít několik forem. Jedna konkrétní třída hub, basidiomycetes, produkuje velký masitý reprodukční orgán, který běžně známe jako houbu. Mnoho z těchto hub jsou používány jako poživatiny, ale ve skutečnosti

představují velmi kvalitní výživu, často se rovná nebo je vyšší než maso v množství bílkovin a esenciálních aminokyselin (Grianotti et al., 2012).

Houby mají nezastupitelnou roli v přírodě ale i v životě člověka. Základní úloha v přírodě je v jejich podílu na rozkladu organické hmoty na anorganické sloučeniny. Podílejí se však i na humifikaci, kdy dochází k částečnému rozložení organické hmoty na humusové látky (Valíček, 2011).

Vegetativní část houby tzv. mycelium, obsahuje systém větvení vláken a řetězových pramenů, které se větví prostřednictvím půdy, kompostu, dřeva nebo jiného lignocelulózového materiálu, na kterém houby rostou. Po období růstu, a za příznivého stavu založené mycelium vytváří rodící strukturu - plodnici (Chang at Miles, 2004).

3.1.3 OBSAHOVÉ LÁTKY A JEJICH ÚČINKY

Po staletí se uvádělo, že houby nemají nejen žádnou výživovou hodnotu ale též, že nepřispívají ke zlepšení našeho zdraví. Dnes je známo, že houby kromě základních obsahových látek řadu specifických látek, které příznivě ovlivňují naše zdraví (Valíček, 2011).

Houby kromě základních sloučenin, potřebných pro činnost a stavbu buněk, syntetizují řadu speciálních sloučenin (nazývaných sekundární metabolity). V současné medicíně se běžně využívá několik skupin antibiotik houbového původu (cefalosporin, penicilin, griseofulvin) (Lepšová, 2005).

3.1.3.1 ZÁKLADNÍ STAVEBNÍ LÁTKY

Houby patří mezi ideální součást lidské stravy, protože jsou cenným zdrojem bílkovin, minerálních látek i vlákniny a naopak obsahují málo tuku a sacharidů. V houbách je nejvíce obsažená voda a to ve velmi rozdílném množství, které se pohybuje mezi 75 – 94% a zbytek tvoří sušina. Z hlavních obsahových látek je v sušině hub obsaženo 24,4 – 63% bílkovin, 0,1 – 6,7% tuku, 4,3 – 55% sacharidů a 0,6 – 2,5% minerálních látek (Valíček, 2011).

BÍLKOVINY

Kvalita bílkovin závisí na zastoupení jednotlivých aminokyselin. Je známo, že z celkového počtu 20 aminokyselin tvořících bílkoviny lidského organismu si může asi 11 z nich vytvořit naše tělo samo, ostatní získáváme z potravy. V houbách je nejčastěji zastoupen např. lysin, leucin, threonin, methionin a tryptofan. Z ostatních aminokyselin obsahují velké množství prolinu ale také arginin, asparagin, glutamin, serin, alanin a glycin (Valíček, 2011).

TUKY

Obsah tuku v plodnicích je zanedbatelný. Lipidy jsou zastoupeny různými sloučeninami, např. fosfolipidy, lipoproteiny, glykolipidy ale také steroidy. Jsou obsaženy hlavně v buněčných membránách, kde mají ochrannou funkci a jsou zásobními látkami (Valíček, 2011).

SACHARIDY

Tato skupina je zastoupena rozpustnými cukry obsaženými v plazmě. Jde hlavně o trehalózu. Podílí se na stavbě buněčné stěny a je stabilizátorem buněčné membrány. Dále je to ribóza a glukóza, galakany ale také glykogen, zásobní cukr, jinak polysacharid tvořený molekulami glukózy. V plodnicích najdeme i cukerné alkoholy, jako je např. mannitol, sorbitol, volemitol a erythrinol (Valíček, 2011).

POLYSACHARIDY

Nejvýznamnější látky s léčivými účinky, které se vykytují v houbách a jsou nejčastěji složeny z glukózy a nazývají se glukany.

GLUKANY se rozlišují podle glykosické vazby. Nejrozšířenější jsou β - (1, 3) - D - glukany, β - (1, 6) - D - glukany a α - (1, 3) - D - glukany. Kromě uvedených glukanů mohou polysacharidy obsahovat v molekule mimo glukózy i jiné monosacharidy, např. anabiózu, xylózu, galaktózu aj., které se nazývají heteroglykany. Z heteroglykanů je to např. krestin, polysacharid K aj.

Glukany jsou specifické pro jednotlivé druhy hub např. hlíva ústřičná (*Pleurotus ostreatus*) obsahuje pleuran, houževnatec jedlý (*Lentinula edodes*) obsahuje lentinan,

kladnolíska obecná (*Schizophyllum commune*) obsahuje schizophyllan a penízovka sametonohá (*Flammulina velutipes*) obsahuje flammulin.

Tyto glukany jsou modifikátory biologické reakce a pomáhají lidskému tělu adaptovat se na různé nepříznivé podmínky prostředí. Zvyšují aktivitu protinádorových buněk, až 100krát a zabraňují růstu vlastního nádoru. Indukují tvorbu interferonu, aktivují buňky zajišťující obranyschopnost organismu (Valíček, 2011).

Obecně glukany zvyšují aktivitu imunitního systému. Jejich antineoplazmatická aktivita nespočívá v cytotoxicitě, ale v aktivaci buněčného imunitního systému. Glukany zvyšují aktivitu buněk nukleových kyselin a projevují protivirové a protizánětlivé vlastnosti. Také přispívají ke snížení cholesterolu (Jablonský a Sašek, 2006).

VLÁKNINA

Uvádí se jako dietetická. Houbová vláknina obsahuje v sušině kolem 26% nerozpustné a asi 1% rozpustné vlákniny. Zahrnuje škálu nestravitelných sacharidů s odlišnými fyziologickými a fyzikálními účinky. Pro člověka je chitin téměř nestravitelný, ale podporuje peristaltiku a činnost střev. Z chitinu získávaný chitosan snižuje hladinu cholesterolu v krvi (Valíček, 2011).

MINERÁLNÍ LÁTKY

Popel představuje celkový obsah minerálních látek v houbách. Tvoří v průměru 8% v sušině. Nejvíce zastoupený je draslík (cca. 3000 mg/ 100 g sušiny), dále fosfor (500- 1000 mg), síra (200 mg), hořčík (přibližně 80- 180 mg) a překvapivě malé množství tvoří sodík a vápník (30 mg). Obsah uvedených prvků v houbách je srovnatelný s obsahem, jako je v zelenině, pouze obsah fosforu je vyšší (Antonín a kol., 2013).

3.1.3.2 SPECIFICKÉ LÁTKY

Tyto specifické látky jsou typické pro většinu hub. Většinou jde o látky, které nejsou nutné pro stavbu či činnost buněk i celého organismu houby. U těchto tzv. sekundárních metabolitů není plně objasněn jejich význam.

TRITERPENOIDY

Terpeny jsou látky mimo jiné obsažené také v houbách. Pro nás jsou významné triterpenoidy do nichž patří až 4000 látek, a to nejen vlastní triterpenoidy ale rovněž fytosteroly, saponiny aj..

Triterpenoidy obsahuje hlavně lesklokorka lesklá (*Ganoderma lucidum*), a to v počtu cca. 120, z toho má asi 80 fyziologické účinky. Jde například o kyselinu ganodermovou a ganoderovou, ganodermediol, lanostan, ganoderesyren A-Z, ganoderiolen A a B, ganoderalen A-C aj. (Valíček, 2011).

LEKTINY

Jedná se o skupinu bílkovin schopných vázat určité struktury obsahující volné i vázané cukry (např. glykoproteiny, polysacharidy). Účastní se mnoha dějů, které je nutné specificky rozpoznávat tj. např. vzájemných vztahů mezi patogenem a hostitelem či imunologických reakcí. Mohou působit pozitivně (tlumí nárůst nádorových buněk tím, že blokují syntézu bílkovin), ale na druhé straně i negativně (jsou schopné srážet červené krvinky a ve velkém množství působí antinutričně). Mohou být toxické, způsobovat například zvracení, krvavé průjmy, zánět žaludku, ztrátu tekutin až šok. Plodnice hlívy ústříčné je obsahují v množství nepoškozující lidské zdraví (Valíček, 2011).

FOSFOLIPIDY

Patří mezi tuky a mimo jiné hlavní jsou hlavní součástí buněčných membrán. Významnou skupinou jsou tzv. esenciální fosfolipidy, neboť mají příznivý vliv na stavbu a funkci jaterních buněk. Ty ovlivňují činnost jater, zvyšují jejich regenerační schopnost a detoxikační účinky.

VITAMÍNY

Jsou to látky, které si tělo nedokáže vytvořit samo, ale přitom jsou pro tělo nezbytné. I v malých dávkách ovlivňují růst, vývoj a správnou činnost organismu. Houby patří mezi významný zdroj celé škály vitaminů, především vitaminů B₁, B₂, B₃, B₄, B₆, někdy B₁₂ ale také vitaminu E a K. U některých hub je zastoupený i β-karoten. Velký význam má i kyselina listová (vitamin B₉), která je nezbytná pro tvorbu nukleových kyselin a při krvetvorbě.

ENZYMY

Princip výživy hub pomocí jejich enzymatických aktivit je takový, že houbová stélka produkuje enzymy do vnějšího prostředí - extracelulárně, mimo své buňky. Ve vnějším prostředí enzymy naštípají velké molekuly (polysacharidy a bílkoviny) na menší části, které už houba může přenést přes cytoplazmatickou membránu dovnitř buňky a tam je pomocí jiných enzymů strávit. Enzymy je štěpí na jednoduché cukry a aminokyseliny (Antonín a kol. 2013).

LOVASTATIN (MEVINOLIN, MONACOLIN K)

Patří do skupiny statinů. Hlíva ústříčná jej obsahuje 0,4 – 2,7% v sušině. Je účinný v metabolismu cholesterolu, snižuje jeho hladinu, stejně jako obsah tuku a cukru v krvi, chrání před vznikem infarktu myokardu. Má i účinky protialergické (Jablonský a Šašek, 2006).

3.2 HLÍVA ÚSTŘIČNÁ (*PLEUROTUS OSTREATUS*)

Rod *Pleurotus* je příbuzný celé řadě jiných rodů. Téměř každá jeho sekce má blízké vztahy k nějakému jinému rodu (*Lentinus*, *Tricholoma*, *Clitocybe*, *Omphalia*).

Plodnice bývají zpravidla trsnaté, vzácně jednotlivé, obyčejně střešovitě, klobouk masitý, excentricky až skoro postranní, vzácně skoro centrální, okrouhlý, jazykovitý až skoro lopatkovitý, více méně horizontální, v mládí sklenutý, pak rozložený, zbarvením velice proměnlivý, bledý až bělavý, v mládí většinou tmavší.

Pleurotus ostreatus (Jacq.:Fr.) je jednou nejproměnlivějších hub vůbec. Plodnice se značně mění jak velikostí, tak tvarem a zbarvením klobouku (Pilát, 1935).

Hlíva patří mezi dřevokazné houby, které jsou v přírodě svým výskytem vázány na dřevo. Způsobují jeho rozklad označenou jako hniloba nebo tlení. Tím je vyznačena i jejich fyziologie. Prorůstají svými hyfami dřevo a svou činností rozkládají buď jen jeho celulózní (polysacharidickou) složku, nebo kromě ní stravují i lignin. Z obecného hlediska se dřevokazné houby rozdělují do dvou skupin: Houby celulozovorní, které rozkládají jen celulózní složku (polysacharidickou) složku dřeva a způsobují načervenalou postupně hnědnoucí barvu dřeva. Zatímco hlíva patří mezi houby lignovorní, která vede celulózní (

polysacharidické složky dřeva a rozkládají i lignin. Dřevo většinou světlá, i když mnohdy v prvních etapách rozkladu může nabývat přechodně tmavších tónů (Rypáček, 1957).

Často se hovoří o tom, zda může být hlíva nebezpečná živým stromům. Bylo prokázáno, že hlíva naočkovaná na živé stromy se dále nešíří. Mycelium působí bělavé trouchnivění dřeva. Infekce proniká do dřeva živého stromu zejména různými ranami po ulomených větvích. Kalamitní výskyt hlívy byl pozorován na stromech silně oslabených lesním požárem (Jablonský a Šašek, 1997).

Hlíva ústříčná (*Pleurotus spp.*) je cennou potravinou s vysokým obsahem bílkovin a obsahem vitamínů a nízkým obsahem tuku. (Vajna, 2009).

3.2.1 DŘEVOKAZNÉ HOUBY

Rozkládají dřevo buď se stromů pokácených, dřevo už zpracované nebo prostě mrtvé, nebo rozkládají dřevo ještě za jejich života. Rozeznáváme houby saprofytické, a parazitické. Většina z nich přechází z parazitismu do saprofytismu nebo obráceně, takže nenacházíme jeden a týž samý druh rostoucí jednou na živém stromu, jindy na mrtvém dřevě (saproparaziti).

Soustavně studovat a pochopit fyziologii dřevokazných hub, jejich výživu a metabolismus či zvládnout jejich vzájemné vztahy, to předpokládá mnoho záměrně prováděných pokusů v laboratoři (Rypáček, 1957).

3.2.2 FYZIOLOGICKÉ POŽADAVKY HLÍVY

3.2.2.1 POŽADAVKY NA VÝŽIVU

Hlíva je kosmopolitní rod, který se vyskytuje ve všech zeměpisných šířkách a vegetačních pásích obou polokoulí. Podhoubí většinou osidluje dřevo listnatých stromů, jedinou výjimkou je hlíva holubí, která roste na dřevě listnatých i jehličnatých dřevin (Jablonský a Šašek, 2006).

3.2.2.1.1 MINERÁLNÍ VÝŽIVA

Je určována především svým substrátem, na kterém rostou. Dřevo i rostoucí strom je poměrně chudý na popeloviny, obsah popele se pohybuje kolem 1% v jeho sušině. Proto i požadavky na minerální výživu jsou velmi malé. Zvyšování minerálních látek v substrátu nepůsobí nijak nápadně ani na růst, ani na činnost hub (Rypáček, 1957).

3.2.2.1.2 DUSÍK

Dusík je prvek, který je pro houby velmi důležitý. Zúčastní se nejen jejich výstavby chitinové buněčné blány, ale dává především základ bílkovinné složce jejich protoplastu. Je součástí molekuly aminokyselin, proteinů a proteidů, četných enzymů aj. Dřevo je substrát velmi chudý na dusík (poměr C/N je ve dřevě 250 - 1250/1).

Růst i činnost dřevokazných hub záleží tedy značně na obsahu N látek v substrátu (Rypáček, 1957).

Dusík je nezbytný pro syntézu bílkovin, purinů a pyrimidinů. Chitin, polysacharid společného výskytu v buněčných stěnách mnoha hub rovněž obsahuje dusík. Houby využívají různých zdrojů k získání dusíku pro syntézu těchto základních sloučenin. Jiné zdroje dusíku využitelného houbami zahrnuje dusičnan amonný a organický dusík. Studie metabolismu dusíku za použití mikroorganismů, včetně mutantů v ascomycete *Neurospora*, vedly k následujícím zobecněním: druhy využívající dusičnan mohou také využít amonný iont a organický dusík, a druhy využívající amonný iont mohou také využít organické dusíkaté sloučeniny (Chang and Miles, 2004).

3.2.2.1.3 UHLÍK

Zcela zásadní význam mají houby v koloběhu uhlíku, který získávají zejména rozkladem polysacharidů (celulózy, ligninu aj.), ale i tuků a jiných látek – jejich rozklad finálně vede až k CO₂.

Zdroje uhlíku, vhodné pro růst mycelia jsou škrob, glukóza, pektin, celulóza a lignin. Etanol je také zdrojem uhlíku pro růst mycelia, nicméně citrát, oxalát a další organické kyseliny nejsou příznivé pro jeho růst (Chang and Miles, 2004).

3.2.3 POŽADAVKY NA PROSTŘEDÍ

V přírodě roste hlíva většinou na odumřelém dřevu, ale rychle rostou i na různých organických odpadech jako je sláma, kukuřičná vřetena, hrachovina, pazdeří, vojtěškové seno nebo papír. Suroviny, na kterých hlívy rostou, můžeme charakterizovat jako lignocelulózové odpady, tedy látky obsahující lignin, celulózu a hemicelulózu. Předpokladem je, že tyto materiály musí projít tepelným ošetřením- pasterizací, popřípadě sterilizací (Jablonský a Šašek, 2006).

Mnoho různých druhů hlívy ústřičné se vyvíjelo na různých místech po celém světě a staly se více či méně specializované na štěpení různých zdrojů surovin celulózy (substrátu) při různých teplotách, kyslíku a množství světla (aklimatizace) (Griatolli et al., 2012).

3.2.3.1 VLIV TEPLoty

Pro klíčení spor je optimální teplota 28°C. Při teplotě 20°C je růst mycelia zpomalený, což může vést k nezvýhodnění hlívy vůči kompetičním mikroorganismům. Růst mycelia se zcela zastaví při teplotě 5°C. Mycelium nepoškodí ani mráz. Substrát, který je kolonizovaný myceliem hlívy může být vystaven teplotám pod nulou a po zvýšení teploty mycelium opět začíná růst a kultura vytváří plodnice. Větším problémem je v letních měsících přehřívání substrátu v intenzivní kultuře. Mycelium odumírá při teplotách nad 32 - 35°C v závislosti na vlhkosti substrátu. V praxi to znamená, že vrstva substrátu nemá být vyšší než 35 cm a do polyetylénových pytlů nedáváme víc než 20 kg.

V průběhu nasazování zárodků mají jednotlivé druhy hlív svá teplotní maxima, která v případě, že jsou překročena, tak zcela znemožňují nasazování plodnic hlívy ústřičné. Optimální teplota pro nasazování zárodků plodnic probíhá při teplotě 8 - 12°C a zcela se zastavuje při překročení 15°C (Jablonský a Šašek, 2006).

3.2.3.2 VLIV PH NA RŮST MYCELIA

Optimální pH pro během růstu podhoubí hlívy je v rozmezí 5,5 - 6,5. Růst mycelia mimo rozmezí uvedených hodnot je zpravidla pomalejší. Při přípravě substrátu se upravuje hodnota pH přidáním vápence (mleté křídly) na hodnotu 5,6 - 6,6 pH. Během růstu mycelia

se hodnota pH v substrátu mění. V povrchové vrstvě je pH podstatně nižší než ve vnitřních vrstvách (Jablonský a Šašek, 2006).

3.2.3.3 VLIV SVĚTLA

Během kolonizace substrátu hlíva osvětlení nepotřebuje, avšak během nasazování a vývoje plodnic je potřebná určitá intenzita osvětlení. Pro vývoj normálně vyvinutých plodnic je dostačující intenzita okolo 100 - 400 luxů (měřeno na povrchu substrátu) po dobu 12 hodin za den. Při vyšší teplotě, kdy plodnice rychleji rostou, má vyšší nároky na osvětlení než při nižších teplotách. Na nedostatek osvětlení hlíva reaguje protáhlým třeněm a zakrslým kloboukem. Při úplné tmě se vytváří místo plodnic temnostní formy tvarem připomínající květák. Optimální osvětlení má vliv na vybarvení klobouku. Při nedostatku osvětlení mají plodnice světlou barvu (Jablonský a Šašek, 2006).

3.2.3.4 VLIV OXIDU UHLIČITÉHO

V průběhu vývoje se kultura hlívy vyznačuje zcela odlišnými nároky na koncentraci oxidu uhličitého v prostředí. Během kolonizace(prorůstání) substrátu dosahuje mycelium nejvyšší rychlosti růstu, pokud je v substrátu koncentrace 2000 - 3000 ppm oxidu uhličitého. Vysoká koncentrace potlačuje růst konkurenčních zelených plísní, proto se pěstební bloky či pytle perforují jen částečně, aby se v substrátu udržela zvýšená koncentrace CO₂. V průběhu nasazování a vývoje plodnic je potřeba pěstírnu intenzivně větrat jinak dochází k deformaci plodnic a třeně jsou většinou protáhlé, šroubovitě stočené.

Při hodnotě 1100 ppm se výnos snižuje o 43% a při 1500 ppm až o 80% oproti optimální tolerované koncentraci 400 - 600 ppm. Při vysoké koncentraci nad 2000 ppm CO₂ tvorba plodnic ustává (Jablonský a Šašek, 2006).

3.2.4 VZTAH HLÍVY A MIKROORGANISMŮ V TLEJÍCÍM DŘEVĚ A PĚSTEBNÍM SUBSTRÁTU

Hlívy se v živném substrátu setkávají s podhoubím jiných druhů hub (s kvasinkami a s bakteriemi), které si nárokují právo substrát využívat - získávat z něj živiny. Soupeří mezi sebou o volně dostupné živiny. Zvítězí ten organismus, který umí získat živiny co nejrychleji a který má dobře a rychle fungující enzymy, má zčásti vyhráno. Glukózu získávají houby rozkladem celulózy. Ta se však, pokud není okamžitě přijata do podhoubí, stane předmětem zájmu ostatních.

U některých druhů hlív se prokázalo protibakteriální působení. Hlíva dubová a hlíva máčková zastavovaly růst bakteriálních kolonií (*Bacillus subtilis* a *Escherichia coli*). Hlíva máčková také omezovala růst kvasinky *Candida pseudotropicalis*.

Hlíva ústříčná pro svou ochranu uvolňuje plynnou látku methoxybenzaldehyd, který potlačuje růst grampozitivních a gramnegativních bakterií a hub. Zastavuje růst a klíčení výtrusů konkurenčních hub. Plodnice ale tuto látku nevylučují, místo ní obsahují oktenol, který zaručuje protibakteriální ochranu plodnice a tím poskytuje dostatečně dlouhý čas pro dozrávání a uvolňování výtrusů. Toto zjistil kolektiv autorů vedený D.Woodem v roce 2000 (Lepšová, 2005).

3.2.5 PĚSTOVÁNÍ HLÍVY

Amatérské pěstování hlívy je poměrně jednoduché a potřeby k němu jsou snadno dostupné. Obecně lze využít velmi jednoduchých postupů i postupů složitějších, pěstitelský výnos je jistější při použití modernějších způsobů pěstování. Je ale potřebné dodržet několik nutných podmínek - připravit substrát tak, aby jej neosídlily jiné druhy hub než hlíva, při kultivaci zabránit vysychání substrátu.

3.2.5.1 PĚSTOVANÉ DRUHY HLÍV

Výběr nejlepších druhů a kmenů hlívy ústříčné je nejdůležitějším krokem při vytváření úspěšné programu pěstování hub. Neexistuje jeden kmen, který je lepší než jiné kmeny, to vše záleží jen na klimatu, substrátu a použité kultivační metodě. Jediný způsob, jak určit

nejlepší druhy a kmeny pro pěstování v jakékoli dané situaci je experimentovat s několika typy hlívy ústříčné a zaznamenat čas výroby a výnos pro každý kmen v těchto konkrétních okolnostech. (Holliday at al., 2009).

Pro pěstování přichází v úvahu široké spektrum druhů hlív. Jednotlivé druhy mají podobné nároky na výživu, výrazně se však liší v požadavcích na teploty v průběhu kolonizace substrátu či při nasazování a tvorbě plodnic. Vedle chladnomilné hlívy ústříčné se pěstují druhy teplomilné a tropické (Jablonský a Sašek, 1985).

Hlíva ústříčná [*Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex Fr.) Kumm.]. Tato houba je rozšířena v mírném klimatickém pásmu. Plodnice vytváří většinou na podzim a v zimě - někdy na jaře v teplotě 15 °C. Vyrůstají střechovitě nad sebou. Klobouk masitý, šedé až hnědé barvy, na povrchu hladký a suchý. Dužina bělavá, poměrně tlustá, příjemné vůně i chuti. Třeň obyčejně silně excentrický až postranní, hladký nebo podélně rýhovaný.

Kultivar hlívy ' Florida ' (*Pleurotus* sp. cv. ' Florida '). S touto kulturou je provedeno mnoho pokusů studujících tvorbu plodnice, protože velmi ochotně vytváří plodnice i při teplotě 20 - 25°C. Plodnice jsou zpravidla menší než *P. ostreatus*. Kultura vytváří velmi brzo po osázení plodnice a dosahuje velkého výnosu. Dužina klobouku je tenčí než *Pleurotus ostreatus*, což zpravidla způsobuje, že na okraji klobouk snadno praská, plodnice vysychají a během manipulace jsou poškozovány.

Dnes se převážně pěstují kříženci mezi *Pleurotus* sp. cv. ' Florida ' a *Pleurotus ostreatus*. Tito kříženci mohou vytvářet plodnice v širokém rozmezí 5 až 25°C i dosahovat dobrého výnosu.

Hlíva máčková [*Pleurotus eryngii* (DC ex Fr.) Quél]. Tento druh se v přírodě vyskytuje volně ve stepích. Parazituje na kořenech rostlin čeledi mrkvovitých. Umělou infekcí bylo dosaženo jejich růstu a tvorby plodnic i na kořenech mrkve seté. Plodnice mají klobouk hnědý, šedohnědý až šedý, často s tmavšími pruhy paprskovitě se rozbíhajícími od středu. Jednotlivé kmeny se liší barvou, tvarem, velikostí klobouku, silou a pevností dužiny. Klobouk v mládí podvinutý, u dospělých plodnic ve středu nálevkovitě prohloubený. V přírodě nalezené plodnice jsou zpravidla menší než plodnice pěstované.

Hlíva miskovitá [*Pleurotus cornucopiae* (Paulet et Pers.) Rolland]. V přírodě se vyskytuje v lužních lesích, kde osidluje mrtvé dřevo kmenů a pařezů olší, dubů a bříz. Je rozšířena v teplejších oblastech jižní Evropy ale i v Japonsku. Plodnice vytváří od května do září. Klobouk je krémově zbarvený, v mládí klenutý s podvinutými okraji, v dospělosti je

plochý a nad třeněm vtlačeny. Lupeny jsou zpočátku bílé, později krémové, na třeni sbíhavé. Dužina bílá, pevná, moučné chuti, u některých kmenů příliš aromatická (obsahuje kyselinu kumarovou).

Hlíva plicní [*Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél.], vytváří plodnice ve vyšší teplotě, klobouk je zbarvený krémově.

Hlíva sajor - caju [*Pleurotus sajor - caju* (Fr.)], je velmi rozšířený druh v jihovýchodní Asii. Sajor - caju znamená malajsky „ zelenina ze dřeva ". Pěstuje se v tropech na rostlinných zbytcích (Jablonský a kol., 1985).

3.2.5.2 ZPŮSOBY PĚSTOVÁNÍ

Hlívu pěstujeme intenzivním a extenzivním způsobem. Pro intenzivní pěstování se ve světě jako substrát se používá sláma a další lignocelulózové odpady (řepková, rýžová, a kukuřičná sláma, hrachovina, kukuřičná vřetena, piliny, bagasa, bavlníkový odpad, papír, zelená hmota z vodního hyacintu, kokosová vlákna apod.). Touto hmotou houba rychle prorůstá a pěstitelský cyklus je poměrně kratší než při pěstování na špalcích dřeva (Jablonský a Šašek, 2006).

Intenzivním způsobem pěstování vytváříme pro růst houby optimální podmínky. Většinou k tomu využíváme tzv. pěstírny - zařízení, kde regulujeme teplotu, vlhkost vzduchu a půdy, intenzity světla apod. Technologie pěstování je u každého druhu specifická a to pokud jde o substrát, tak i o podmínky prostředí. Navíc tyto podmínky se mění v každém stadiu během pěstování. Bez znalostí o pěstování nemůžeme být úspěšní.

Extenzivní pěstování probíhá v přírodních podmínkách. Výsledky jsou zde závislé na průběhu a charakteru vnějšího prostředí. Často se jedná o pařezy a klády rozmanitých druhů stromů, ale např. i polyethylenové pytle naočkované sadbou hlívy (*Pleurotus*), ponechané v přírodním prostředí, např. pod stromy (Valíček, 2011).

3.2.5.2.1 PĚSTOVÁNÍ NA DŘEVĚ

Extenzivní pěstování probíhá v přírodních podmínkách. Výsledky jsou zde závislé na průběhu a charakteru vnějšího prostředí. Často se jedná o pařezy a klády rozmanitých druhů

stromů, ale např. i polyetylenové pytle naočkované sadbou hlívy (*Pleurotus*), ponechané v přírodním prostředí, např. pod stromy (Valíček, 2011).

Při intenzivním způsobu pěstování vytváříme pro růst houby optimální podmínky. Většinou k tomu využíváme tzv. pěstírny - zařízení, kde regulujeme teplotu, koncentraci CO₂, vlhkost vzduchu a půdy, intenzity světla apod. Technologie pěstování je u každého druhu specifická a to pokud jde o substrát, tak i o podmínky prostředí. Navíc tyto podmínky se mění v každém stadiu během pěstování (Valíček, 2011).

3.2.5.2 PĚSTOVÁNÍ NA SLÁMĚ V DROBNÉM

Můžeme používat slámu z různých druhů obilnin (pšeničnou, žitnou, ječnou a řepkovou), která byla skladována v suchu a nesmí být napadena plísněmi. Slámu nařežeme na délku 3 - 5 cm, dáme do čistého polyetylenového pytle a stlačíme. Pytel se slámou naplníme horkou vodou o teplotě alespoň 90°C, zavážeme a necháme 2 hodiny stát. Tyto pytle očkujeme tak, že rovnoměrně promícháme sadbu s celým obsahem pytle a část sadby nakonec nasypeme na povrch osázené slámy. Pytle uložíme k prorůstání do temné místnosti s teplotou okolo 20°C na 3 - 4 týdny. Jakmile je sláma prorostlá bílým myceliem uděláme do pytle několik zářezů, postavíme je do teploty 8 - 12°C na světlé místo a během 2 - 4 týdnů začnou ze zářezů vyrůstat plodnice. Pytel plodí tak dlouho, dokud jeho obsah nezměkne a nezačne se rozkládat. Období plodnosti může trvat 2 - 3 měsíce v závislosti na teplotě (Jablonský a Šašek, 2006).

3.2.6 PODMÍNKY KOLONIZACE SUBSTRÁTU

Při intenzivním způsobu pěstování (např. na slámě) jsou v substrátu přítomny zárodky mnoha dalších druhů hub (plísní), které jsou schopné růst na substrátu stejně rychle jako hlíva. Z toho důvodu je nutné opatření, které umožní rychlý růst podhoubí hlívy a omezí vývoj hub konkurenčních.

Substrát je nutné předem namočit tak, aby nebyl příliš suchý (podporuje růst zelených plísní) nebo přemokřený (substrát osidlují bakterie).

Tepelným ošetřením odstraníme ze substrátu zárodky jiných mikroorganismů a usnadníme tím i prorůstání podhoubí hlívy(Jablonský a Šašek, 2006).

3.2.7 SUBSTRÁTY

Základní surovinou pro přípravu substrátu je sláma obilnin nebo kukuřičná větvena. Pěstitel vybírá slámu, která je nejnadhěji dostupná. U nás je to sláma ozimé pšenice, ječmene, žita a řepky. Nejlepších výsledků dosahujeme při pěstování na pšeničné slámě. Nevhodné je použití směsí různých druhů slámy, protože slámy se rozdílně rozkládají a mají jinou strukturu. Bylo zjištěno, že kmeny hlív odlišně reagují na různé druhy materiálu, např. maďarský kmen H-7 dosahuje rozdíl od ostatních kmenů na řepkové slámě vyššího výnosu než na slámě pšeničné. Proto je důležité sladit použitý kmen s příslušným druhem suroviny.

Nejen použitý druh slámy, ale i způsob sklizně a skladování mají vliv na růst podhoubí a výnos. Sláma musí být sklizena za sucha a při skladování chráněna před srážkami. Vlhkost skladované slámy by měla být okolo 13 - 15%. Nevhodná je ta, která během skladování několikrát zmokla a znovu vyschla. Na vlhké slámě se namnoží konkurenční plísňe, které nejen sníží výživovou hodnotu slámy a konkurují pak rostoucímu podhoubí hlívy. Kvalitní sláma je suchá a má žlutou barvu, K výrobě substrátu by se měla používat sláma 3- 4 měsíce po sklizni. V praxi se totiž prokázalo, že na čerstvé slámě podhoubí hlívy prorůstá pomalu a výnos plodnic je nízký. Čerstvá sláma obsahuje látky, brzdící růst podhoubí hub, které se však časem odbourají (Jablonský a Šašek, 1997).

3.2.7.1 PŘÍPRAVA SUBSTRÁTU

Substrát pro hlívu je vlastně jen ovlhčená sláma, která je vhodným prostředím pro růst celého spektra hub, kterými bývá v přírodě přirozeně osídlena (*Fusarium sp.*, *Monilia sp.*, *Penicillium sp.*, *Trichoderma sp.*, *Trichothecium roseum*). Všechny zmíněné druhy rostou rychleji než hlíva. Proto je kromě vhodně skladované slámy hlavním předpokladem výroby kvalitního substrátu minimalizace obsahu zárodků plísni ve slámě. Jedinou osvědčenou metodou je likvidace plísni vysokou teplotou.

Metody využívající vysoké teploty jsou sterilizace, semisterilizace, pasterizace a řízená fermentace (Jablonský a Šašek, 1997).

3.2.7.1.1 STERILIZACE ČI PASTERIZACE?

Historie intenzivního pěstování hlívy a přípravy substrátu je krátká a substráty se z pšeničné slámy připravují od 60. let minulého století. Původně se namočená sláma propařovala v bedničkách v propařovacích komorách při 60 - 70°C. Následovala metoda propaření slámy v komorách suchou parou při 90-100°C. V současnosti jsou využívány 2 metody teplotního ošetření slámy a to fermentace, kdy sláma po navlhčení je zahřata na 50°C a posléze 2-3 dny fermentována při 45-50°C. Druhá metoda spočívá v zahřátí sláma na 70°C a po 20 - 30 hodinách se nechá postupně teplota klesnout. Od 70. let minulého století se experimentálně studuje možný vliv některých mikroorganismů jako *Bacillus subtilis*, *B. macerans*, *B. licheniformis* na zlepšení vlastností substrátu. Tyto mikroorganismy jsou využívány pouze empiricky jako součást přirozené mikroflóry v substrátech. Aktivitu výše uvedených mikroorganismů, které mají optimum růstu při 30°C využívají i pěstitelé hlívy a ostatních druhů dřevních hub v thajských pěstírnách, kde namočený substrát (piliny) nechávají ležet 24-48 hod.) a posléze substráty podrobí teplotnímu ošetření (Jablonský a Šašek, 2006).

Jako určitou alternativou teplotního ošetření jsou některé chemické látky jako jsou smáčedla Empigen(Pšeničnaja 2013), Majcharczyk, roztok mýdla (Holliday 2012) nebo kysličník vápenatý, které se využívají v primitivních podmínkách pěstování či při přípravě substrátu hlívy) ústřední pro mykoremediace půd kontaminovaných PCB nebo PAH (Jablonský a Šašek, 2006).

Pasterizace probíhá v tunelech stejně konstrukce jako pasterizace substrátu u žampionového substrátu pouze s tím rozdílem, že v tunelu jsou zavedeny přívody páry. Důležité je naplnění tunelu namočenou slámou stejnoměrně vysoko, aby vzduch neunikal volným prostorem. Spolehlivé pasterizace se docílí pouze v případě, že substrát v tunelu má na všech místech stejnou vlhkost, protože vzduch proniká více sušším než vlhčím substrátem (Jablonský a Šašek, 2006).

Rozdíl mezi sterilizací a pasterizací je v použité teplotě a celkové době působení tepla na použitý materiál. Záleží také na použitém materiálu. Při použití méně kvalitní slámy je potřeba krátkodobě zahřát slámu na 80°C.

3.2.7.1.1.1 STERILIZACE

Další metodou likvidace zárodků ostatních hub je vysoká teplota. Při sterilizaci se musí dosáhnout teploty 110- 121°C, při níž se zničí jak vegetativní, tak i klidová stádia konkurenčních hub, a to ve všech částech substrátu. Doba působení sterilizace závisí na druhu použitého materiálu a jeho množství, jsou to zpravidla 2 hodiny.

Výhodou této metody je, že nedochází ke ztrátám sušiny a proces trvá jen několik hodin. Nevýhodou je, že při sterilizaci se neobejdeme bez složitých a nákladných nádob (autoklávu) a sterilní substrát je současně vnímavý k infekci jinými houbami (plísněmi). Tato metoda je také značně energeticky náročná (Jablonský a Šašek, 2006).

3.2.7.1.1.2 PASTERIZACE

Pasterizace používáme často při tepelném očištění substrátu pro pěstování hub. Jsou to většinou teploty okolo 60- 70°C, které se používají na usmrcení vegetativních forem mikroorganismů (Ginterová, 1985).

V praxi se používají dvě metody pasterizace substrátu. První je, takzvané rychlé zahřátí substrátu na 58 - 60°C a teplotu necháme působit 18- 21 hodin. V tunelu by se měl použít takový výkon ventilátoru a vyvíječe páry, aby se dosáhlo zahřátí substrátu na požadovanou teplotu během 5 hodin. Po ukončení necháme teplotu v substrátu přirozeně klesnout a po dosažení 43°C substrát prudce zchladíme na 25°C. Celková doba procesu včetně zahřívání a zchlazování trvá 4 dny.

Druhou metodou je kombinace pasterizace s kondicionací. Teplota 60°C se udržuje 8-10 hodin a následně se sníží na 48- 52°C. Při této teplotě se podpoří rozvoj termotolerantních hub a aktinomycetů, které spotřebují všechny rozpuštěné cukry a tím vytvoří substrát, který je lépe chráněný před rozvojem konkurenčních plísní. V této době je nutné větrat a dodávat kyslík rozvíjejícím se mikroorganismům (Jablonský a Šašek, 2006).

3.2.7.2 OŠETŘENÍ SUROVIN PRO PŘÍPRAVU SUBSTRÁTŮ

Při produkci hub, podobně jako při biologických procesech je třeba uvědomit si přítomnost mikroorganismů a různých zárodků, nacházejících se všude v prostoru okolo nás. Je potřeba si to nejen uvědomit, ale i se naučit s jejich přítomností pracovat. Od toho ve velké míře závisí výsledek naší práce.

Často hovoříme o sterilních podmínkách, sterilním prostředí, sterilních nástrojích apod. Málokdy však skutečně jde o sterilní podmínky. Sterilita znamená stav, že se v daném prostředí, na daném předmětu, v daném prostoru apod. nenachází žádné živé zárodky. Dosáhnout o takovéto podmínky není lehké a v praxi se tyto podmínky téměř nevyžadují. Sterilních podmínek lze dosáhnout v praxi nejčastěji tlakovou sterilizací, tj. vyhříváním v páře v uzavřených tlakových nádobách, tzv. autoklávu. Jsou však materiály, které nesnesou požadovaný tlak a teplotu, což je okolo 200kPa a 134°C a musíme je sterilizovat za jiných podmínek (Ginterová, 1985).

Většina živých organismů je na zvýšenou teplotu citlivá a hyne už při zahřátí do 60°C. Všude zde zvažujeme teplotu prostředí nasyceného vodní parou, tedy mokrou sterilizaci. Téměř všechny organismy mají dvě formy rozdílně citlivé na teplotu. Tak jako semena zelených rostlin jsou odolnější na teplotu (a nepříznivé podmínky vůbec), tak i mikroorganismy mají kromě vegetativní formy ještě formu analogickou semenům, které nazýváme výtrusy (Ginterová, 1985).

3.2.7.2.1 HORKOU VODOU

Nejdůležitějším krokem pro úspěšné pěstování této houby je příprava z celulózového materiálu a jeho pasterizačního procesu. Nařezané materiály jsou podrobeny namáčení ve studené vodě s následným působením horké vody (80 ° C) po dobu 2-4 hodin, aby se odvrátily saprofytické houby, které normálně soutěží s houbovou plísní během růstu podhoubí.

3.2.7.2.2 NAMÁČENÍ V ALKALICKÉ VODĚ

Metoda alkalické dezinfekce je jednoduchá, neaplikuje se žádná tepelná úprava. Substrát se namočí po dobu 12 až 48 hodin do alkalické vody a poté se nechá okapat. Tato metoda se používá v chudých zemích světa. Nicméně jsou zde nějaké nedostatky, protože bakteriální kontaminace je možná (Gianotti et al., 2012).

3.2.7.2.3 CHEMICKÝM POSTŘÍKEM

V současné době, když vystupuje do popředí problém s omezeným zdrojem energie, je racionální chemické čištění substrátu. Dezinfekční prostředek se musí rozložit nebo odstranit, aby jeho rezidua nemohly ohrožovat zvířata, které se vyplozeným substrátem krmí. Předpokládá se, že se rezidua chemických prostředků nedostanou ani do plodnic, aby ohrožovaly člověka. Ačkoli kombinací insekticidů a fungicidů možno i za studena dosáhnout dostatečného očištění substrátu. Nejlepší výsledky a nejnižší riziko byly dosaženy kombinováním ochrany pomocí tepla a fungicidů. Vhodné byly k tomu účelu dva prostředky, a to je formaldehyd a Fundazol.

V procesu, kdy se substrát namáčí na lince do přehřáté vody, je vhodné aplikovat Fundazol. Voda se zahřeje na 80°C. Po smáčení se teplem substrát zahřeje na různě vysokou teplotu. Proto i v takovémto případě použijeme propařování. Namočený materiál se do něj dostane dopravníkem, povrch urovná a parou se teplota za recirkulaci vzduchu zvýší na 60°C. Potom se přívod páry i vzduchu vypne, směs se nechá po samovolném poklesu teploty do druhého dne, kdy se rychle vzduchem ochladí pod teplotu 30°C a očkuje se.

Použití formaldehydu je výhodné když se substrát máčí v bazénu. Vyžaduje nádrž, že které se čerpadlem substrát kropí a do které se dávkuje formaldehyd v konečné koncentraci 0,4%. Formaldehyd je možné výhodně použít i za chladnějšího počasí, kdy teplota prostředí je nižší než 15°C (Ginterová, 1985).

V současnosti legislativa nedovoluje použití výše uvedených látek k ošetření substrátů z obavy poškození lidského zdraví jak při manipulaci se substrátem, tak i po případném požití hub.

3.2.7.2.4 SUCHOU PAROU

Nařezaná sláma se naplní do dobře izolovaného boxu na dřevěný rošt do výšky 1,5 m. Místnost je vybavená ventilátorem vhánějícím vzduch pod rošt. Do vzduchu se vypouští suchá pára o teplotě 105 -120°C z vyvíječe páry. Ve slámě se dosáhne teploty okolo 100°C a tato teplota se udržuje minimálně 1 hodinu. Následně se místnost otevře, sláma se smíchá s vodou. Voda musí mít parametry pitné vody a při máčení je vhodné dosáhnout vlhkosti substrátu 70-72%. Při této metodě se musí dosáhnout rovnoměrného zahřátí slámy na požadovanou teplotu. Účinnější metodou propařování suchou parou místo boxu je tepelně izolovaný rotující buben. U této metody se buben naplní slámou a za stálého otáčení se do bubnu přivádí pára. To zajistí stejnoměrné zahřátí všech částic slámy (Jablonský a Šašek, 2006).

3.2.7.3 KULTIVACE PODHOUBÍ NA SUBSTRÁTU

Konkurence mezi mikroorganismy je běžným jevem. Rostlinné patogenní houby a bakterie mohou být také ovlivněny houbovými a bakteriálními antagonisty. Takové přirozeně se vyskytující interference mezi prospěšnými mikroorganismy a rostlinnými patogeny přispívá k přirozenému ukládání do vyrovnávací paměti o systémy obdělávání půdy, čímž se zabrání nebo omezí vývoj onemocnění. To je nejvíce patrné v půdách, kde antagonistický potenciál byl postaveny v přítomnosti patogenu populace (Köhl at al, 2010).

Změny ve struktuře komunity nemusí přímo vést ke změnám ve funkčnosti společenství, a tím k upraveným výnosům hub. Je důležité, aby se zvažilo, že složení bakteriální komunity je velmi důležité, ale není dostatečné pro zajištění dobrého výtěžku hub. Podmínky pro kultivaci jsou také velmi rozhodující pro výnos hub. Je dokázáno, že existuje určitá posloupnost v mikrobiálních společenstvech, která následovala přípravou substrátu, doprovázený stabilním fyzikálně-chemickým parametrem (Vajna, 2009).

3.2.7.3.1 BAKTERIE

Ve shrnutí lze říci, že prokaryotická (bakteriální) buňka je o řád menší velikosti a o řád jednodušší organizace než eukaryotická. Má mnoho jen pro ni specifických fyziologických

vlastností. Bakterie jsou haploidní a množí se jen asexuálně, příčným rozdělením buňky následujícím po zdvojení jaderného materiálu. Kromě toho je pro bakterie charakteristická „genetická promiskuita“, tj. poměrně vysoká frekvence horizontální výměny částí genetického materiálu (Kaprálek, 1986).

Nejvíce bakterií je v půdě a ve vodě, velmi mnoho jich je v tělech a na tělech jiných organismů, rostlin, živočichů a člověka. Mnoho jich je ve vzduchu, jehož prostřednictvím se šíří. Jejich koncentrace je ovšem různá v různých prostředích a i v tomtéž prostředí kolísá v širokém rozmezí v závislosti na řadě okolností. Stručně řečeno bakterie jsou všudypřítomné. I v tak extrémních ekologických podmínkách, kde jiné organismy hynou, mohou speciální druhy bakterií růst a množit se. Hlavním rysem funkce bakterií v přírodě je mineralizace látek organických na anorganické za uvolnění tepla v půdě, tak i ve vodě a umožní tak koloběh látek v biosféře (Kaprálek, 1986).

V přírodních podmínkách se bakterie nevyskytují v čistých kulturách, nýbrž v kulturách smíšených a v mnoha případech vytvářejí celky vyššího řádu, biocenózy. V případě působení jednoho druhu na jiný druh může nastat působení kladné, záporné či nepůsobení. Může nastat neutralita, symbióza, konkurence, parazitismus (predace), komenzalismus (metabióza), antibióza (Kaprálek, 1986).

3.2.7.3.1.1 BACILLUS SUBTILIS

V přírodě nejrozšířenější *Bacillus subtilis* je téměř všudypřítomný. Tvoří poměrně malé peritrichální buňky (0,7 x 2 až 3 μm) a produkuje několik polypeptidových antibiotik. Má totožnou strukturu jako *Bacillus cereus*. Důležitým znakem je schopnost tvořit jednu endosporu, s průměrem obvykle menším, než je šířka bakteriální buňky. Sporulace probíhá pouze za přítomnosti kyslíku, protože sporulací získává buňka energii především oxidací zásobních lipidů z cytoplazmy. Kultivačně je tato bakterie nenáročná, snadno roste na běžných živných půdách (Hlochová, 2009).

Bacillus subtilis je gram-pozitivní spory vytvářející bakterie, která byla rozsáhle studována jako model pro rozvor jednobuněčných mikroorganismů. Nepovažuje se za patogenní nebo toxickou bakterii, a není nemoc způsobující organismus. *Bacillus subtilis* je endospory tvořící bakterie, která umožňuje, aby vydržela extrémní teploty stejně jako suché prostředí. Bakterie ve tvaru tyčinky běžně se vyskytující v půdě (Kirk, 2009).

Dříve byl považován za striktně aerobní, což znamená, že vyžaduje kyslík pro růst a nemůže podstoupit fermentaci. Nicméně, novější studie ukazují, že skutečně může růst v anaerobních podmínkách. Bakterie se mohou alkoholovou fermentací přeměnit na cukry, peptidy a jiný substrát, za anaerobních podmínek. Fermentace může přinést butandiol jako produkt. Dusík může být získán z dusičnanů amonifikací (také nazývané asimilační denitrifikace) (Larsen, 2013).

Vzhledem k tomu, že bakterie je odolná vůči extrémním teplotám, tak může vydržet vysoké teplotní úpravy. Je snadno všudypřítomná, v ovzduší, v půdě a rostlinném kompostu. Předpokládá se, že stráví většinu toho času neaktivně ve formě spor. Je - li bakterie aktivní, produkuje řadu enzymů. Jeden z enzymů se podílí na procesu degradace lignocelulózního materiálu.

Bacillus subtilis lze také nalézt v lidském těle, zejména na kůži nebo ve střevním traktu. Nicméně to je velmi vzácné, že by tato bakterie kolonizovala lidský organismus.

Spolu s enzymy, *Bacillus subtilis* také produkuje toxin nazvaný subtilisin. Subtilisin může způsobit alergické reakce v případě, že je opakovan v expozici ve vysokých koncentracích. To představuje riziko kvašení rostliny, pouze když se používá velké množství subtilisinu. Subtilin je také schopen uvnitř vodivých svazků cévních ve dřevě účinně omezovat široké spektrum druhů dřevokazných hub. Existuje několik použití pro *Bacillus subtilis* a enzymů, které produkuje. Může být použit k vytvoření proteázy a amylázy. Je používán také jako půdní očkovací látka, a byl jednou použit v biologických bojových testech během studené války.

Bacillus subtilis produkuje některé fungicidní látky, které jsou zkoumány jako řídící původci houbových patogenů. V současné době je používán jako fungicid pro okrasné rostliny a semena, stejně jako různých zemědělských semen (Kirk, 2009).

Podporuje růst rostlin. Jako člen rodu *Bacillus*, tato bakterie často hraje roli při doplňování živin do půdy dodáváním uhlíkového cyklu a cyklu dusíku. Bakterie tvoří hrubé biofilmy, které jsou které husté organické komunity na rozhraní vzduchu a vody. Biofilmy *Bacillus subtilis* jsou prospěšné. Umožňují kontrolu infekcí rostlinných patogenů. Výhodou rostlin je, že *Bacillus subtilis* poskytuje preemptivní kolonizaci. Preemptivní kolonizace zabraňuje jiným patogenům v napadení substrátu, protože *B. subtilis* má tu výhodu, že je v místě první. *Bacillus subtilis* také snižuje měkkou korozi ocele (Larsen, 2013).

Dalším využitím *Bacillus subtilis* je biologická ochrana rostlin, která způsobuje snižování zátěže životního prostředí na základě použití biologických antagonistických preparátů, které potlačují fytopatogenní houby jako je např. Ibefungin (účinná bakterie *Bacillus subtilis*) (Hýsek a kol., 2008).

3.2.7.3.1.2 BACILLUS MACERANS

V dnešní době označována jako *Paenibacillus macerans*. *Paenibacillaceae* je nová čeleď, která byla vyčleněna na základě poznatků molekulární genetiky (sekvenace) z původního rodu *Bacillus* v roce 2001.

ROD PAENIBACILLUS

Bakterie z rodu *Paenibacillus* produkují různé extracelulární enzymy, jako jsou polysacharidy, degradující enzymy a proteázy, které mohou katalyzovat celou řadu syntetických reakcí v oblastech od kosmetiky výroby biopaliv.

Různé *Paenibacillus* spp. mohou také produkovat antimikrobiální látky, které mají vliv na široké spektrum mikroorganismů, jako jsou houby, půdních bakterie, rostlinné patogenní bakterie a dokonce i důležité anaerobní patogeny jako je *Clostridium botulinum*. Přesněji řečeno, několik druhů *Paenibacillus* může efektivně sloužit jako podpora růstu rostlin rhizobacteria. Tyto bakterie kolonizují kořeny rostlin a zároveň mohou působit jako biohnojivo a jako antagonisté (biopesticidy) uznaných kořenových patogenů, jako jsou bakterie, houby a hlístice.

PAENIBACILLUS MACERANS

Je gram variabilní tyčinka s peritrichními bičíky bez přítomnosti tobolečky. Velikost 2,5 – 5 µm x 0,5 – 0,7 µm. Spory jsou subterminální, terminální, elipsoidní. Optimální růst při 30 °C. Spory v půdě přetrvávají mnoho let. *P.macerans* produkuje velké množství histaminu, což může způsobovat alergické reakce člověka.

Je to bakterie nacházející se v půdě a v rostlinách schopných fixace dusíku a fermentace. Je schopna fermentovat hexosu, deoxyhexosu, pentózu, celulózu, hemicelulózu a glycerol za anaerobních podmínek. Tato bakterie je fakultativní anaerobní, je schopná

fixace dusíku, takže v nepřítomnosti kyslíku, je schopna převést plynný dusík na amoniak, který rostliny používají snadněji (wikipedie, 2014).

3.2.7.3.2 TRICHODERMA SP. - ZELENATKA

Napadení substrátů některých pěstovaných hub zelenou plísní, způsobené druhem zelenatky, je vážný problém pro pěstitele hub po celém světě. Kmeny zelenatky byly izolovány ze substrátů zasažených *Agaricus bisporus* (žampion dvouvýtrusý), kompostu a *Pleurotus ostreatus* (hlíva ústříčná). Původci zeleného onemocnění plísní u hlívy ústříčné byly *T. pleurotum* a *T. pleurotica*. Podmínky, za kterých jsou tyto houby pěstované, tak upřednostňují rychlý růst plísní. Zelené plísně konkurují o živiny účinněji než houby a to může vyvolat sekundární toxické metabolity, extracelulární enzymy, stejně jako různé těkavé organické sloučeniny, které mohou výrazně snížit, či dokonce zcela zablokovat výnos (Gianotti et al. 2012).

3.2.7.3.2.1 TRICHODERMA PLEUROTUM

Trichoderma sp. je asexuální, půdu osídlující vláknitá houba s teleomorfy, která patří do rodu *Hypocrea* (*Ascomycota*, *Pyrenomycetes*, *Hypocreales*, *Hypocreaceae*). Kromě průmyslového významu rodu, některé druhy zelenatky je dobře známo, že mají schopnost antagonizovat řadu rostlinných patogenních hub. Navržené mechanismy antagonismů zahrnují působení mycoparazitismů na buněčné stěny degradujících enzymů, antibióza ve výrobě antibiotik, soupeření (konkurence) o prostor a živiny přes rhizosféru kompetence, zjednodušení klíčení semen a růst rostlin pomocí uvolnění důležitých minerálů a stopových prvků z půdy a indukce obranné reakce u rostlin. Během posledních desetiletí, zástupci rodu byly hlášeny jako škodlivě se rozvíjející oportunní patogeny člověka a jako původci zelených plísní, která vede k podstatným ztrátám v produkci pěstovaných hub, včetně žampionu (*Agaricus bisporus*) a hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*) (Hatvani, 2008).

Zelenatka byla studována s ohledem na různé vlastnosti a použití, jsou známy jako úspěšné kolonizátory jejich stanovišť, účinně bojuje se svými konkurenty. Po osídlení substrátu zahájí silný degradační mechanismus k rozkladu heterogenního substrátu, který

má po ruce. Proto distribuce a fylogeneze, obranné mechanismy, prospěšné, stejně jako zdraví škodlivé interakce s hostiteli, produkce enzymů a vylučování, pohlavní vývoj a reakce v podmínkách prostředí, jako jsou živiny a světlo byly studovány velmi podrobně s mnoha druhy tohoto rodu, což činí ze zelenatky jednu z nejlépe studovaných hub z genomu tří druhů v současné době (Schuster, 2010).

Je známá jako zelená forma infekce v substrátech pěstovaných hub. Parametry pro pěstování hub, jako jsou zdroje uhlíku a dusíku, vysoká relativní vlhkost, vyšší teploty, případně kolísání těchto faktorů a nepřítomnost světla během plození jsou ideální životní podmínky prostředí pro vývoj této houby. Za těchto výhodných podmínek vykazuje tato konkurenční houba rychlý růst. Proto může soutěžit o prostor a živiny mnohem efektivněji než pěstované houby, kromě toho, že zelenatka je schopna produkovat toxické sekundární sloučeniny, extracelulární enzymy, stejně jako těkavé organické sloučeniny, který může mít za následek výrazné snížení produkce nebo dokonce může dojít k likvidaci celé kultury hub. Patogenní zelené plísně mohou kolonizovat nebo růst na pětině povrchu hub, které mohou být silně skvrnitě a často zkreslené ale ve vážném propuknutí nejsou produkovány žádné plodnice. Zelenatka produkuje bělavé mycelium, které je zpočátku k nerozeznání od plodících hub, a proto je obtížné rozpoznat infekci již v této fázi (Hatvani, 2008).

Zelenatka je všudypřítomný kolonizátor z celulózových materiálů, mohou tedy být často nalezeny všude tam, kde rozpadající se rostlinný materiál je k dispozici stejně jako v rhizosféře rostlin, kde mohou vyvolat systémovou rezistenci proti patogenům. Jsou schopni se vypořádat s takovými různým prostředím, jako je bohaté a rozmanité prostředí tropického deštného pralesa, stejně jako se sterilním prostředím biotechnologických fermentorů nebo třepacích baněk (Schuster, 2010).

Bylo zjištěno, že druhy zelenatky jsou přítomny v počáteční fázi přípravy substrátu, které zmizí během pasterizace, ale může se znovu objevit v substrátu po plození, v průběhu plození a sklízecích cyklech. Yu (2002) studoval účinnost pasterizace na rozvoj zelené plísně infekce způsobené zelenatkou při různých teplotách, trvání a hodnoty vlhkosti substrátu. Výsledky ukázaly, že růst mycelia byl zcela inhibován pasterizací při 60°C po dobu 10 hodin nebo déle při 50 - 70% (obsah vlhkosti substrátu). Nicméně, je-li doba pasterizace určena, rychlost vedení tepla v substrátu (v závislosti na druhu materiálu, objemu substrátu a obsahu vlhkosti), je třeba vzít v úvahu, protože vlhkost substrátu může být příliš nízká, což by mohlo vést k tomu, že by v substrátu přežily patogenní houby. Důležité je vzít v potaz i vlhkost

substrátu. Optimální vlhkost pro hlívu je 60 - 70%, růst byl inhibován při 80%. Na rozdíl od toho, došlo k růstu mycelia zelených plísní úměrně k obsahu vlhkosti substrátu, který dosahuje maxima při 80% (Hatvani, 2008).

Kmeny zelenatky bývají izolovány ze vzorků kompostu a zeminy používaných pro pěstování. Pro hlívu (*Pleurotus ostreatus*) je specifická *Trichoderma pleurotum* ale vyskytují se zde i jiné druhy zelenatky jako je například *Trichoderma pleurotica*.

3.2.7.4 VYUŽITÍ VYPLOZENÉHO SUBSTRÁTU

Vyplozený substrát hlívy obsahuje četné enzymy a další biologicky aktivní látky. Používá se jako krmivo pro prasata. Při 10% podílu v krmné dávce přispěl substrát ke zvýšení přírůstku hmotnosti zvířat a k jejich uklidnění (Jablonský a Šašek, 2006).

Dále je možné využít vyplozený substrát jako hnojivo a v určitém množství se dá použít jako přídavek (pilinový substrát) do nového substrátu či do kompostu.

3.2.8 SADBA

Pro intenzivní způsob pěstování jedlých hub se používá zrnitá sadba narostlá na uvařených a vysterilizovaných zrnech pšenice, žita nebo prosa. Použitá sadba musí být čerstvá. Hotová sadba se může skladovat maximálně po dobu 2 týdnů při teplotě 2 - 4°C. Důležité je používat čerstvou sadbu, která rychle kolonizuje substrát oproti staré sadbě, která kolonizuje substrát pomaleji (Jablonský a Šašek, 2006).

Pro extenzivní způsob pěstování na dřevě lze použít jako sadbu drcená kukuřičná vřetena, piliny nebo dřevěné kolíčky.

INTENZIVNÍ PĚSTOVÁNÍ

Pasterizovaný substrát, zchlazený na 25°C se promíchá s 2 - 3 % sadby buď přímo v přepravkách, nebo se smíchá se sadbou při vyprazdňování tunelu během plnění pytlů, lisovaných bloků nebo palet. Podhoubí prorůstá 14 dní. Během prorůstání je substrát kryt folií, který brání vysychání, ale zajišťuje též zvýšenou koncentraci CO₂ a současně chrání povrch substrátu před infekcí zelenými plísněmi.

Inkubační místnost by neměla být pěstitelskými jednotkami přeplněna, aby nedošlo zejména v letním období, k přehřátí substrátu. Kultuře neuškodí prorůstání substrátu delší dobu. Naopak předčasné přemístění neprorostlého substrátu k fruktifikaci může způsobit výskyt zelených plísní a tak i negativně ovlivnit výši výnosu (Jablonský a Šašek, 1997).

Dále je možné využít sadbu kolíčkovou či tekuté medium.

4 METODIKA

4.1 RŮSTOVÉ ZKOUŠKY MYCELIA PLEUROTUS OSTREATUS PŘI OŠETŘENÍ SUBSTRÁTU VYBRANÝMI BAKTERIEMI

4.1.1 HARMONOGRAM POKUSŮ

Vliv koncentrace m - o a doby fermentace na následný růst mycelia houby *Pleurotus ostreatus*

pokus č. 1

Vliv inokulace substrátů pomocí mikroorganismů *Bacillus subtilis* a *Bacillus macerans*

pokus č. 2

pokus č. 3

Vliv inokulace substrátů pomocí mikroorganismů *Bacillus subtilis* a *Bacillus macerans* s přidáním *Trichoderma pleurotum*

pokus č. 4

pokus č. 5

pokus č. 6

Zjištění ovlivnění fermentace separátu z bioplynové stanice jako substrát pro hlívu ústříčnou

pokus č. 7

Zjištění schopnosti houby *Trichoderma* infikovat fermentovaný substrát pro hlívu ústříčnou.

pokus č. 8

4.1.2 MATERIÁL A METODY

Materiál

K zakládání pokusů byly použity pelety z pšeničné slámy, sadba hlívy ústříčné zaočkovaná na zrnech pšenice, Omnia sklenice, alobalové folie a dezinfekční přípravky (Savo, Incidur a 4 % roztok Formalinu) a foliové rukávce. K přípravě substrátu byly použity plastové míchací nádoby, jednorázové gumové rukavice, pomůcka na promíchání substrátu, konvice na přípravu vroucí vody a odměrný válec. Pro očkování substrátu sadbou hlívy a jistotu sterilního prostředí se použil Flowbox, ve kterém se prováděla i dezinfekce Omnio sklenic. Pomůcky k očkování sadby hlívy jako je například lžice, se dezinfikovaly technickým lihem a opalovaly se nad hořícím kahanem.

Příprava substrátu

Samotná příprava substrátu se u jednotlivých pokusů lišila. Nejprve se použily sterilizované pšeničné pelety ale po zjištění, že pelety hůře přijímají vodu, se u dalších pokusů použily pelety nesterilizované. U jednotlivých pokusů se lišila i doba fermentace a použitá teplota při fermentaci. Jednotlivé pokusy se také lišily přidávkou vody, aby se dosáhlo obsahu vody v substrátu 68-70% a pelety se rozpadly.

Hlavní důraz byl kladen na čistotu míchacích nádob, a proto bylo nutné nádoby důkladně vymýt technickým lihem a vystříkat Incidur sprejem.

Dezinfekce sklenic

Ve druhém pokusu došlo ke kontaminaci substrátu. Bylo podezření, že kontaminace pocházela z lahví, které nebyly dostatečně vydezinfikovány. Proto byl k dezinfekci poskytnut optimální dezinfekční přípravek 4% roztok formalinu. Nyní dezinfekce sklenic probíhá ve dvou fázích. První je, že se sklenice vypláchnou v připraveném roztoku chlornanu sodného, nechají se okapat a druhá, že po oschnutí se vnitřní strana sklenic vystříká prostředkem Incidur sprejem. Otvor sklenic se přikryje alobalem.

Umístění naočkováných sklenic

Sklenice byly umístěny v místnosti při teplotě 25°C.

Kultury bakterií, Trichoderma a hlívy

Kultury bakterií, a hub k těmto pokusu byly získány z VÚRV v Ruzyni, odkud byly dodány včetně informace o počtu buněk v suspensi a inokulum *Trichoderma pleurotum* s informací v jaké dávce se má přidat do substrátu. Sadba *Pleurotus ostreatus* (kmen 35) byla rozmnožena v laboratoři katedry zahradnictví FAPPZ, ČZU Praha Suchdol)

Způsob hodnocení u pokusů

Po 7 dnech byl zaznamenán přírůstek mycelia na každé sklenici za současné registrace kontaminovaných míst. Jakmile mycelium houby dorostlo v první sklenici až na dno, byl pokus ukončen, byly změřeny přírůstky mycelia a případně byla zhodnocena plocha kontaminovaného substrátu v jednotlivých sklenicích.

Metodika sterilizovaných pšeničných pelet

Použité pouze u pokusu č. 1.

Základní metodika nesterilizovaných pšeničných pelet

K těmto pokusům byly použity jako základní surovina nesterilizované slaměné pelety, do kterých se v daném poměru přidala voda. Podle zvolených variant se přidala do vody suspence bakterií a vše se smíchalo s peletami.

Pelety se navážily v množství 1800 g na laboratorních vahách a daly do předem označených nádob dle variant. Pro dodržení správně vlhkosti pelet se přidalo 1350 ml teplé vody na 600g pelet. Takže na použité množství 1800 g se přidá 4050 ml vody.

Podle použité varianty se upravilo množství vody a přidala se suspence bakterií. Např. při použití *Bacillus subtilis* se navážilo 1800 g pelet a přidalo 4020 ml vroucí vody a 30 ml suspence.

Takto neošetřené pšeničné pelety byly použity u ostatních pokusů s výjimkou pokusu, u kterého se fermentoval separát z bioplynky.

4.1.2.1 POKUS Č. 1

Vliv koncentrace m-o a doby fermentace na následný růst mycelia houby *Pleurotus ostreatus* při použití sterilizovaných a nesterilizovaných pelet a jejich ošetření vodou v určené teplotě.

V současnosti je k dispozici preparát EMa **Super Comp** firmy EM-Eko, kterým se bude ošetřovat pšeničné pelety.

1. V preparátu se uvádí obsah směsi 17 kultur m-o (*B. subtilis*, *Lactobacillus*, a. j.)
2. V praxi je doporučeno dávkování 2-10 ml na 1 kg substrátu.
3. Pro zlepšení intenzity mikrobiologického procesu se osvědčil příravek fermentovaných otrub. (až 10%).
4. Směsná kultura roste nejlépe při teplotě 30°C.
5. Mikroorganismy rostou nejlépe při pH 7,0.

Přesný postup

K tomuto byly použity slaměné pelety vysterilizované horkým vzduchem při teplotě 130°C a jako kontrola byly použity nesterilizované pelety rozpuštěné v teplé vodě, nesterilizované pelety spařené horkou vodou a sterilizované pelety rozpuštěné v teplé vodě.

Navážené pelety se smíchají s teplou vodou, a do této směsi byl přidán příravek Ema Super Comp. Následně bylo přidáno takové množství vody, aby se dosáhlo obsahu vody v substrátu 68-70% vody a pelety se rozpadly.

Vysterilizované suché pelety se navážily pomocí laboratorních vah na hmotnost 600g, ty se rozdělily do nádob dle variant. Tyto nádoby se použily na míchání pelet a jejich následné nasátí vodou. Pro správnou vlhkost se použilo u všech variant stejné množství vody, to jest 1350 ml. U vybraných variant se do vody přidala směs mikroorganismů v doporučeném množství uvedeném na litr či kilogram.

Po inokulaci mikroorganismů a dobrém promíchání substrátu se vytvořený substrát naplnil do předem vytvořených foliových rukávců (vaků), které byly mírně perforované, aby zde mohl probíhat aerobní proces. Vaky se umístily do termostatu, kde se nechaly fermentovat při teplotě 30°C. Takto zvolená teplota je ideální pro rozvoj mikroorganismů obsažených v substrátech.

Varianty

1. Neošetřené pelety spařené vroucí vodou (7 sklenic)
2. Neošetřené pelety namočené v teplé vodě (1 vak)
3. Sterilizované pelety namočené v teplé vodě (1 vak)
4. Sterilizované pelety s dávkou 5ml suspence Ema Super Comp. na 1kg vlhkých pelet (3 vaky)
5. Sterilizované pelety s dávkou 10ml suspence na 1kg vlhkých pelet (3 vaky)

Celkem bylo vytvořeno 8 vaků se substrátem a 7 Omnia sklenic.

Další postup:

Po založení pokusu a následné fermentaci se třetí, sedmý a desátý den vyndalo z termostatu od každé varianty po jednom vaku. Z vaku se přendal fermentovaný substrát do 3 sklenic a naočkoval se sadbou na povrch. Očkování probíhalo ve flowboxu, aby se zajistilo sterilní prostředí. Sklenice byly umístěny do místnosti s teplotou 23°C.

Při prvním naočkování sadby po 3 dnech fermentace byly vytvořeny tyto varianty:

- 3 sklenice s ošetřenými peletami se suspenzí 5 ml Ema Super Comp.
- 3 sklenice s ošetřenými peletami se suspenzí 10 ml Ema Super Comp.
- 2 sklenice s neošetřenými peletami spařené horkou vodou
- 1 sklenice s neošetřenými peletami s teplou vodou
- 1 sklenice s ošetřenými peletami s teplou vodou

Při druhém naočkování sadby po 7 dnech fermentace byly vytvořeny tyto varianty:

- 3 sklenice s ošetřenými peletami se suspenzí 5 ml Ema Super Comp.
- 3 sklenice s ošetřenými peletami se suspenzí 10 ml Ema Super Comp.
- 2 sklenice s neošetřenými peletami spařené horkou vodou
- 1 sklenice s neošetřenými peletami s teplou vodou
- 1 sklenice s ošetřenými peletami s teplou vodou

Při třetím naočkování sadby po 10 dnech fermentace byly vytvořeny tyto varianty:

- 3 sklenice s ošetřenými peletami se suspenzí 5 ml Ema Super Comp.
- 3 sklenice s ošetřenými peletami se suspenzí 10 ml Ema Super Comp.

- 2 sklenice s neošetřenými peletami spařené horkou vodou
- 1 sklenice s neošetřenými peletami s teplou vodou
- 1 sklenice s ošetřenými peletami s teplou vodou

4.1.2.2 POKUS Č. 2

Vliv inokulace substrátů pomocí mikroorganismů *Bacillus subtilis* a *Bacillus macerans*.

Cílem tohoto pokusu je zjištění, zda aplikované bakterie více či méně ovlivňují substrát použitý pro *Pleurotus ostreatus*. Z prvního pokusu nebylo jasně patrné, jak použitá směs mikroorganismů ovlivnila substrát, tak se rozhodlo o použití přesně cílených bakterií prospěšných v substrátu.

Přesný postup

U tohoto pokusu se navázilo 1800 g pelet a přidalo 3,5 litrů vroucí vody, ve zbylých 520 ml se rozmíchalo 30 ml suspence použité bakterie. Vše jsme nalili do pelet a důkladně promíchali. Vzniklý substrát jsme naplnili do předem připravených tlačenkových rukávců a umístili do termostatu a nechali fermentovat při teplotě 30°C.

Varianty

1. Kontrolní varianta: pelety namočené ve vodě v poměru 1 díl pelet + 2 díly vody
2. Varianta s *Bacillus subtilis*: tato varianta se připraví tak, že se přidá 10 ml suspence mikroorganismů na 990 ml teplé vody a 1 kg pelet se promíchá s 2 l takto upravené vody
3. Varianta s *Bacillus macerans*: tato varianta se připraví tak, že se přidá 10 ml suspence mikroorganismů na 990 ml teplé vody a 1 kg pelet se promíchá s 2 l takto upravené vody

Bacillus subtilis - $9,32 \times 10^7$ spor/ml, ***Bacillus macerans*** - $7,89 \times 10^8$ spor/ml

V tomto pokusu byly založeny tyto varianty:

1. Kontrolní varianta – 4 rukávce
2. Kontrolní varianta – 6 sklenic bez fermentace
3. Varianta se suspensí *Bacillus subtilis* – 6 rukávců

4. Varianta se suspenzí *Bacillus macerans* – 6 rukávců

4.1.2.3 POKUS Č. 3

Vliv inokulace substrátu pomocí bakterií *Bacillus macerans* a *Bacillus subtilis* s konečným zahřáním fermentovaného substrátu na 50°C.

Cílem tohoto pokusu je zjištění, zda aplikované bakterie po fermentaci a následném zahřátí substrátu na 50°C ovlivňují substrát použitý pro *Pleurotus ostreatus*.

Přesný postup

U tohoto pokusu se navážilo 1200 g pelet a přidalo 2,2 litrů teplé vody, ve zbylých 473 ml se rozmíchalo 27 ml suspence použité bakterie a vlilo do pelet a důkladně se promíchalo. Vzniklý substrát jsme naplnili do předem připravených tlačenkových rukávců a umístili do termostatu a nechali zde fermentovat při teplotě 30°C po dobu tří dnů a následně na dva dny zvýšili teplotu na 50°C.

Varianty

1. Kontrolní varianta: pelety namočené ve vodě v poměru 1 díl pelet + 2 díly vody
2. Kontrolní varianta bez fermentace: pelety namočené ve vodě v poměru 1 díl pelet + 2 díly vody
3. Varianta s *Bacillus subtilis*: tato varianta se připraví tak, že se přidá 10 ml suspence mikroorganismů na 990 ml teplé vody a 1 kg pelet se promíchá s 2 l takto upravené vody
4. Varianta s *Bacillus macerans*: tato varianta se připraví tak, že se přidá 10 ml suspence mikroorganismů na 990 ml teplé vody a 1 kg pelet se promíchá s 2 l takto upravené vody.

Bacillus subtilis - 9,32 x 10⁷ buň/ml resp. ***Bacillus macerans*** – 7,89 x 10⁸ buň/ml

V tomto pokusu byly založeny tyto varianty:

1. Kontrolní varianta - 2 rukávce
2. Kontrolní varianta - 4 sklenice bez fermentace

3. Varianta se suspenzí *Bacillus subtilis* - 4 rukávce
4. Varianta se suspenzí *Bacillus macerans* - 4 rukávce

4.1.2.4 POKUS Č. 4

Vliv inokulace substrátu kontaminovaného *T. pleurotum* pomocí mikroorganismů *Bacillus subtilis* a *Bacillus macerans* s konečným zahřátím fermentovaného substrátu (50°C).

Cílem tohoto pokusu je zjištění, zda aplikované bakterie po fermentaci a následném zahřátí substrátu na 50°C jsou schopny potlačit rozvoj houby *T. pleurotum* a přispět k lepší kolonizaci substrátu hlívou.

Jako základní surovina byly nesterilizované slaměné pelety, do kterých přidáme v daném poměru vodu. Podle použitých variant byla přidána směs pelet s vodou suspenzí bakterií, jednou z variant bude pouze namočený a zaočkovaný substrát a další varianty budou zaočkovány sporami kompetiční plísně *T. pleurotum*.

Přesný postup

U varianty se zelenatkou se navážilo 1200 g pelet a přidalo 2,2 litru teplé vody. Ve zbylých 446 ml rozmíchalo 27 ml použité suspenze bakterie a 27 ml zelenatky. Vzniklý substrát se naplnil do předem připravených tlačenkových rukávců a umístily se do termostatu a nechali se fermentovat při teplotě 30°C po dobu tří dnů a následně se teplota zvýšila na 50°C.

Varianty

1. Kontrolní varianta: pelety namočené ve vodě v poměru 1 díl pelet + 2 díly vody
2. Kontrolní varianta: pelety namočené ve vodě v poměru 1 díl pelet + 2 díly vody.
Do substrátu se přidá navíc inokulum *T. pleurotum*
3. Kontrolní varianta bez fermentace: pelety namočené ve vodě v poměru 1 díl pelet + 2 díly vody
4. Kontrolní varianta bez fermentace: pelety namočené ve vodě v poměru 1 díl pelet + 2 díly vody. Do substrátu se přidá navíc inokulum *T. pleurotum*

5. Varianta s *Bacillus subtilis*: tato varianta se připraví tak, že se přidá 10 ml suspence mikroorganismů na 990 ml teplé vody a 1 kg pelet se promíchá s 2 l takto upravené vody
6. Varianta s *Bacillus subtilis*: tato varianta se připraví tak, že se přidá 10 ml suspence mikroorganismů na 990 ml teplé vody a 1 kg pelet se promíchá s 2 l takto upravené vody. Do substrátu se přidá navíc inokulum *T. pleurotum*
7. Varianta s *Bacillus macerans*: tato varianta se připraví tak, že se přidá 10 ml suspence mikroorganismů na 990 ml teplé vody a 1 kg pelet se promíchá s 2 l takto upravené vody.
8. Varianta s *Bacillus macerans*: tato varianta se připraví tak, že se přidá 10 ml suspence mikroorganismů na 990 ml teplé vody a 1 kg pelet se promíchá s 2 l takto upravené vody. Do substrátu se přidá navíc inokulum *T. pleurotum*

Bacillus subtilis - $2,49 \times 10^6$ buň/ml, ***Bacillus macerans*** - $2,52 \times 10^6$ buň/ml,
Trichoderma pleurotum - $3,01 \times 10^6$ spor/ml.

V tomto pokusu byly založeny tyto varianty:

1. Kontrolní varianta - 2 rukávce
2. Kontrolní varianta s *T.pleurotum* - 2 rukávce
3. Kontrolní varianta - 8 sklenic bez fermentace
4. Kontrolní varianta s *T.pleurotum* - 8 sklenic bez fermentace
5. Varianta se suspensí *Bacillus subtilis* - 2 rukávce
6. Varianta se suspensí *Bacillus subtilis* s *T.pleurotum* - 2 rukávce
7. Varianta se suspensí *Bacillus macerans* - 2 rukávce
8. Varianta se suspensí *Bacillus macerans* s *T.pleurotum* - 2 rukávce

4.1.2.5 POKUS Č. 5

Vliv inokulace substrátu kontaminovaného *T. pleurotum* pomocí bakterií *Bacillus subtilis* a *Bacillus macerans* s konečným zahřátím fermentovaného substrátu na 50°C.

Cílem tohoto pokusu je zjištění, zda aplikované bakterie po fermentaci a následném zahřátí substrátu na 50°C jsou schopny potlačit rozvoj houby *T. pleurotum* a přispět k lepší kolonizaci substrátu hlívou. Tento pokus byl založen jako kontrola pokusu č. 4.

Varianty

1. Kontrolní varianta: pelety namočené ve vodě v poměru 1 díl pelet + 2 díly vody
2. Kontrolní varianta: pelety namočené ve vodě v poměru 1 díl pelet + 2 díly vody. Do substrátu se přidá navíc inokulum *T. pleurotum*
3. Kontrolní varianta bez fermentace: pelety namočené ve vodě v poměru 1 díl pelet + 2 díly vody
4. Kontrolní varianta bez fermentace: pelety namočené ve vodě v poměru 1 díl pelet + 2 díly vody. Do substrátu se přidá navíc inokulum *T. pleurotum*
5. Varianta s *Bacillus subtilis*: tato varianta se připraví tak, že se přidá 10 ml suspence mikroorganismů na 990 ml teplé vody a 1 kg pelet se promíchá s 2 l takto upravené vody
6. Varianta s *Bacillus subtilis*: tato varianta se připraví tak, že se přidá 10 ml suspence mikroorganismů na 990 ml teplé vody a 1 kg pelet se promíchá s 2 l takto upravené vody. Do substrátu se přidá navíc inokulum *T. pleurotum*
7. Varianta s *Bacillus macerans*: tato varianta se připraví tak, že se přidá 10 ml suspence mikroorganismů na 990 ml teplé vody a 1 kg pelet se promíchá s 2 l takto upravené vody.
8. Varianta s *Bacillus macerans*: tato varianta se připraví tak, že se přidá 10 ml suspence mikroorganismů na 990 ml teplé vody a 1 kg pelet se promíchá s 2 l takto upravené vody. Do substrátu se přidá navíc inokulum *T. pleurotum*

Bacillus subtilis - $2,49 \times 10^6$ buň/ml, ***Bacillus macerans*** - $2,52 \times 10^6$ buň/ml,
Trichoderma pleurotum - $3,01 \times 10^6$ spor/ml

V tomto pokusu byly založeny tyto varianty:

1. Kontrolní varianta - 2 rukávce
2. Kontrolní varianta s *T.pleurotum* - 2 rukávce
3. Kontrolní varianta - 8 sklenic bez fermentace
4. Kontrolní varianta s *T.pleurotum* - 8 sklenic bez fermentace
5. Varianta se suspenzí *Bacillus subtilis* - 2 rukávce
6. Varianta se suspenzí *Bacillus subtilis* s *T.pleurotum* - 2 rukávce
7. Varianta se suspenzí *Bacillus macerans* - 2 rukávce
8. Varianta se suspenzí *Bacillus macerans* s *T.pleurotum* - 2 rukávce

4.1.2.6 POKUS Č. 6

Vliv inokulace substrátu kontaminovaného *T. pleurotum* pomocí bakterií *Bacillus subtilis* a *Bacillus macerans* s konečným zahřátím fermentovaného substrátu na 45°C.

Cílem tohoto pokusu je zjištění, zda aplikované bakterie po fermentaci a následném zahřátí substrátu na 45°C jsou schopny potlačit rozvoj houby *T. pleurotum* a přispět k lepší kolonizaci substrátu hlívou.

Tento pokus byl založen na stejném principu jako předchozí dva pokusy ale s tím rozdílem, že u tohoto pokusu dojde ke konečnému zahřátí substrátu pouze při teplotě 45°C.

Varianty

1. Kontrolní varianta: pelety namočené ve vodě v poměru 1 díl pelet + 2 díly vody
2. Kontrolní varianta: pelety namočené ve vodě v poměru 1 díl pelet + 2 díly vody.
Do substrátu se přidá navíc inokulum *T. pleurotum*
3. Kontrolní varianta bez fermentace: pelety namočené ve vodě v poměru 1 díl pelet + 2 díly vody
4. Kontrolní varianta bez fermentace: pelety namočené ve vodě v poměru 1 díl pelet + 2 díly vody. Do substrátu se přidá navíc inokulum *T. pleurotum*
5. Varianta s *Bacillus subtilis*: tato varianta se připraví tak, že se přidá 10 ml suspence mikroorganismů na 990 ml teplé vody a 1 kg pelet se promíchá s 2 l takto upravené vody

6. Varianta s *Bacillus subtilis*: tato varianta se připraví tak, že se přidá 10 ml suspence mikroorganismů na 990 ml teplé vody a 1 kg pelet se promíchá s 2 l takto upravené vody. Do substrátu se přidá navíc inokulum *T. pleurotum*
7. Varianta s *Bacillus macerans*: tato varianta se připraví tak, že se přidá 10 ml suspence mikroorganismů na 990 ml teplé vody a 1 kg pelet se promíchá s 2 l takto upravené vody.
8. Varianta s *Bacillus macerans*: tato varianta se připraví tak, že se přidá 10 ml suspence mikroorganismů na 990 ml teplé vody a 1 kg pelet se promíchá s 2 l takto upravené vody. Do substrátu se přidá navíc inokulum *T. pleurotum*

Bacillus subtilis - $6,31 \times 10^8$ buň/ml, ***Bacillus macerans*** - $4,77 \times 10^8$ buň/ml,
Trichoderma pleurotum - $2,91 \times 10^7$ spor/ml

V tomto pokusu byly založeny tyto varianty:

1. Kontrolní varianta - 2 rukávce
2. Kontrolní varianta s *T. pleurotum* - 2 rukávce
3. Kontrolní varianta - 8 sklenic bez fermentace
4. Kontrolní varianta s *T. pleurotum* - 8 sklenic bez fermentace
5. Varianta se suspensí *Bacillus subtilis* - 2 rukávce
6. Varianta se suspensí *Bacillus subtilis* s *T. pleurotum* - 2 rukávce
7. Varianta se suspensí *Bacillus macerans* - 2 rukávce
8. Varianta se suspensí *Bacillus macerans* s *T. pleurotum* - 2 rukávce

4.1.2.7 POKUS Č. 7

Zjištění ovlivnění fermentace separátu z bioplynové stanice (BPS) jako substrát pro hlívu ústříčnou

Tento pokus byl založen pro ověření, zda je možné využít separát z BPS jako substrát pro pěstování hlívy.

Přesný postup

BPS se navážil v čistých nádobách na hmotnost 600 g a přidalo se cca. 200 - 250 ml vody, aby se zvýšila vlhkost separátu. Navlhčený separát se naplnil do rukávců, které byly perforované, aby zde docházelo k dostatečnému okysličení.

Rukávce se nechaly fermentovat v termostatu při teplotě 30°C po dobu tři dní. Následně se polovina rukávců vyjmula z termostatu, naplnila se do sterilních sklenic a naočkoval se povrch substrátu.

Druhá polovina rukávců se nechala v termostatu, teplota se zvýšila na teplotu 50°C po dobu 24 hodin. Po fermentaci se separát naplnil do sterilních sklenic a povrch se naočkoval sadbou hlívy.

4.1.2.8 POKUS Č. 8

Zjištění schopnosti houby *Trichoderma* infikovat fermentovaný substrát pro hlívu ústříčnou.

Cílem tohoto pokusu je zjistit do jaké míry je fermentovaný substrát z pšeničných pelet schopen odolávat infekci houbou *Trichoderma pleurotum*.

Přesnější postup

U kontrolní varianty se navážilo 1200 g nesterilizovaných pelet, a přidalo se 2, 7 l horké vody. Vše se smíchalo ve sterilizovaných nádobách a pelety se nechaly rozpadnout. U varianty se zelenatkou se při dvojitě dávce navážilo 1200 g nesterilizovaných pelet a přidalo se 2,2 litrů vody. Ve zbylých 500 ml vody se rozmíchala zelenatka a přidala se do pšeničných pelet. Vše se důkladně promíchalo a naplnilo do rukávců. Varianty se nechaly fermentovat v termostatu.

Varianty

1. Kontrolní varianta A: pelety namočené ve vodě v poměru 1 díl pelet + 2 díly vody
2. Kontrolní varianta B: pelety namočené ve vodě v poměru 1 díl pelet + 2 díly vody fermentované ve 30°C

3. Pelety namočené ve vodě v poměru 1 díl pelet + 2 díly vody, infikované sporami *Trichoderma* a následně fermentované ve 30°C

V tomto pokusu byly založeny tyto varianty

1. Kontrolní varianta – 6 sklenic bez fermentace
2. Kontrolní varianta ponecháno přirozené fermentaci ve 30°C – 2 tlačenkové rukávce
3. Varianta se suspensí *spor Trichoderma* v přirozené fermentaci ve 30°C – 2 tlačenkové rukávce

Po fermentaci se substrát jednotlivých variant rozdělil následovně

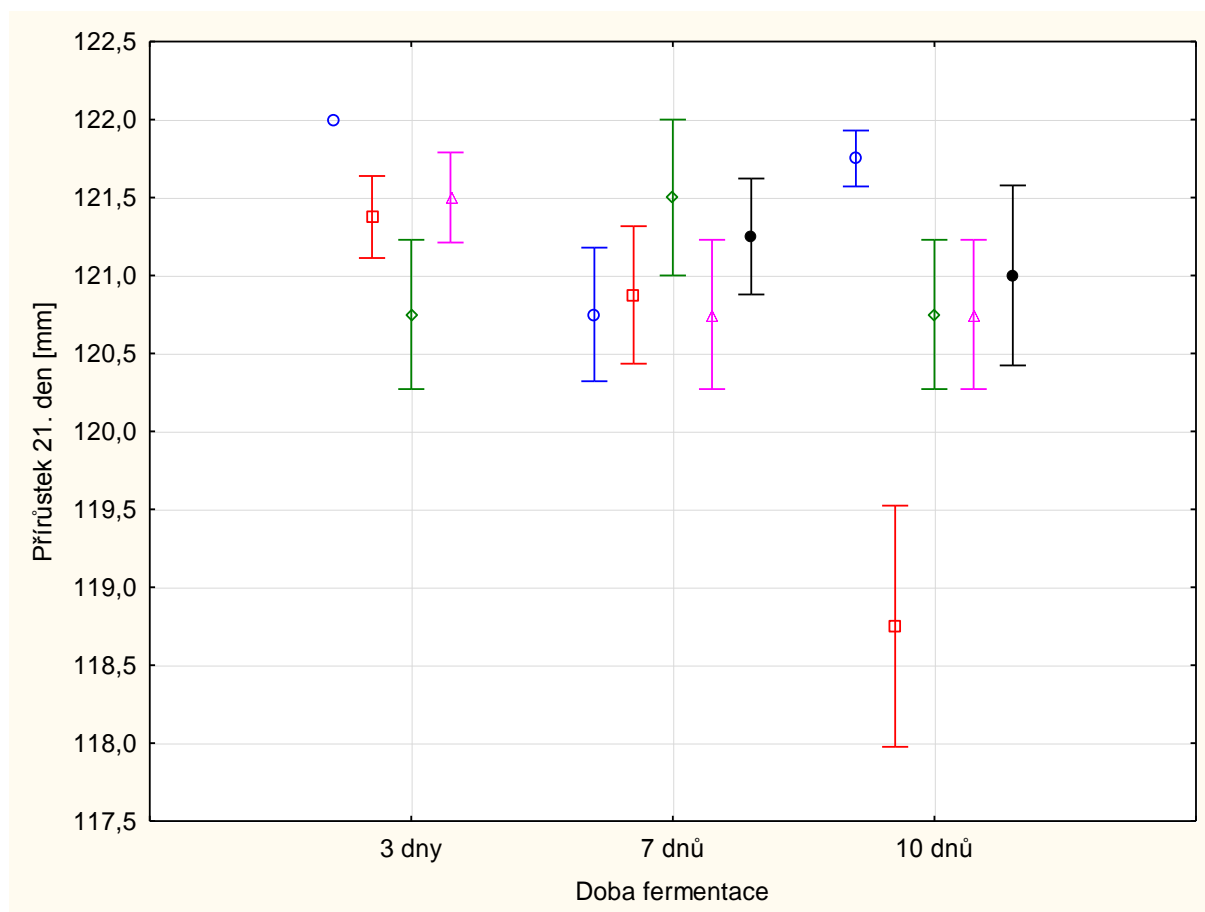
1. Kontrolní varianta se naplnila do 6 sklenic. 3 sklenice se ošetřily po dobu 48 hodin v teplotě 50°C (v termostatu s nastavenou teplotou na 50°C) a 3 se umístily v zavařovacím hrnci, kde se také teplota nastavila na 70°C po dobu 24 hodin. Po teplotním ošetření se substrát ve sklenicích osázal na povrch zrnitou sadbou.
2. Fermentovaná varianta se naplnila do 8 sklenic. 4 sklenice se ošetřily po dobu 48 hodin v teplotě 50°C (v termostatu s nastavenou teplotou na 50°C) a 4 se umístily v zavařovacím hrnci, kde se také teplota nastavila na 70°C po dobu 24 hodin. Po teplotním ošetření se substrát ve sklenicích osázal na povrch zrnitou sadbou.
3. Varianta určená k následné infekci se naplnila do 8 sklenic. 4 sklenice se ošetřily po dobu 48 hodin v teplotě 50°C (v termostatu s nastavenou teplotou na 50°C) a 4 se umístily v zavařovacím hrnci, kde se také teplota nastavila na 70°C po dobu 24 hodin. Po teplotním ošetření se substrát ze sklenic ošetřených v jednotlivých teplotních režimech vysypal do sterilní nádoby, zaočkoval se sporami zelenatky. Opět se naplnil do sklenic a na povrch se zaočkoval sadbou hlívy.

5 VÝSLEDKY




5.1 POKUS Č. 1

Vliv koncentrace m - o a doby fermentace na následný růst mycelia houby *Pleurotus ostreatus*

U založených variant se projevila nevýhoda sterilizovaných pelet oproti nesterilizovaným. Sterilizované pelety obtížně absorbovaly vodu, kterou měly pojmout pro správnou vlhkost substrátu, a tak zůstalo velké množství neabsorbované vody. Vznikala nadbytečná vlhkost, která mohla způsobit rozvoj nežádoucích mikroorganismů při fermentaci. U prvního pokusu se zkoumalo, jak ovlivní přidaná suspenze EM-Eko a délka fermentace substrát pro hlívu (*Pleurotus ostreatus*).



- Ošetření Sterilizované pelety se suspenzí 10 ml EMa Super Comp
- Ošetření Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou

-  Ošetření Nesterilizované pelety s teplou vodou
-  Ošetření Sterilizované pelety s teplou vodou
-  Ošetření Sterilizované pelety se suspenzí 5 ml EMa Super Comp

Ošetření	Doba fermentace	Přírůstek	Přírůstek	Přírůstek	Přírůstek	Přírůstek	Přírůstek
		7. den [mm] Průměr	7. den [mm] Sm.Ch.	14. den [mm] Průměr	14. den [mm] Sm.Ch.	21. den [mm] Průměr	21. den [mm] Sm.Ch.
Sterilizované pelety se suspenzí 10 ml EMa Super Comp	3 dny	43,00	1,65	113,75	1,87	122,00	*
	7 dnů	37,00	1,99	94,42	1,71	120,75	0,43
	10 dnů	47,42	1,63	114,67	2,32	121,75	0,18
Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou	3 dny	35,13	1,25	94,63	1,86	121,38	0,26
	7 dnů	35,25	1,28	84,13	2,97	120,88	0,44
	10 dnů	33,38	0,82	84,13	1,17	118,75	0,77
Nesterilizované pelety s teplou vodou	3 dny	45,25	1,25	104,00	1,29	120,75	0,48
	7 dnů	35,00	1,08	88,25	1,80	121,50	0,50
	10 dnů	34,00	1,58	88,00	1,68	120,75	0,48
Sterilizované pelety s teplou vodou	3 dny	44,50	3,01	97,75	1,75	121,50	0,29
	7 dnů	39,75	1,31	86,00	5,61	120,75	0,48
	10 dnů	40,25	1,65	110,25	2,56	120,75	0,48
Sterilizované pelety se suspenzí 5 ml EMa Super Comp	3 dny	*	*	*	*	*	*
	7 dnů	48,25	1,67	109,92	1,67	121,25	0,37
	10 dnů	4,50	0,65	57,25	4,48	121,00	0,58

* kontaminace - nebylo hodnoceno

Při délce fermentace 3. dny nebyl zaznamenán růst mycelia houby při přidavku suspenze 5ml. Došlo k 100% kontaminaci, ale oproti tomu varianta s 10 ml suspenze byla bez kontaminace a prorůstání mycelia substrátem byla bez komplikací. U varianty nesterilizovaných pelet spařených horkou vodou, nesterilizovaných pelet s teplou a sterilizovaných pelet s teplou vodou mycelium prorůstalo.

Při délce fermentace 7. dní bylo dosaženo nejvyšších přírůstků mycelia u varianty sterilizovaných pelet se suspenzí 5 ml. U varianty sterilizovaných pelet se suspenzí 10 ml došlo při kolonizaci ke kontaminaci. Varianty nesterilizovaných pelet spařených horkou vodou, nesterilizovaných pelet s teplou vodou a sterilizovaných pelet s teplou vodou dosáhly přírůstky mycelia průměrných hodnot.

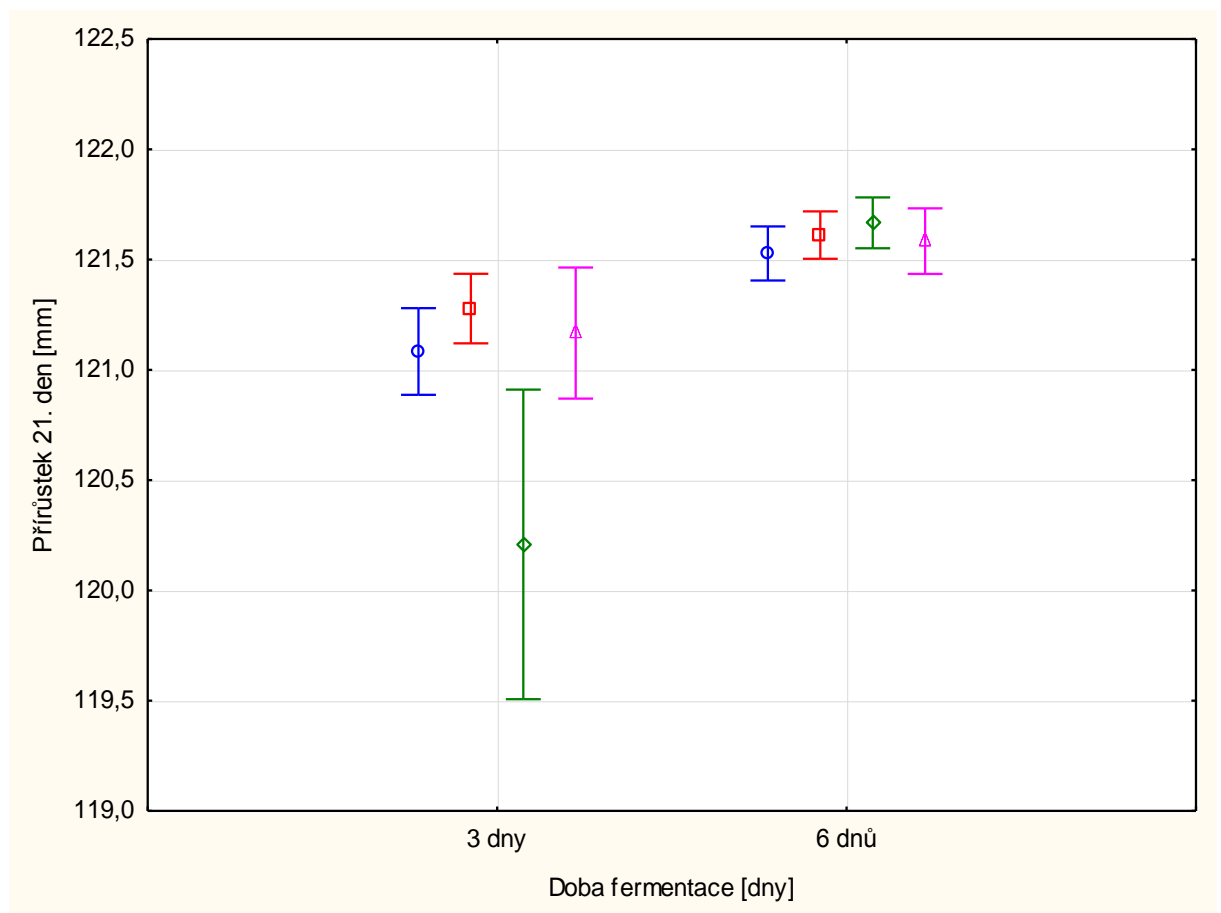
U délky fermentace 10. dní nejrychleji prorostlo mycelium u varianty sterilizovaných pelet se suspenzí 10 ml. U varianty sterilizovaných pelet se suspenzí došlo k 100% kontaminaci. Ostatní varianty nesterilizovaných pelet spařených horkou vodou, nesterilizovaných pelet s teplou vodou a sterilizovaných pelet s teplou vodou dosáhly průměrných hodnot.





Z tohoto pokusu nejlépe dopadla varianta sterilizovaných pelet se suspenzí v množství 10 ml a neúčinnější je délka fermentace 5 dní. Pro velkopěstitele je z ekonomického hlediska doba fermentace ideální co v nejkratší době.

5.2 POKUS Č. 2

Vliv inokulace substrátů pomocí mikroorganismů *Bacillus subtilis* a *Bacillus macerans*.

U tohoto pokusu byla doba fermentace zkrácená na 3. a 5. dní. Všechny založené varianty byly pouze z nesterilizovaných pelet zvlhčené teplou vodou.



-  Ošetření Nesterilizované pelety se suspenzí *Bacillus subtilis*
-  Ošetření Nesterilizované pelety se suspenzí *Bacillus macerans*
-  Ošetření Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola
-  Ošetření Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola bez fermentace

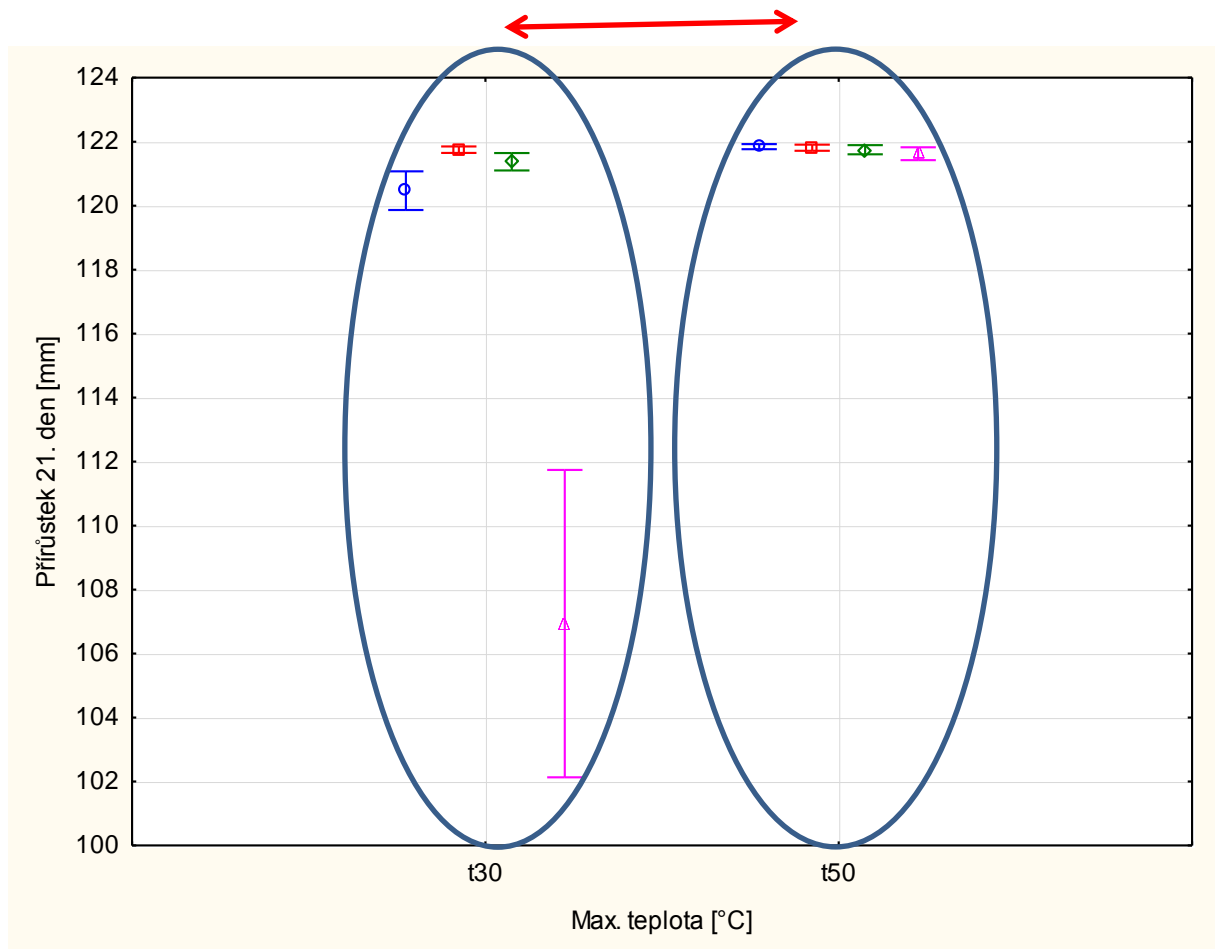
Ošetření	Doba fermentace [dny]	Přírůstek 7. den [mm] Průměr	Přírůstek 7. den [mm] Sm.Ch.	Přírůstek 14. den [mm] Průměr	Přírůstek 14. den [mm] Sm.Ch.	Přírůstek 21. den [mm] Průměr	Přírůstek 21. den [mm] Sm.Ch.
Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus subtilis</i>	3	31,19	0,60	85,00	0,99	121,08	0,20
	6	31,83	0,93	84,50	1,06	121,53	0,12
Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus macerans</i>	3	28,92	0,76	90,31	1,10	121,28	0,16
	6	33,64	0,88	93,50	1,05	121,61	0,11
Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola	3	30,75	0,77	80,50	1,48	120,21	0,70
	6	37,17	0,98	88,79	1,44	121,67	0,12
Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola bez fermentace	3	25,17	1,13	80,50	1,69	121,17	0,30
	6	30,08	0,86	81,42	1,96	121,58	0,15





Variety založené po 3. dnech fermentace a 5. dnech fermentace prokazovaly stejné hodnoty, což pro náš pokus znamenalo, že bakterie nevykazují podstatný vliv na růst mycelia. Z vybraných bakterií se pozitivně pro substrát projevila bakterie *Bacillus macerans*.

5.3 POKUS Č. 3

Vliv inokulace substrátu pomocí bakterií *Bacillus macerans* a *Bacillus subtilis* s konečným zahřáním fermentovaného substrátu na 50°C.

Účelem pokusu bylo porovnat, v jaké míře ovlivní použitá teplota během fermentace substrát a jeho vhodnost pro kolonizaci podhoubím hlívy. Teplota během fermentace se po třech dnech zvýšila na 50°C po dobu dvou dnů. Pozorovalo se, zda teplota výrazně ovlivní prorůstání a kolonizaci konkurenčních hub.



-  Ošetření Nesterilizované pelety se suspenzí *Bacillus subtilis*
-  Ošetření Nesterilizované pelety se suspenzí *Bacillus macerans*
-  Ošetření Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola
-  Ošetření Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola bez fermentace

Ošetření	Max. teplota [°C]	Přírůstek 7. den [mm] Průměr	Přírůstek 7. den [mm] Sm.Ch.	Přírůstek 14. den [mm] Průměr	Přírůstek 14. den [mm] Sm.Ch.	Přírůstek 21. den [mm] Průměr	Přírůstek 21. den [mm] Sm.Ch.
Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus subtilis</i>	t30	39,59	0,79	94,50	1,20	120,47	0,60
	t50	34,22	0,84	88,31	0,93	121,84	0,08
Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus macerans</i>	t30	37,72	0,84	89,28	1,22	121,75	0,10
	t50	36,63	0,69	91,47	0,70	121,81	0,09
Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola	t30	32,44	1,06	87,75	1,22	121,38	0,27
	t50	36,69	0,90	90,63	0,81	121,75	0,14
Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola bez fermentace	t30	37,63	0,96	86,38	4,26	106,94	4,80
	t50	38,19	1,07	90,50	2,05	121,63	0,20

Výsledkem bylo, že substrát byl pro mycelium hlívy lépe přístupný než při teplotě fermentace 30°C.

U variant založených po třech dnech fermentace při 30°C došlo ke kontaminaci pouze u kontrolní varianty nefermentovaného substrátu. A to u dvou sklenic ze čtyř (93% a 90% kontaminace). Jinak ostatní varianty byly bez kontaminace. Perspektivní z bakterií se v tomto pokusu ukázal *Bacillus subtilis*.

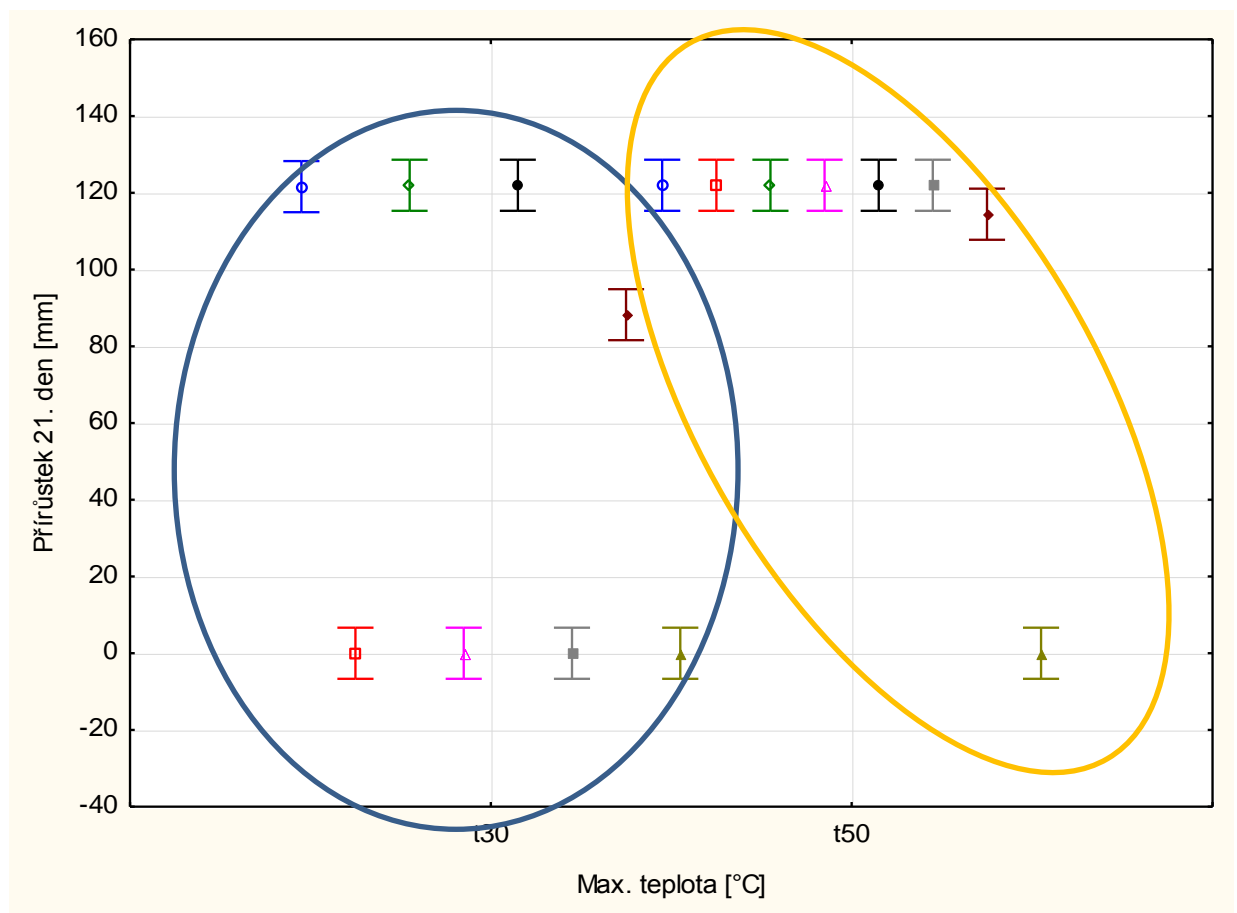
U variant založených po třech dnech fermentace při 30°C a následně zvýšení teploty na 50°C po dobu 24 hodin došlo ke kontaminaci pouze u kontrolní varianty nefermentovaného substrátu. Došlo ke kontaminaci tří sklenic ze čtyř (100%, 30% a 5% kontaminace. Perspektivní z bakterií se v tomto pokusu ukázal *Bacillus macerans*.

5.4 POKUS Č. 4







Vliv inokulace substrátu kontaminovaného *T. pleurotum* pomocí mikroorganismů *Bacillus subtilis* a *Bacillus macerans* s konečným zahřátím fermentovaného substrátu (50°C).

Tento pokus byl založen na stejném principu jako 3. pokus ale s tím rozdílem, že u vybraných variant byla přidána *Trichoderma pleurotum* aby se zjistilo, zda teplota během fermentace pozitivně či negativně ovlivní substrát.

Došlo ke kontaminaci u variant založených po třech dnech fermentace obsahující zelenatku (*Trichoderma pleurotum*) a zároveň se objevila 100% kontaminace u jedné sklenice kontrolní varianty bez fermentace.



- Ošetření Nesterilizované pelety se suspenzí *Bacillus subtilis*
- Ošetření Nesterilizované pelety se suspenzí *Bacillus subtilis* + *Trichoderma pleurotum*

-  Ošetření Nesterilizované pelety se suspenzí *Bacillus macerans*
 Ošetření Nesterilizované pelety se suspenzí *Bacillus macerans* + *Trichoderma pleurotum*
 Ošetření Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola
 Ošetření Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola + *Trichoderma pleurotum*
 Ošetření Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola bez fermentace
 Ošetření Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola bez fermentace + *Trichoderma pleurotum*

Ošetření	Max. teplota [°C]	Přírůstek 7. den [mm] Průměr	Přírůstek 7. den [mm] Sm.Ch.	Přírůstek 14. den [mm] Průměr	Přírůstek 14. den [mm] Sm.Ch.	Přírůstek 21. den [mm] Průměr	Přírůstek 21. den [mm] Sm.Ch.
Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus subtilis</i>	t30	36,81	1,30	91,50	2,45	121,63	3,38
	t50	35,19	1,30	86,37	2,45	122,00	3,38
Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma pleurotum</i>	t30	0,00	1,30	0,00	2,45	0,00	3,38
	t50	34,62	1,30	84,56	2,45	122,00	3,38
Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus macerans</i>	t30	33,63	1,30	86,81	2,45	122,00	3,38
	t50	32,94	1,30	86,44	2,45	122,00	3,38
Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus macerans</i> + <i>Trichoderma pleurotum</i>	t30	0,00	1,30	0,00	2,45	0,00	3,38
	t50	38,88	1,30	90,75	2,45	122,00	3,38
Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola	t30	37,50	1,30	88,75	2,45	122,00	3,38
	t50	34,69	1,30	87,19	2,45	122,00	3,38
Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola + <i>Trichoderma pleurotum</i>	t30	0,00	1,30	0,00	2,45	0,00	3,38
	t50	35,94	1,30	87,94	2,45	122,00	3,38

Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola bez fermentace	t30	21,44	1,30	57,44	2,45	88,25	3,38
	t50	33,63	1,30	77,88	2,45	114,44	3,38
Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola bez fermentace + <i>Trichoderma pleurotum</i>	t30	0,00	1,30	0,00	2,45	0,00	3,38
	t50	0,00	1,30	-0,00	2,45	0,00	3,38

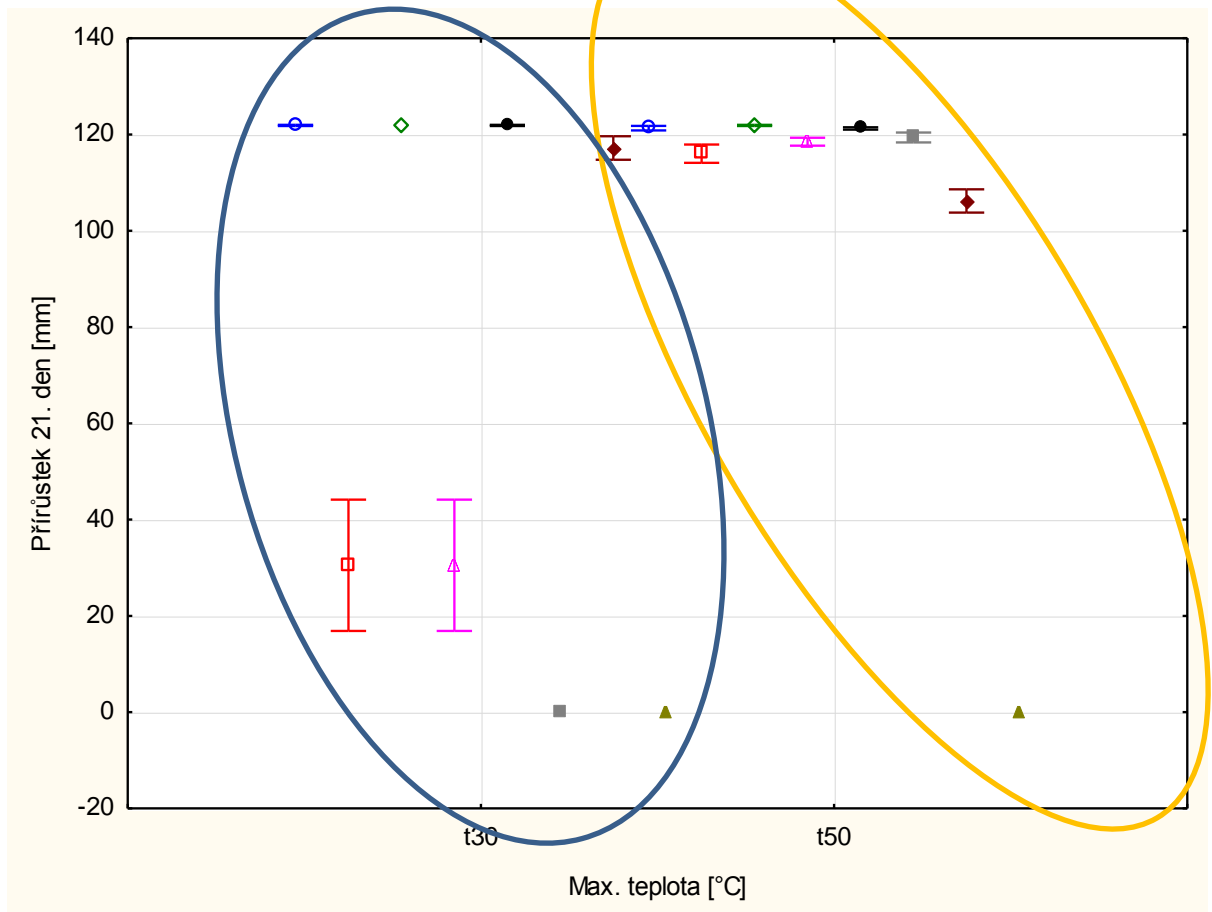
U variant založených po třech dnech fermentace plus 24 hodinám při teplotě 50°C došlo ke kontaminaci pouze u kontrolní varianty bez fermentace. Došlo ke 100% kontaminace u všech čtyř sklenic.

Výsledkem bylo zjištění, že při teplotě fermentace 50°C pozitivně ovlivní substrát více než teplota 30°C. Během fermentace dojde ke zničení konkurenčních hub.

5.5 POKUS Č. 5

Vliv inokulace substrátu kontaminovaného *T. pleurotum* pomocí bakterií *Bacillus subtilis* a *Bacillus macerans* s konečným zahřátím fermentovaného substrátu na 50°C.

Tento pokus byl založen jako kontrola předchozího s podobnými a zároveň srovnatelnými výsledky.



- ⊕ Ošetření Nesterilizované pelety se suspenzí *Bacillus subtilis*
- ⊕ Ošetření Nesterilizované pelety se suspenzí *Bacillus subtilis* + *Trichoderma pleurotum*
- ⊕ Ošetření Nesterilizované pelety se suspenzí *Bacillus macerans*
- ⊕ Ošetření Nesterilizované pelety se suspenzí *Bacillus macerans* + *Trichoderma pleurotum*
- ⊕ Ošetření Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola
- ⊕ Ošetření Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola + *Trichoderma pleurotum*
- ⊕ Ošetření Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola bez fermentace
- ⊕ Ošetření Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola bez fermentace + *Trichoderma pleurotum*

Ošetření	Max. teplota [°C]	Přírůstek 7. den [mm] Průměr	Přírůstek 7. den [mm] Sm.Ch.	Přírůstek 14. den [mm] Průměr	Přírůstek 14. den [mm] Sm.Ch.	Přírůstek 21. den [mm] Průměr	Přírůstek 21. den [mm] Sm.Ch.
Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus subtilis</i>	t30	33,13	2,03	74,69	1,67	121,88	0,13
	t50	33,75	1,21	71,94	0,82	121,31	0,45
Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma pleurotum</i>	t30	33,88	1,39	66,06	1,73	30,50	13,64
	t50	24,63	2,19	63,38	1,23	116,00	1,90
Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus macerans</i>	t30	30,19	1,66	68,75	1,67	122,00	
	t50	34,31	0,83	73,88	1,03	121,88	0,13
Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus macerans</i> + <i>Trichoderma pleurotum</i>	t30	36,81	1,14	72,81	0,93	30,50	13,64
	t50	30,31	0,69	67,69	0,83	118,50	0,82
Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola	t30	28,69	2,08	67,81	1,75	121,88	0,12
	t50	32,69	1,70	72,50	1,55	121,25	0,25
Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola + <i>Trichoderma pleurotum</i>	t30	28,31	2,01	59,25	1,77	*	
	t50	29,44	1,77	69,44	1,33	119,38	1,02
Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola bez fermentace	t30	24,06	2,18	60,94	2,04	117,19	2,45
	t50	24,25	1,90	60,75	1,44	106,19	2,41

Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola bez fermentace + <i>Trichoderma pleurotum</i>	t30	0,00		0,00		0,00	
	t50	0,00		0,00		0,00	

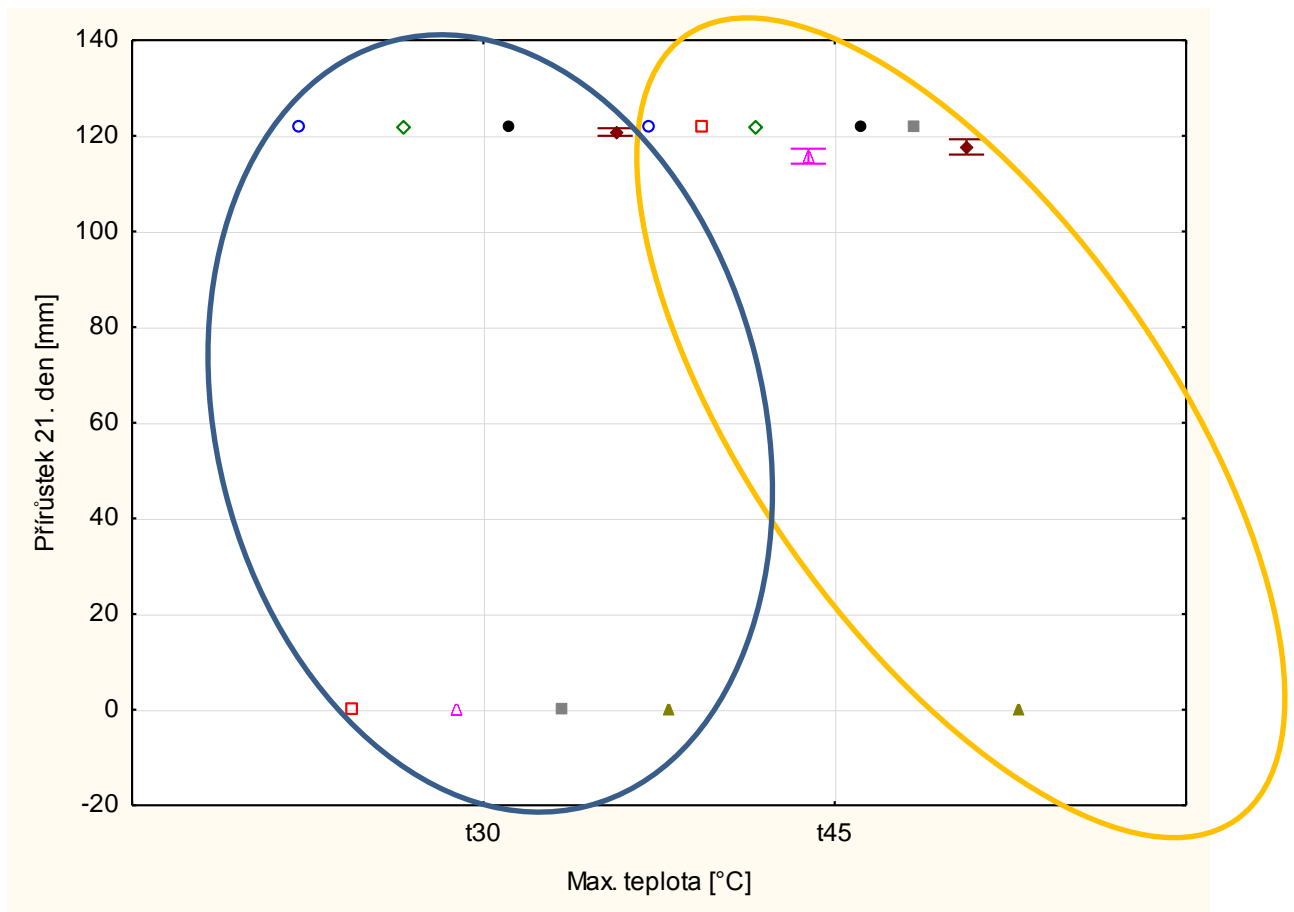
U variant založených po třech dnech fermentace došlo ke kontaminaci pouze u variant obsahujících zelenatku (*Trichoderma pleurotum*). Mycelium bylo původně měřitelné u všech variant ale následně po cca. 14. dnech došlo ke kontaminaci celé sklenice u uvedených variant se zelenatkou. Proto jsou zaznamenané údaje o růstu, ale při posledním měření byly sklenice již celé prorostlé zelenatkou.

Varianty založené po třech dnech fermentace a 24 hodinám při teplotě 50°C podlehla kontaminaci pouze kontrolní varianta bez fermentace se zelenatkou. Kontaminaci podlehly všechny čtyři sklenice.

5.6 POKUS Č. 6

Vliv inokulace substrátu kontaminovaného *T. pleurotum* pomocí bakterií *Bacillus subtilis* a *Bacillus macerans* s konečným zahřátím fermentovaného substrátu na 45°C.

Tento pokus byl založen na základě snížení fermentované teploty z 50°C na 45°C a bylo prokázáno, že i snížení teploty fermentace na 45°C je dostatečné k potlačení konkurenčních hub.



- ⊕ Ošetření Nesterilizované pelety se suspenzí *Bacillus subtilis*
- ⊕ Ošetření Nesterilizované pelety se suspenzí *Bacillus subtilis* + *Trichoderma pleurotum*
- ⊕ Ošetření Nesterilizované pelety se suspenzí *Bacillus macerans*
- ⊕ Ošetření Nesterilizované pelety se suspenzí *Bacillus macerans* + *Trichoderma pleurotum*
- ⊕ Ošetření Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola
- ⊕ Ošetření Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola + *Trichoderma pleurotum*
- ⊕ Ošetření Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola bez fermentace
- ⊕ Ošetření Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola bez fermentace + *Trichoderma pleurotum*

Ošetření	Max. teplota [°C]	Přírůstek 7. den [mm] Průměr	Přírůstek 7. den [mm] Sm.Ch.	Přírůstek 14. den [mm] Průměr	Přírůstek 14. den [mm] Sm.Ch.	Přírůstek 21. den [mm] Průměr	Přírůstek 21. den [mm] Sm.Ch.
Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus subtilis</i>	t30	40,56	0,66	93,81	1,06	122,00	
	t45	40,56	1,51	86,81	1,21	122,00	
Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma pleurotum</i>	t30	37,56	1,11	80,19	1,22	0,00	
	t45	42,56	0,69	91,44	0,92	122,00	
Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus macerans</i>	t30	37,56	0,86	86,25	1,28	122,00	
	t45	41,31	0,97	87,19	1,25	122,00	
Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus macerans</i> + <i>Trichoderma pleurotum</i>	t30	35,56	1,24	77,63	2,46	0,00	
	t45	27,63	0,93	70,00	1,73	115,75	1,57
Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola	t30	36,63	1,37	89,00	1,62	122,00	
	t45	39,38	1,10	89,31	1,19	122,00	
Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola + <i>Trichoderma pleurotum</i>	t30	33,00	1,99	70,38	1,87	0,00	
	t45	38,19	1,43	84,88	1,52	122,00	
Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola	t30	29,94	1,46	76,31	2,48	120,81	0,79

kontrola bez fermentace	t45	31,93	1,72	76,33	1,68	117,40	1,69
Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola bez fermentace + <i>Trichoderma pleurotum</i>	t30	0,00		0,00		0,00	
	t45	0,00		0,00		0,00	

U fermentace při 30°C došlo ke kontaminaci u všech variant s *Trichodermou pleurotum*, nejprve prorůstalo podhoubí substrátem, ale později se kontaminace rozšířila po celé sklenici. Ke kontaminaci došlo také u varianty nesterilizovaných pelet spařených vroucí vodou - kontrola bez fermentace. Zde probíhala počínající kontaminace u 3 sklenic ze 4.

U variant fermentovaných při 45°C došlo ke kontaminaci pouze u varianty nesterilizovaných pelet spařených vroucí vodou - kontrola bez fermentace s *Trichodermou pleurotum*.

5.7 POKUS Č. 7

Zjištění ovlivnění fermentace separátu BPS jako substrát pro hlívu ústříčnou

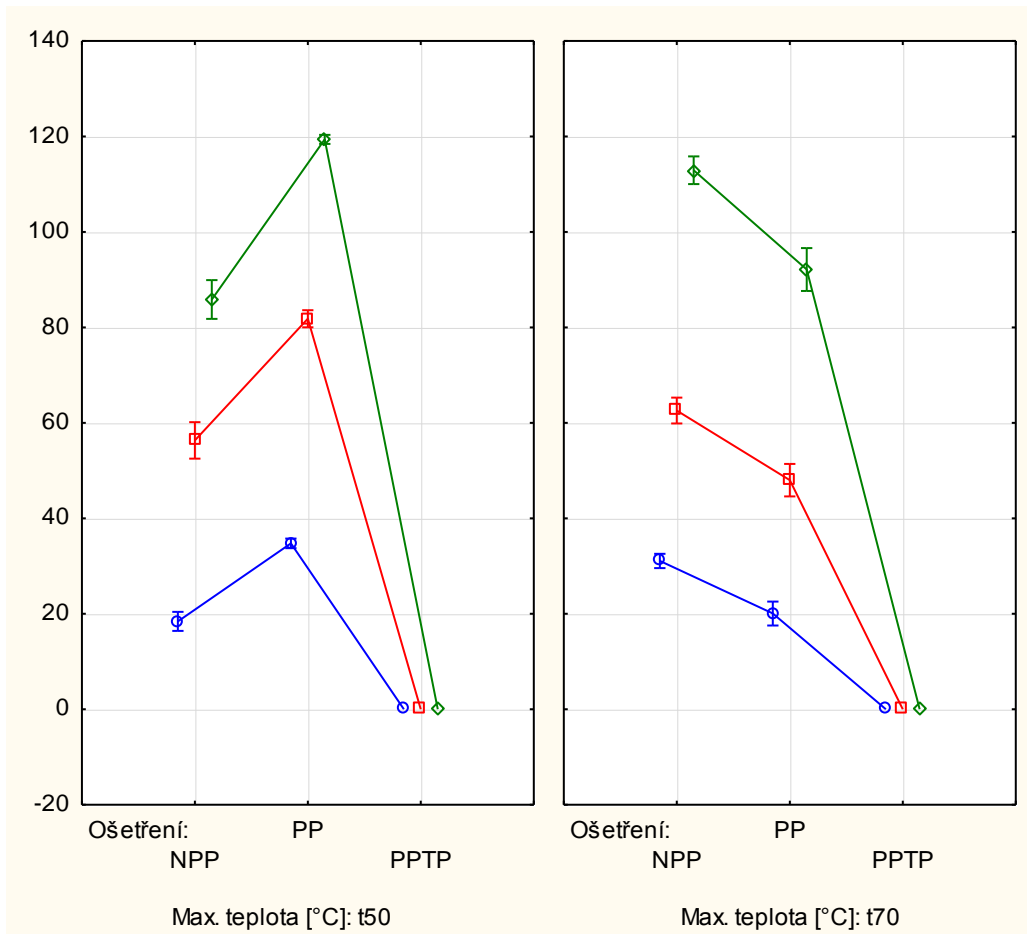
U tohoto pokusu bylo zjištěno, že použití separátu BPS jako substrát pro hlívu ústříčnou není možný z důvodu velkého množství amoniaku. Amoniak omezuje rozvoj mycelia hlívy.

5.8 POKUS Č. 8

Zjištění schopnosti houby *Trichoderma* infikovat fermentovaný substrát pro hlívu ústříčnou.

V tomto pokusu došlo ke zjištění, že správně zvolená teplota použitá během fermentace a následné pasterizace je velmi důležitá. Pozorovalo se zde, jak *Trichoderma pleurotum* ovlivní fermentovaný substrát při teplotě 30°C a následné pasterizaci buď při

teplotě 50°C po dobu 48 hodin nebo 70°C po dobu 24 hodin. Výsledkem byl rozdílný růst mycelia *Pleurotus ostreatus* u použitých teplot.



- ◆ Přírůstek 7. den [mm]
- ◆ Přírůstek 14. den [mm]
- ◆ Přírůstek 21. den [mm]

Ošetření	Max. teplota [°C]	Přírůstek 7. den [mm]	Přírůstek 7. den [mm]	Přírůstek 14. den [mm]	Přírůstek 14. den [mm]	Přírůstek 21. den [mm]	Přírůstek 21. den [mm]
		Průměr	Sm.Ch.	Průměr	Sm.Ch.	Průměr	Sm.Ch.
NPP - Nefermentované pasterizované pelety	t50	18,42	1,99	56,33	3,82	85,83	4,06
	t70	31,08	1,50	62,58	2,71	112,92	2,90
PP - Pasterizované pelety	t50	34,75	1,01	81,81	1,79	119,38	0,94
	t70	20,06	2,51	48,00	3,39	92,13	4,48

PPTP - Pasterizované pelety se suspenzí <i>Trichoderma pleurotum</i>	t50	0,00		0,00		0,00	
	t70	0,00		0,00		0,00	

Z výsledku pokusu je jasně patrné, že použitá teplota 50°C je ideální pro ošetření substrátu oproti použité teplotě 70°C, ve které došlo k omezení mycelia *Pleurotus ostreatus*.

U zvolené teploty fermentace při 70°C bylo velkou zajímavostí, že u varianty nefermentovaných pasterizovaných pelet prorůstalo mycelium *Pleurotus ostreatus* substrátem mnohem lépe, než u fermentovaných pelet. Pravděpodobně u varianty fermentovaných pelet došlo k potlačení prospěšných mikroorganismů, k rozvoji konkurenčních organismů a zelených plísní.

6 DISKUSE

Jak uvedli Jablonský a Šašek (2006) je výběr metody přípravy substrátu závislý na druhu a kvalitě použité suroviny, ale také na technických možnostech výrobce substrátu. Proto bylo důležité rozhodnout, jakým způsobem ošetříme pšeničné pelety a zda použijeme pelety sterilizované či nesterilizované.

K prvnímu pokusu byly použity pšeničné pelety sterilizované v sušárně při teplotě 130°C a bylo prokázáno, že takto ošetřené pelety hůře přijímají vodu a dochází k omezenému prorůstání myceliem hlívy. Také Plicková (2013) zjistila, že sterilizace pelet neprospěla myceliu hlívy a, že to může též znamenat, že hlíva poroste sterilním substrátem pomaleji, ale také, že bude vnímavější vůči konkurentům než na substrátu ošetřeném horkou vodou.

Důsledkem těchto výsledků se u ostatních pokusů rozhodlo o používání nesterilizovaných pšeničných pelet. Takto neošetřené pelety vstřebávaly vodu rychleji a došlo i k lepšímu a rychlejšímu rozpadu pelet před naplněním do rukávců.

Pozitivním výsledkem bylo, že nedošlo k odstranění veškerých mikroorganismů, protože některé organismy jsou v substrátu pro prorůstání mycelia hlívy velice prospěšné.

Při pěstování jsou v substrátu často přítomny zárodky mnoha dalších hub, které jsou schopné na substrátu růst stejně rychle jako hlíva. Proto jsou nutná opatření, která umožní rychlý růst podhoubí hlívy a omezí vývoj konkurenčních hub (Jablonský a Šašek, 2006).

Kurtzman (2005) uvedl, že je podstatné uvědomit si rozdíl mezi pasterizací a sterilizací. Uvědomit si, co vlastně pasterizace je, že to není jen pokus zlikvidovat některé organismy v substrátu, ale že je mnohdy lepší substrát upravovat méně než více, než vše zlikvidovat v neprospěch substrátu. Ve skutečnosti je v pěstování hub, více než dobře definované, že veškerá tepelná úprava způsobí ztráty. Takže účelem pasterizace není zbavit se všech organismů, ale jak se zbavit těch, které soutěží s houbami a podpořit organismy, které omezují výskyt chorob. Konzumují hemicelulózu, poskytují dusík, a stanou se potravou pro houby.

Pokusy založené v této práci prokázaly, že tepelné ošetření substrátu ze slaměných pelet příznivě ovlivňuje za určitých teplotních podmínek mikrobiální složení substrátu, omezuje výskyt konkurenčních organismů a usnadňuje růst mycelia hlívy ústřičné (*Pleurotus ostreatus*).

Holliday et al. (2009) uvedli, že je důležité rozhodnout buď pro sterilizaci (úplná likvidace dalších mikroorganismů, které jsou přítomny v substrátu, a mohly by konkurovat houbám při využití substrátu jako potravina) nebo pasterizaci (zlikvidovat většinu konkurenčních organismů v substrátu).

Balasubramanya et al.(1996) uvedli, že jako alternativní metodu ošetření substrátu lze považovat máčení celulóзовého materiálu ve vodovodní vodě přes noc a přebytek vody se odstraní dekantací (oddělování vody od pevného materiálu opatrným slitím kapaliny, zatímco pevný materiál zůstane usazen na dně nádoby). Přidá se horká voda (teplota 80 ° C) a směs se nechá vychladnout po dobu 2 hodin, a potom se přebytek vody opět odstraní dekantací. Holliday et al. (2009) uvedli, že problematikou je pěstování hub v méně rozvinutých oblastech na světě. Zde je buď nedostupné, nebo příliš drahé využít přístup k těmto technologickým pokrokům. V těchto oblastech by bylo mnohem praktičtější se podívat na způsoby, jak pasterizovat či spíše než sterilizovat substrát, jiným způsobem než za použití metod páry. To může být provedeno mnoha způsoby, jako je použití běžně dostupných látek, jako je například mýdlo nebo vápenný hydrát na nepasterizovaném substrátu.

Většina živých organismů je na zvýšenou teplotu citlivá a hyne už při zahřátí do 60°C, avšak některé výtrusy jsou schopné přežít i ty nejnejpříznivější podmínky. Přesto některé zvláště odolné mikroorganismy vydrží i krátkodobé zahřátí na 100°C. Teploty okolo 60 - 70°C, které nazýváme pasterizací, se používají na usmrcení vegetativních forem většiny mikroorganismů (Ginterová, 1985).

Bylo zjištěno, že použitá teplota 30°C během fermentace není dostatečná k ošetření substrátu před konkurenčními mikroorganismy. Došlo k rozvoji nežádoucích organismů, a proto se u dalších pokusů zvýšila teplota během fermentace, aby došlo k jejich omezení či likvidaci.

Jablonský a Šašek (2006) uvedli, že musíme dosáhnout teploty okolo 115°C, aby se zničilo jak část vegetativní (aktivní mycelium), tak i klidová stádia (spory) konkurenčních hub, a to ve všech částech substrátu. Nicméně upozornili, že dlouhodobé zahřívání substrátu nad 63°C způsobí karamelizaci slámy a jednoduché cukry uvolněné tímto procesem jsou příznivé pro rozvoj konkurenčních hub.

Betina a kolektiv (1987) upozornili, že při sterilizaci teplem se projevuje všeobecný vztah, podle kterého platí, že čím vyšší je teplota, tím kratší čas musí působit, aby se dosáhlo požadovaného účinku.

Proto u ostatních pokusů byla teplota zvýšena na 50°C a bylo zjištěno, že došlo k omezení konkurenčních organismů v substrátu. U šestého pokusu došlo k experimentálnímu snížení fermentované teploty na 45°C a bylo prokázáno, že i snížení fermentované teploty na 45°C je dostatečné k jejich potlačení, ale, že je lepší využívat vyšší teploty ošetření substrátu. Není vhodné překračovat teploty vyšší 70°C, jelikož došlo k odstranění žádoucích organismů v substrátu.

Dle Kurtzmana (2005) stačí teplota pro pasterizaci vlhkého materiálu teplota do 55°C maximálně 60°C, že žádná část nesmí jít nad 55 - 60°C.

Z výsledků pokusů je patrné, že mycelium hlívy ústříčné nejlépe roste na substrátech ošetřených vyšší teplotou vyvinutou během fermentace, která se pohybovala v rozmezí od 50°C s maximální teplotou okolo 70°C. U nižších teplot došlo k rozvoji konkurenčních hub a jiných mikroorganismů. Je ovšem důležité brát ohled na použitý materiál, který se stal základem pro substrát. U hůře skladovaných materiálů či u materiálu s vyšší možností obsahu škodlivých organismů, je lepší využít vyšší teploty pohybující se okolo 70°C (Jablonský 2015 osobní sdělení).

Při testování ošetření substrátu pro hlívu ústříčnou se projevily rozdíly mezi tepelným ošetřením substrátu u vybraných teplot. *Trichoderma pleurotum* se projevila při ošetření substrátu teplotou 30°C, zatímco při fermentaci substrátu při teplotě 50°C se *Trichoderma pleurotum* neprojevila.

Zadrobilová (2012) zkoumala ošetření substrátu se suspensí *Trichoderma pleurotum* u kmene 416, který nepřežil ošetření teplem 55°C po dobu 20 minut, zatímco kmen *Trichoderma pleurotum* 432 nepřežil ošetření teplotou 65°C po dobu 10 minut.

Jablonský a Šašek (2006) uvedli, že osvědčenou metodou likvidace zárodků hub je vysoká teplota ošetření, která se rozděluje do několika základních metod ošetření. Základní metodou je sterilizace, při které se musí dosáhnout teploty okolo 110 - 115°C po dobu několika hodin. Dále se používá semisterilizace zvlhčené slámy, kde se používají teploty okolo 80 - 100°C po dobu 2 hodin nebo pasterizace, která probíhá při teplotě 60 - 70°C po dobu 24 - 48 hodin. V praxi se používají metody "rychlé pasterizace", což je zahřátí substrátu na 58 - 60°C po dobu 18 - 21 hodin a kombinace pasterizace s "kondicionací", kdy se substrát zahřeje po dobu 8 - 10 hodin na teplotu 60°C a potom se teplota sníží na 48 - 52°C.

Zatímco Kurtzman (2005) upozornil na to, že není vhodné používat teploty vyšší než 60°C, jelikož jakákoliv vyšší teplota umožní výskyt Trichodermy, a tím zničí úrodu.

Z výsledků některých pokusů vyplývá, že k ošetření substrátu během fermentace stačilo k potlačení konkurenční *Trichodermy pleurotum* dosažení teploty 50°C. Což znamená z ekologického hlediska pro velkopěstitele ušetření nákladů.

U pokusů se také sledovalo ovlivnění prostředí přidáním bakterií do substrátu. Pouze u prvního pokusu byla přidána směs mikroorganismů z preparátu *EMa Super Comp od firmy EM - Eko* a u ostatních pokusů použily bakterie *Bacillus subtilis* a *Bacillus macerans*.

V praxi se osvědčilo nechat substrátu po pasterizaci namnožit v teplotách do 50°C některé bakterie rodů *Pseudomonas*, *Bacillus* a streptomycety, protože produkty těchto mikroorganismů potlačují růst zelených plísní a jejich biomasu využívá podhoubí hlívy.

U pokusů nedošlo k výraznému zlepšení kolonizace substrátu pomocí směsi mikroorganismů, ale zároveň se zjistilo, že je lepší využít přirozeně namnoženou populaci m-o v substrátu.

V této práci byla zkoumána přítomnost především *Trichoderma pleurotum* (zelenatky) a její antagonismus vůči hlívě ústříčné.

Komon'-Zelazowska et al. (2007) studovali antagonismus mezi *Trichoderma pleurotum* a *Pleurotus ostreatus* s tím rozdílem, že pokusy probíhaly v in vitro podmínkách. Hlavním zjištěním v jejich pokusu byla přítomnost dvou nejdůležitějších druhů zelenatky, a to *Trichoderma pleurotum* a *Trichoderma pleuroticola*.

U pokusů se substrát fermentoval při teplotě 30 °C a pozorovalo se, jak si mycelia hub vzájemně konkurovaly. Například u čtvrtého pokusu v na počátku kolonizace mycelium hlívy narůstalo, ale během pár dní se na povrchu substrátu začaly objevovat spory *Trichoderma pleurotum*. Během prorůstání substrátu myceliem hub byly nejdříve jasně patrné přechody, ale později již v substrátu nebylo znatelné ohraničení mycelia hlívy a *Trichoderma pleurotum*. Oproti pátému pokusu se teplota fermentace zvýšila na 50°C a nedošlo ke kolonizaci substrátu konkurenční houbou *Trichoderma pleurotum*. Ke kontaminaci došlo pouze u nefermentované varianty, kde se kolonie hub navzájem prorůstaly, byly neohraničené a bylo jasně patrné, že mycelium *Trichoderma pleurotum* bylo znatelně dominantní oproti hlívě.

Zatímco Zadobilová (2012) zkoumala vzájemné prorůstání mycelia *Pleurotus ostreatus* a *Trichoderma pleurotum*. *Trichoderma pleurotum* a *Pleurotus ostreatus* byly naočkovány současně na sladivovém agaru, byly uchovány ve tmě a na rozdíl od pokusů založených v této práci nebyly mycelia konkurenčních hub výrazně ohraničené, a ani jedna z nich nebyla dominantní. Rozdíl růstu mezi oběma houbami nebyl tak znatelný. U dalšího

pokusu Zadobilové, kdy byla sadba *Pleurotus ostreatus* zaočkována se 7- denním zpožděním oproti *Trichoderma pleurotum* se projevil náskok mycelia *Trichoderma pleurotum* hlavně rychlejším růstem a přerůstáním hlívy. Přesto mycelium *Pleurotus ostreatus* po dobu trvání pokusu ataku *Trichoderma pleurotum* odolávalo.

Doporučila bych dále sledovat reakce *Trichoderma pleurotum* na teplotní ošetření substrátu. Různá teplotní ošetření včetně použití různorodých surovin na výrobu substrátu.

7 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zjistit, jak teplotní ošetření substrátu ovlivňuje jeho bakteriální složení, a dalším cílem bylo zjistit, jaké teplotní ošetření je dostačující k potlačení kompetiční houby *Trichoderma pleurotum*.

Výsledky pokusů prokázaly, že teplotní ošetření substrátu je důležité pro odstranění nežádoucích mikroorganismů ze substrátu, ale při využití příliš vysokých teplot dochází k likvidaci prospěšných mikroorganismů v substrátu a omezuje se tím rychlost růstu mycelia hlívy.

Bylo prokázáno, že *Pleurotus ostreatus* nejlépe roste na substrátech ošetřených vroucí vodou a fermentovaných při vyšších teplotách. Hlíva kolonizuje i substráty ošetřené nižší teplotou, ale zde docházelo ke vzájemné konkurenci *Pleurotus ostreatus* a *Trichoderma pleurotum*. Při použití vysokých teplot mycelium hlívy prorůstalo substrátem pomaleji než při použití ostatních testovaných teplot.

Ideální teplota vyvíjená během fermentace stanovena na základě pokusů a, která je vhodná pro kolonizaci substrátu myceliem houby *Pleurotus ostreatus* byla stanovena na 50°C. Zatímco teplota 30°C použitá u prvotních pokusů neprokázala dostatečné působení na mikrobiální složení substrátu a došlo k rozvoji zelených plísní.

Proto je důležité zvolit správnou teplotu a dobu fermentace a tím zároveň potvrdit hypotézu s tím, že je řízená fermentace důležitá. Po fermentaci se zlepší podmínky pro růst mycelia hlívy a zabrání se vývoji konkurenčních hub.

8 SEZNAM LITERATURY

8.1 KNIŽNÍ PUBLIKACE

Antonín, V. Jablonský, I. Šašek, V. Vančuříková, Z. 2013. Houby jako lék. Ottovo nakladatelství. Praha. 200 s. ISBN: 978-80-7451-257-5

Ginterová, A. 1985. Pestujeme huby. Příroda. Bratislava. 208 s. ISBN: 80-07-0057-X

Hýsek, J. Vach, M. Javůrek, M. 2008. Biologická ochrana obilnin proti houbovým fytopatogenům. Výzkumný ústav rostlinné výroby. Praha. 20 s. ISBN: 978-80-87011-56-0

Chang, S-T., Miles, P. G., 2004. Mushrooms, CRC Press, Florida, p. 451, ISBN: 0-8493-1043-1

Jablonský, I. Srb, A. Šašek, V. 1985. Pěstování jedlých hub. Státní zemědělské nakladatelství. Praha. 248 s.

Jablonský, I. Šašek, V. 1997. Pěstování hub ve velkém i malém. Brázda. Praha. 165 s. ISBN: 80-209-0266-X

Jablonský, I. Šašek, V. 2006. Jedlé a léčivé houby, pěstování a využití. Brázda. Praha. 263 s. ISBN: 80-209-0341-0

Kaprálek, F. 1986. Fyziologie bakterií. SPN. Praha. 602 s.

Lepšová, A. 2005. Houby jako elixír života. Víkend. Praha, 84 s. ISBN: 80-7222-369-0

Pilát, Albert. 1935. Atlas hub evropských, Pleurotus Fr. – hlíva. Pilát. A na vlastní náklady. Praha. 193 s.

Rypáček, V. 1957. Biologie dřevokazných hub. Nakladatelství Československé akademie věd. Praha. 209 s.

Valíček, P. 2011. Houby a jejich léčivé účinky. Start. Benešov. 151 s. ISBN: 978-80-86231-54-9

8.2 DOKUMENTY

Hatvani, L. Mushroom pathogenic *Trichoderma* species: occurrence, biodiversity, diagnosis and extracellular enzyme production. [online]. Department of Microbiology. Faculty of Science and Informatics. University of Szeged. 2008. 109 p. [cit. 2014-9-9-]. Dostupné z <http://www2.sci.u-szeged.hu/fokozatok/PDF/Hatvani_Lorant/dissertation_Hatvani_L.pdf>

Hatvani, L. Sabolić, P. Koscubé, S. Kredics, L. Czifra, D. Vágvolgyi, C. Kaliterna, J. Ivić, D. Dermić, E. Kosalec, I. The first report on mushroom green mould disease in Croatia. [online]. Scientific Paper. February 2012. [cit. 2013-10-12]. Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23334043>>

Gianotti, B. M., Cleaver M. P., Cleaver P. D., Bailey C., Holliday, J. C. Diversified Agriculture Part 1: Simplified and Lower Cost Methods for Mushroom cultivation in Africa. International Journal Of Medicinal Mushrooms. [online]. Aloha Medicinals Inc. Carson City. 2012. [cit. 2013-10-13].

Dostupné z <<http://www.alohaecowas.com/diversified-agriculture-part1.html>>

Köhl, J. Postma, J. Nicot, P. Ruocco, M. Blum, B. Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria. [online]. Plant Research International. December 2010. [cit. 2014-4-17]. Dostupné z <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964410002641>>

Schuster, A. Schmoll, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. [online]. Applied Microbiology and Biotechnology. May 2010. [cit. 2014-7-17]. Dostupné z <<http://link.springer.com/article/10.1007/s00253-010-2632-1>>

Vajna, B. Nagy, A. Sajben, E. Manczinger, L. Szijartó, N. Kádár, Z. Bordás, D. Márialigeti, K. Microbial community structure changes during oyster mushroom substrate preparation. [online]. Applied Microbiology and Biotechnology. December 2009. [cit. 2014-7-21]. Dostupné z <<http://link.springer.com/article/10.1007/s00253-009-2371-3>>

8.3 BAKALÁŘSKÉ A DIPLOMOVÉ PRÁCE

Hlochová, L. 2009. Bakalářská práce. Studium sterilizačního účinku diafragmového výboje v kapalinách. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. Brno. 34 s.

Plicková, P. 2013. Diplomová práce. Vliv ošetření substrátu na růst a aktivitu mycelia vybraných dřevokazných hub. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Praha. 106 s.

Zadrobilová, L. 2012. Bakalářská práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Praha. 62 s.

8.4 WEBOVÉ ZDROJE

Kirk, E. Bacillus subtilis. [online]. Microbiology at Missouri. 2009. [cit. 2014-8-12]. Dostupné z <http://web.mst.edu/~microbio/BIO221_2009/B_subtilis.html>

Larsen, R. Pogliano, K. Bacillus subtilis. [online]. Microbewici. 5 March 2013. [cit. 2014-8-12] Dostupné z <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bacillus_subtilis>

Wikipedia. Paenibacillus macerans. [online]. Wikipedie. 19. prosince 2014. [cit. 2015-1-12]. Dostupné z <http://en.wikipedia.org/wiki/Paenibacillus_macerans>

Kurtzman, R. Oyster Mushroom Cultivation [online]. 2006. [cit. 2015-4-3]. Dostupné z <<http://www.oystermushrooms.net/front.htm>>

9 PŘÍLOHY

Seznam příloh:

Grafické znázornění výsledků pokusů

Pokus č. 1

Graf č. 1

Graf č. 2

Graf č. 3

Pokus č. 2

Graf č. 4

Graf č. 5

Pokus č. 3

Graf č. 6

Graf č. 7

Pokus č. 4

Graf č. 8

Graf č. 9

Pokus č. 5

Graf č. 10

Graf č. 11

Pokus č. 6

Graf č. 12

Graf č. 13

Pokus č. 8

Graf č. 14

Graf č. 15

Fotodokumentace

Pokus č. 1

- Prorůstání substrátu myceliem hlívy ústřičné u varianty se suspenzí 10 ml přípravku Ema Super Comp.
- Kontaminace fermentovaného substrátu ošetřeného suspenzí 5 ml přípravku Ema Super Comp.
- Prorostlý substrát ošetřený inokulem *Bacillus subtilis*.

Pokus č. 2

- Prorostlý substrát ošetřený inokulem *Bacillus macerans*.
- Prorostlý fermentovaný substrát kontrolní varianty.

Pokus č. 3

- Substrát fermentovaný 3 dny při teplotě 30°C ošetřený suspenzí *Bacillus subtilis*.
- Porovnání varianty substrátu ošetřeným suspenzí *Bacillus subtilis* fermentovaného po dobu 3 dní při teplotě 30°C a následnému zvýšení teploty na 50°C.

Pokus č. 4

- Kontrolní varianta se suspenzí *Trichoderma pleurotum* fermentovaná po dobu 3 dní při teplotě 30°C a následnému zvýšení teploty na 50°C.
- Kontrolní varianta se suspenzí *Trichoderma pleurotum* bez fermentace, která pohledla kontaminaci.
- Varianta s *Bacillus subtilis* a se suspenzí *Trichoderma pleurotum* fermentovaná po dobu 3 dní při teplotě 30°C, ve které došlo ke 100% kontaminaci.

Pokus č. 5

- Ukázka vzájemné konkurence mycelia hlívy ústřičné a zelenatky (*Trichoderma pleurotum*) u varianty s *Bacillus subtilis* fermentovanou 3 dny při teplotě 30°C.
- Ukázka vzájemné konkurence mycelia hlívy ústřičné a zelenatky (*Trichoderma pleurotum*) u varianty s *Bacillus macerans* fermentovanou 3 dny při teplotě 30°C.

Pokus č. 6

- Kontrolní varianta se suspenzí zelenatky (*Trichoderma pleurotum*) fermentovaná 3 dny při teplotě 30°C a její postupná kontaminace sklenic.

Pokus č. 7

- Postupný ústup mycelia *Pleurotus ostreatus* na substrátu vytvořeném ze separátu z bioplynky.

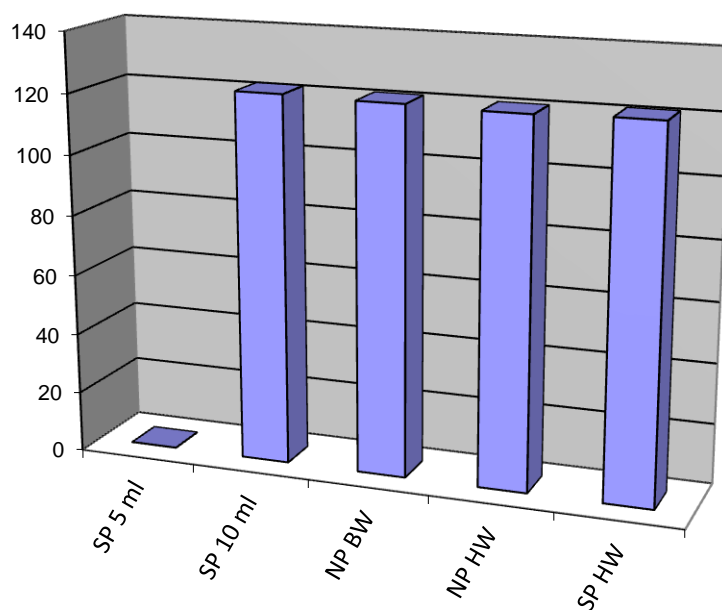
Pokus č. 8

- Varianta fermentovaných pasterizovaných pelet se suspensí *Trichoderma pleurotum* ošetřená 3. dny při teplotě 30°C a následné pasterizaci při teplotě 70°C po dobu 24 hodin
- Rozdíly v růstu mycelia u substrátu vytvořeném z nefermentovaných pasterizovaných pelet následně ošetřených pasterizací při teplotě 70°C po dobu 24 hodin

9.1 GRAFY A TABULKY

9.1.1 POKUS Č. 1

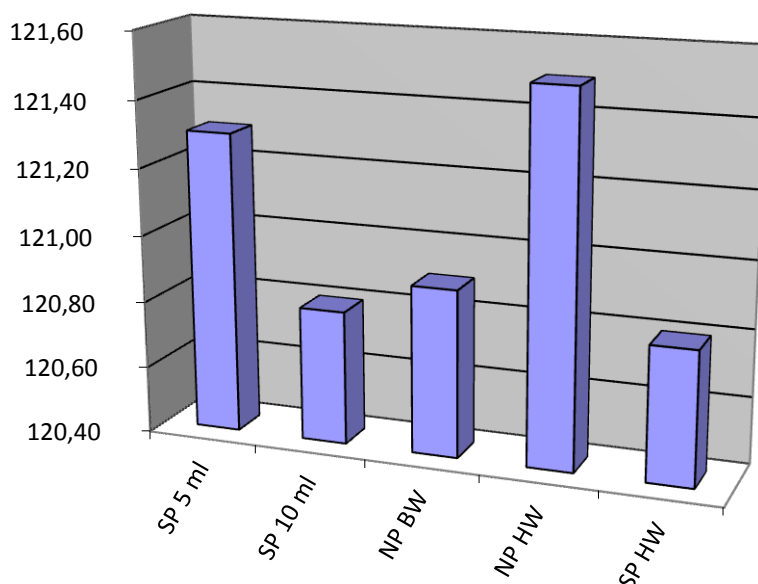
Dosažené přírůstky mycelia po 3. dnech fermentace:



Varianty	Měření v mm
SP 5 ml - Sterilizované pelety se suspenzí 5ml	-
SP 10 ml - Sterilizované pelety se suspenzí 10ml	122,00
NP BW - Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou	121,40
NP HW - Nesterilizované pelety s teplou vodou	120,80
SP HW - Sterilizované pelety s teplou vodou	121,50

Graf č. 1 znázorňuje výsledky dosažené po 3. dnech fermentace a následném naočkování vzniklého substrátu sadbou hlívy. U varianty sterilovaných pelet se suspenzí 5 ml došlo ke kontaminaci všech sklenic. U ostatních variant došlo ke srovnatelným výsledkům.

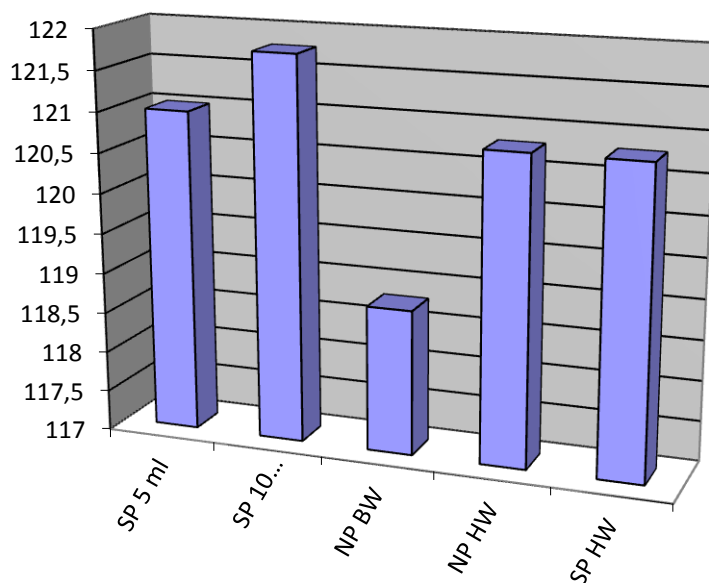
Dosažené přírůstky mycelia po 7. dnech fermentace:



Varianty	Měření v mm
SP 5 ml - Sterilizované pelety se suspenzí 5ml	121,30
SP 10 ml - Sterilizované pelety se suspenzí 10ml	120,80
NP BW - Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou	120,90
NP HW - Nesterilizované pelety s teplou vodou	121,50
SP HW - Sterilizované pelety s teplou vodou	120,80

Graf č. 2 znázorňuje přírůstky mycelia po 7. dnech fermentace a následnému naočkování povrchu substrátu sadbou hlívy. Nejlépe u tohoto pokusu prorůstalo mycelium hlívy variantou nesterilizovaných pelet s teplou vodou. Následně významné přírůstky mycelia hlívy měla varianta sterilizovaných pelet se suspenzí 5 ml. Ostatní varianty neprojevily významný růst mycelia.

Dosažené přírůstky mycelia po 10. dnech fermentace:

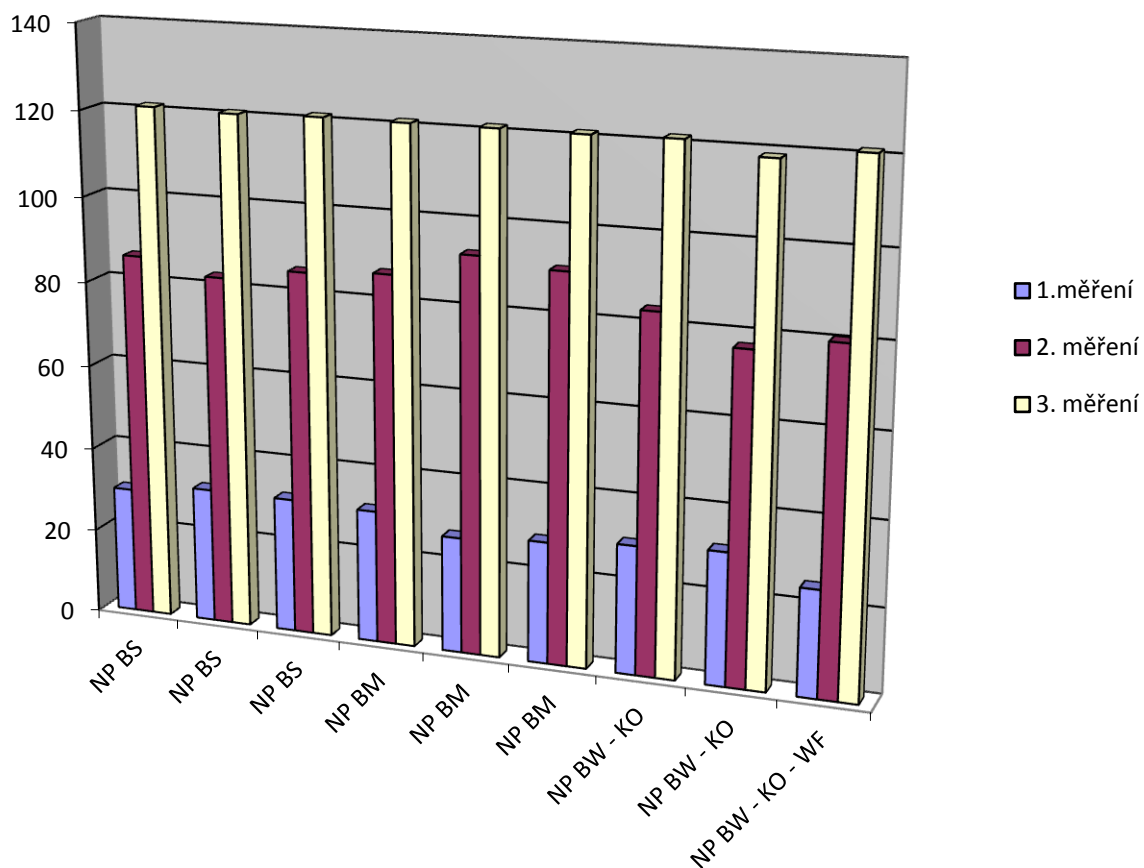


Varianty	Měření v mm
SP 5 ml - Sterilizované pelety se suspenzí 5ml	121,00
SP 10 ml - Sterilizované pelety se suspenzí 10ml	121,77
NP BW - Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou	118,80
NP HW - Nesterilizované pelety s teplou vodou	120,80
SP HW - Sterilizované pelety s teplou vodou	120,80

Graf č. 3 znázorňuje přírůstky mycelia po 10. dnech fermentace a následnému naočkování povrchu substrátu sadbou hlívy. Zde nejlépe prorůstalo mycelium hlívy substrátem vytvořeným ze sterilizovaných pelet se suspenzí 10 ml. Podobné výsledky prokazovala varianta sterilizovaných pelet. Jen o něco menší přírůstky měly varianty nesterilizovaných pelet s teplou vodou a sterilizovaných pelet s teplou vodou. Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou neprokazovaly významné přírůstky.

9.1.2 POKUS Č. 2

Dosažené přírůstky mycelia po 3. dnech fermentace:

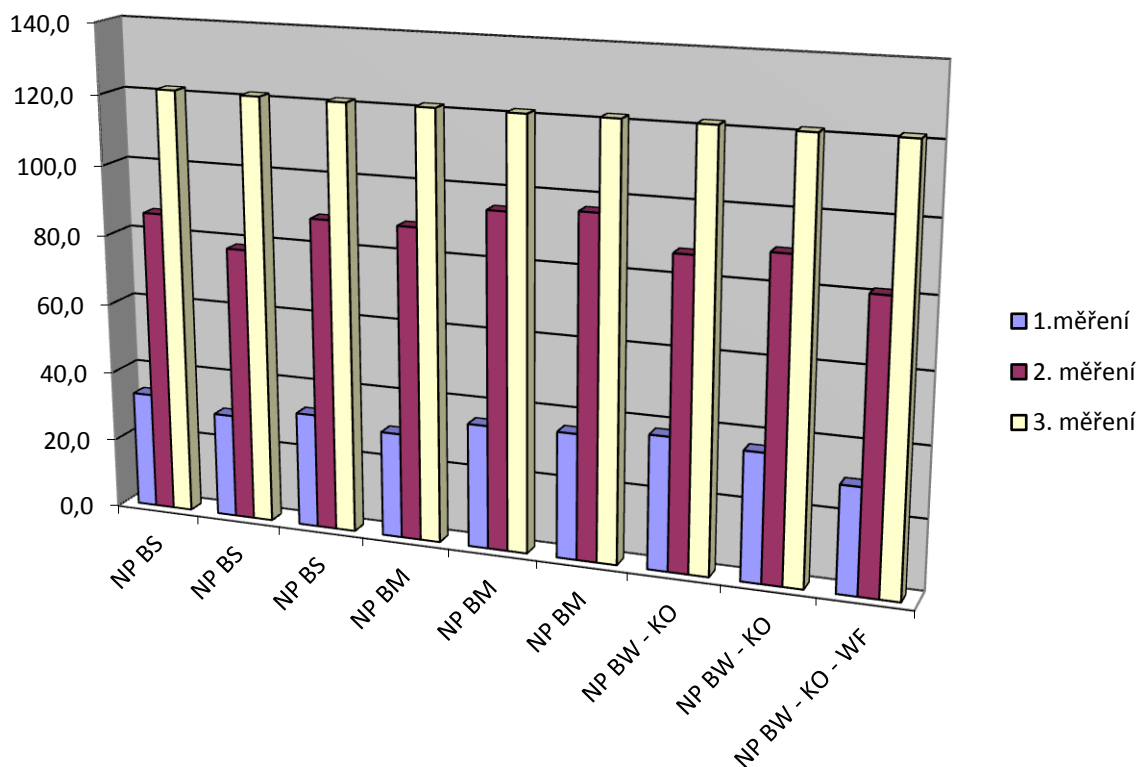


Varianty	1. měření mm	2. měření mm	3. měření mm
NP BS - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus subtilis</i>	29,8	86,3	121,2
NP BS - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus subtilis</i>	31,9	82,9	120,8
NP BS - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus subtilis</i>	31,8	85,8	121,3
NP BM - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus macerans</i>	31,3	87	121,25
NP BM - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus macerans</i>	27,3	92,9	121,33
NP BM - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus macerans</i>	28,7	91	121,25
NP BW - KO - Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola	30,3	83,8	121,58

NP BW - KO - Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola	31,3	77,3	118,8
NP BW - KO - WF - Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola bez fermentace	25,20	80,5	121,2

Graf č. 4 znázorňuje přírůstek mycelia hlívy po 3. dnech fermentace a následnému naočkování povrchu substrátu sadbou hlívy. U tohoto pokusu nejlépe při prvním měření nejlépe prorůstalo mycelium hlívy substrátem vytvořeným z nesterilizovaných pelet se suspenzí *Bacillus subtilis* a *Bacillus macerans*. U druhého měření výrazně lépe prorůstalo mycelium variantou nesterilizovaných pelet se suspenzí *Bacillus macerans*. Nejrychleji na dno sklenic dorostla varianta nesterilizovaných pelet spařených vroucí vodou - kontrola. Pokus byl ukončen.

Dosažené přírůstky mycelia po 5. dnech fermentace:

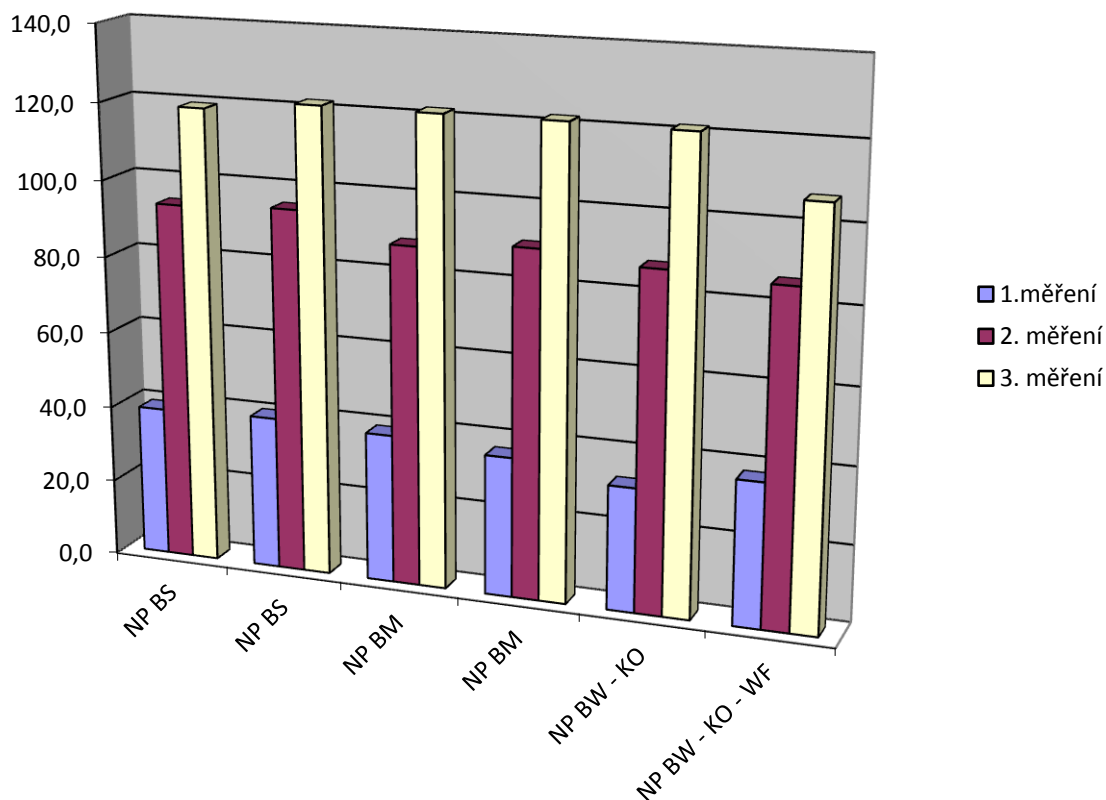


Varianty	1. měření mm	2. měření mm	3. měření mm
NP BS - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus subtilis</i>	33,2	86,5	121,7
NP BS - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus subtilis</i>	29,7	78,3	121,5
NP BS - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus subtilis</i>	32,7	88,8	121,4
NP BM - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus macerans</i>	30,0	88,8	121,5
NP BM - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus macerans</i>	35,2	95,1	121,5
NP BM - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus macerans</i>	35,8	96,7	121,8
NP BW - KO - Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola	37,9	87,6	121,8
NP BW - KO - Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola	36,4	90	121,5
NP BW - KO - WF - Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola bez fermentace	30,10	81,4	121,6

Graf č. 5 znázorňuje přírůstek mycelia hlívy po 5. dnech fermentace a následnému naočkování povrchu substrátu sadbou hlívy. U prvního měření výrazněji prorůstalo mycelium substrátem vytvořeným z nesterilizovaných pelety spařených vroucí vodou - kontrola. Druhé měření potvrdilo výsledky pokusu založeného po 3. dnech fermentace. Nejrychleji prorostlo mycelium až na dno u variant nesterilizovaných pelet se suspenzí *Bacillus macerans* a nesterilizovaných pelet spařených vroucí vodou - kontrola. Všeobecně u třetího měření byly výsledky dosti srovnatelné a všechny sklenice dorostly na dno sklenic.

9.1.3 POKUS Č. 3

Dosažené přírůstky mycelia po 3. dnech fermentace při 30°C:

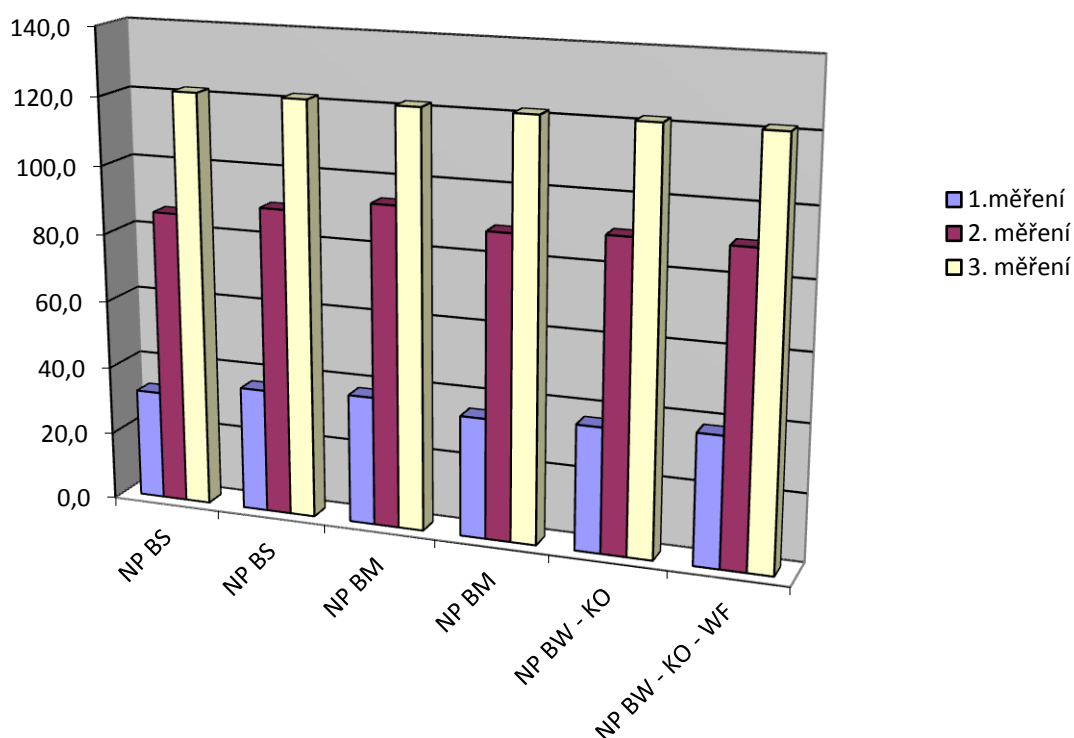


Varianty	1. měření mm	2. měření mm	3. měření mm
NS BS - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus subtilis</i>	39,2	93,9	119,2
NP BS - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus subtilis</i>	40,0	95,1	121,8
NP BM - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus macerans</i>	38,9	88,3	121,7
NP BM - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus macerans</i>	36,6	90,3	121,8
NP BW - KO - Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola	32,4	87,8	121,4
NP BW - KO - WF - Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola bez fermentace	37,6	86,4	106,9

Graf č. 6 znázorňuje přírůstky mycelia po 3. dnech fermentace při 30°C a následnému naočkování povrchu substrátu sadbou hlívy. U prvního a druhého měření nejrychleji

prorůstalo mycelium substrátem vytvořeným z nesterilizovaných pelet se suspenzí *Bacillus subtilis*. Ovšem nejrychleji na dno dorostla varianta nesterilizovaných pelet se suspenzí *Bacillus macerans*. Nejpomaleji však varianta nesterilizovaných pelet spařených vroucí vodou - kontrola bez fermentace.

Dosažené přírůstky mycelia po 5. dnech fermentace při 30°C a 24 hodin při 50°C:



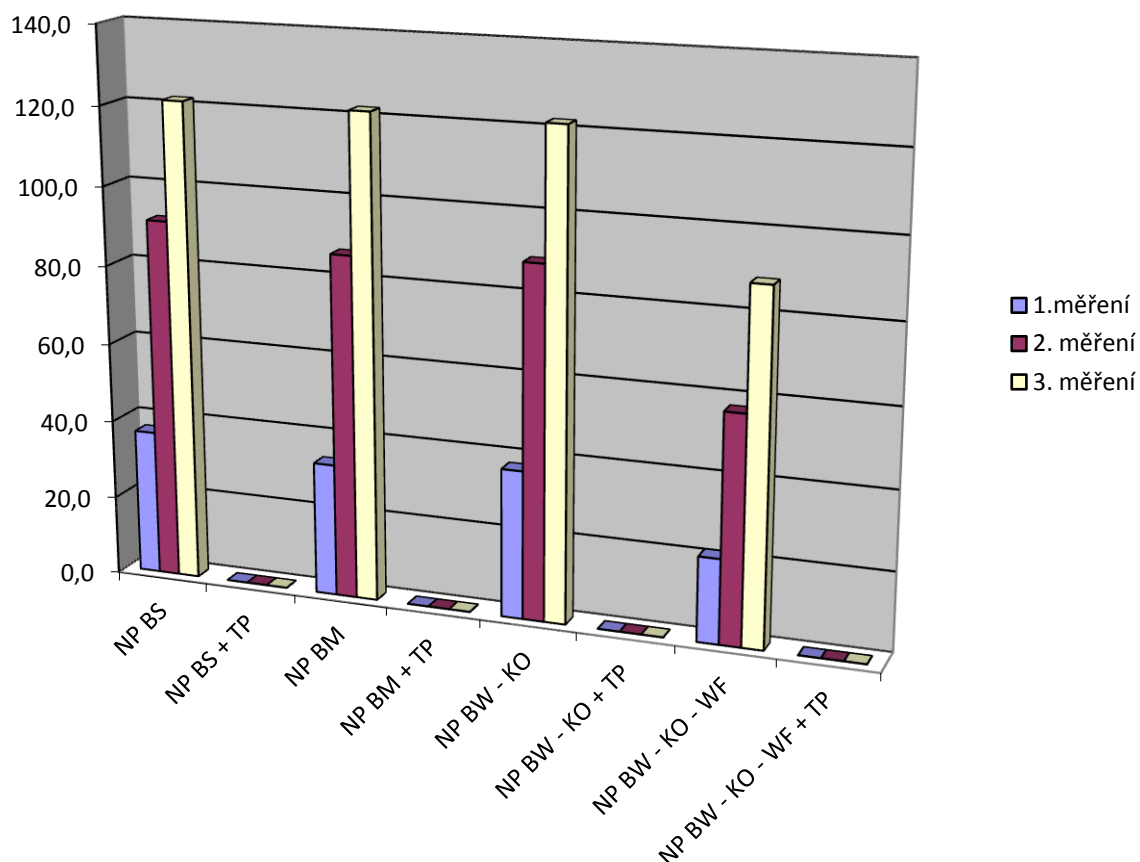
Varianty	1. měření mm	2. měření mm	3. měření mm
NS BS - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus subtilis</i>	32,1	86,4	121,8
NP BS - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus subtilis</i>	36,4	90,2	121,9
NP BM - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus macerans</i>	37,9	94	121,8
NP BM - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus macerans</i>	35,4	88,9	121,8
NP BW - KO - Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola	36,7	90,6	121,8

NP BW - KO - WF - Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola bez fermentace	38,2	90,5	121,6
---	------	------	-------

Graf č. 7 znázorňuje přírůstky mycelia po 5. dnech fermentace při 30°C a 24 hodin při 50°C a následnému naočkování povrchu substrátu sadbou hlívy. U tohoto pokusu výrazně nejrychleji prorostla varianta nesterilizovaných pelet se suspensí *Bacillus subtilis*. První měření prokázalo dosti porovnatelné výsledky, ale nejlépe prorůstalo mycelium substrátem z nesterilizovaných pelet se suspensí *Bacillus macerans*. Druhé měření ovládla varianta nesterilizovaných pelet se suspensí *Bacillus macerans*. A celkově nejlépe mycelium prorůstalo substrátem vytvořeným z nesterilizovaných pelet se suspensí *Bacillus macerans*.

9.1.4 POKUS Č. 4

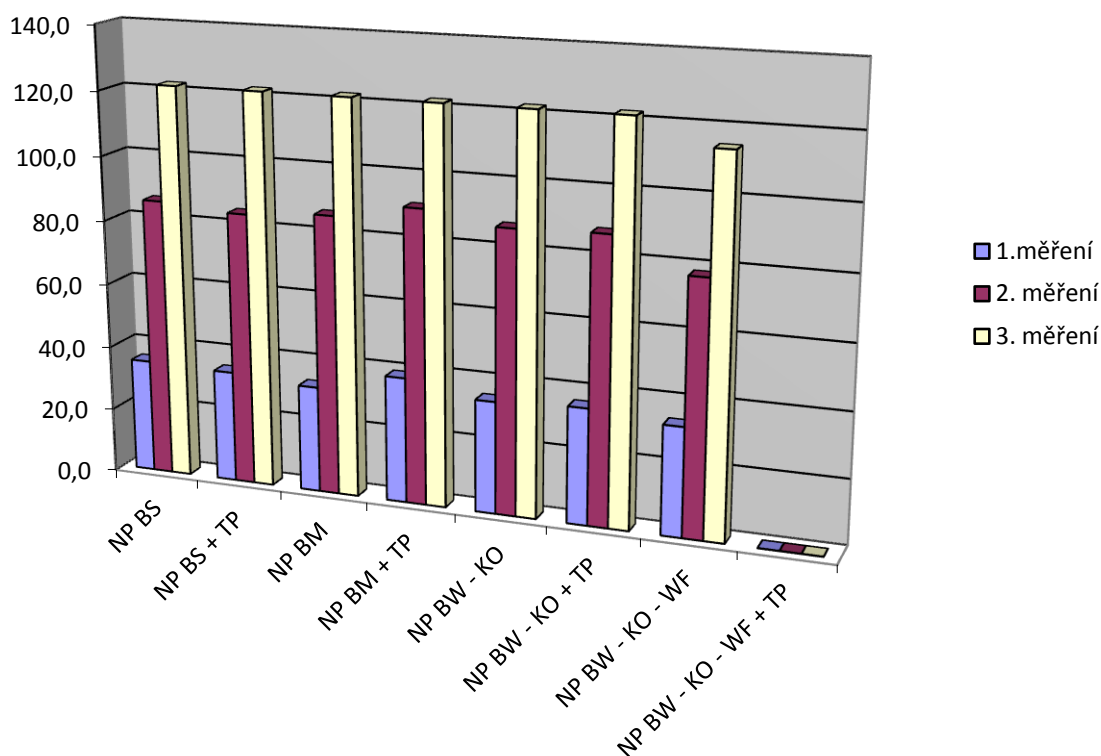
Dosažené přírůstky mycelia po 3. dnech fermentace při 30°C:



Varianty	1. měření mm	2. měření mm	3. měření mm
NP BS - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus subtilis</i>	36,8	91,5	121,6
NP BS + TP - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma pleurotum</i>	0,0	0,0	0,0
NP BM - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus macerans</i>	33,6	86,8	122
NP BM + TP - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus macerans</i> + <i>Trichoderma pleurotum</i>	0,0	0,0	0,0
NP BW - KO - Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola	37,5	88,8	122
NP BW - KO + TP - Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola + <i>Trichoderma pleurotum</i>	0,0	0,0	0,0
NP BW - KO - WF - Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola bez fermentace	21,4	57,4	88,3
NP BW - KO - WF + TP - Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola bez fermentace + <i>Trichoderma pleurotum</i>	0,0	0,0	0,0

Graf č. 8 znázorňuje přírůstky mycelia po 3. dnech fermentace při 30°C a následnému naočkování povrchu substrátu sadbou hlívy. U tohoto pokusu došlo ke kontaminaci všech variant obsahující *Trichoderma pleurotum*. U prvního měření prorůstalo mycelium nejrychleji substrátem vytvořeným z nesterilizovaných pelet spařených vroucí vodou - kontrola. U druhého měření nejlépe prorůstalo mycelium variantou nesterilizovaných pelet se suspenzí *Bacillus subtilis*. Nejhůře mycelium prorůstalo u varianty nesterilizovaných pelet spařených vroucí vodou - kontrola bez fermentace. Varianty se suspenzí *Bacillus subtilis* a *Bacillus macerans* dorostly na dno sklenic před třetím měřením. U tohoto pokusu se nejlépe projevila varianta nesterilizovaných pelet se suspenzí *Bacillus subtilis*.

Dosažené přírůstky mycelia po 5. dnech fermentace při 30°C a 24hodin při 50°C:



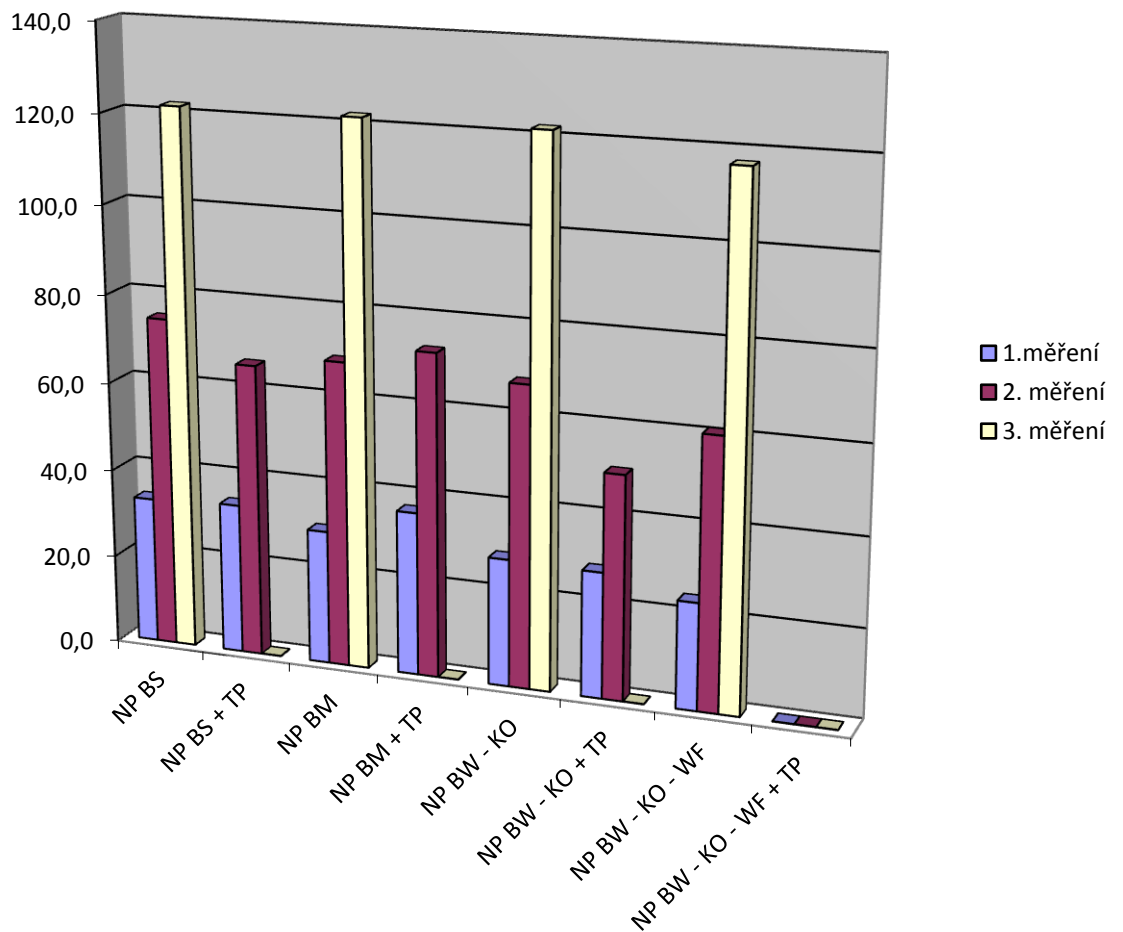
Varianty	1. měření mm	2. měření mm	3. měření mm
NP BS - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus subtilis</i>	35,2	86,4	122,0
NP BS + TP - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma pleurotum</i>	34,6	84,6	122,0
NP BM - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus macerans</i>	32,9	86,4	122,0
NP BM + TP - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus macerans</i> + <i>Trichoderma pleurotum</i>	38,9	90,8	122,0
NP BW - KO - Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola	34,7	87,2	122,0
NP BW - KO + TP - Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola + <i>Trichoderma pleurotum</i>	35,9	87,9	122,0
NP BW - KO - WF - Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola bez fermentace	33,6	77,9	114,4
NP BW - KO - WF + TP - Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola bez fermentace + <i>Trichoderma pleurotum</i>	0,0	0,0	0,0

Graf č. 9 znázorňuje přírůstky mycelia po 5. dnech fermentace při 30°C a 24hodin při 50°C a následnému naočkování povrchu substrátu sadbou hlívy. Zde jako nejúčinnější úprava

substrátu projevila v prvním a druhém měření varianta nesterilizovaných pelet se suspenzí *Bacillus macerans* + *Trichoderma pleurotum*. Všechny varianty kromě varianty nesterilizovaných pelet spařených vroucí vodou - kontrola bez fermentace v tomto pokusu dorostly až na dno sklenic. Došlo ke kontaminaci varianty nesterilizovaných pelet spařených vroucí vodou - kontrola bez fermentace + *Trichoderma pleurotum*.

9.1.5 POKUS Č. 5

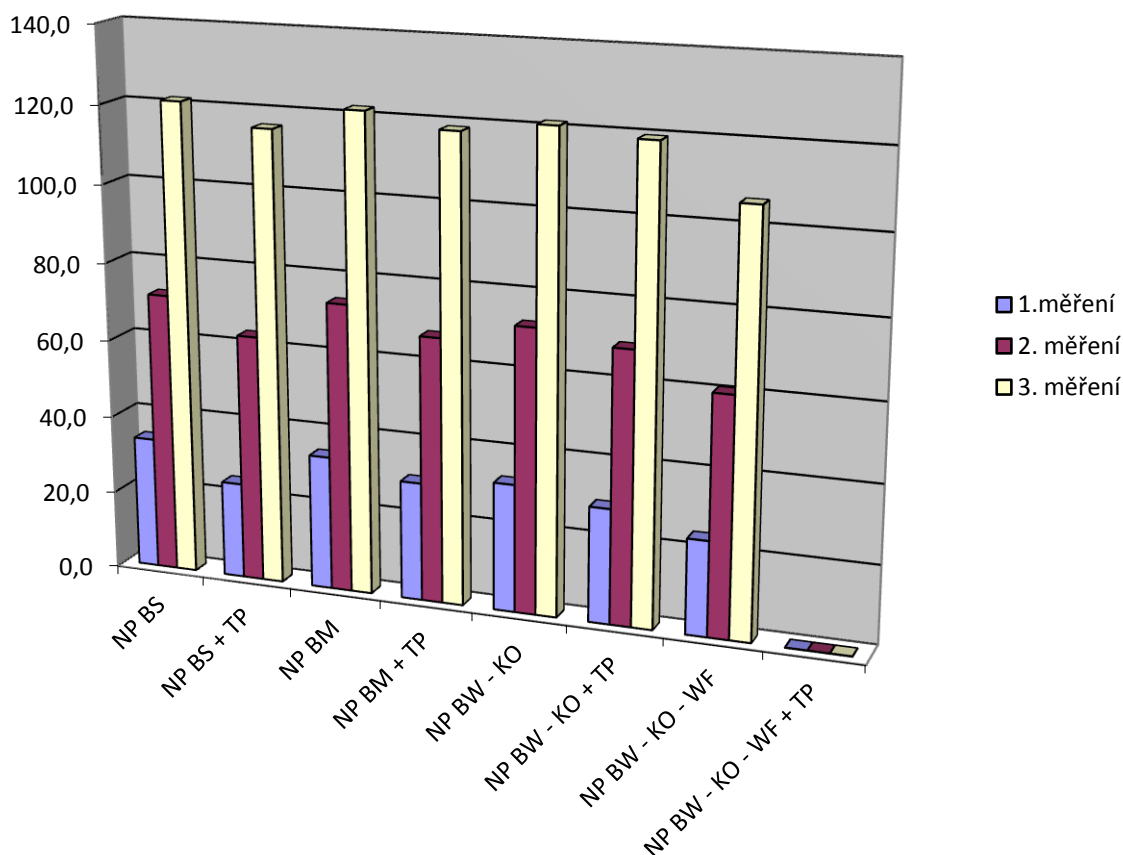
Dosažené přírůstky mycelia po 3. dnech fermentace při 30°C:



Varianty	1. měření mm	2. měření mm	3. měření mm	
NP BS - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus subtilis</i>	33,1	74,7	121,9	
NP BS + TP - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma pleurotum</i>	33,9	66,1	0,0	100% KONTA
NP BM - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus macerans</i>	30,2	68,8	122	
NP BM + TP - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus macerans</i> + <i>Trichoderma pleurotum</i>	36,8	72,8	0,0	100% KONTA
NP BW - KO - Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola	28,7	67,8	121,9	
NP BW - KO + TP - Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola + <i>Trichoderma pleurotum</i>	28,3	50,3	0,0	100% KONTA
NP BW - KO - WF - Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola bez fermentace	24,1	60,9	117,2	
NP BW - KO - WF + TP - Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola bez fermentace + <i>Trichoderma pleurotum</i>	0,0	0,0	0,0	100% KONTA

Graf č. 10 znázorňuje přírůstky mycelia po 3. dnech fermentace při 30°C a následnému naočkování povrchu substrátu sadbou hlívy. U tohoto pokusu stejně jako u předchozího ošetřeného fermentací 30°C došlo ke kontaminaci varianty nesterilizovaných pelet spařených vroucí vodou - kontrola bez fermentace + *Trichoderma pleurotum*. U variant se suspenzí *Bacillus subtilis*, *Bacillus macerans*, pelet spařených vroucí vodou - kontrola bez fermentace s *Trichoderma pleurotum* nejdříve vypadalo, že tyto varianty budou v pořádku a mycelium v pořádku proroste, ale později cca. do 14 dní se projevila kontaminace a mycelium hlívy podlehl zelené plísni. U ostatních variant úpravy substrátu nejlépe prorůstalo mycelium variantou nesterilizovaných pelet se suspenzí *Bacillus subtilis*. Nejhůře se projevila varianta nesterilizovaných pelet spařených vroucí vodou - kontrola bez fermentace.

Dosažené přírůstky mycelia po 5. dnech fermentace při 30°C a 24 hodin při 50°C:

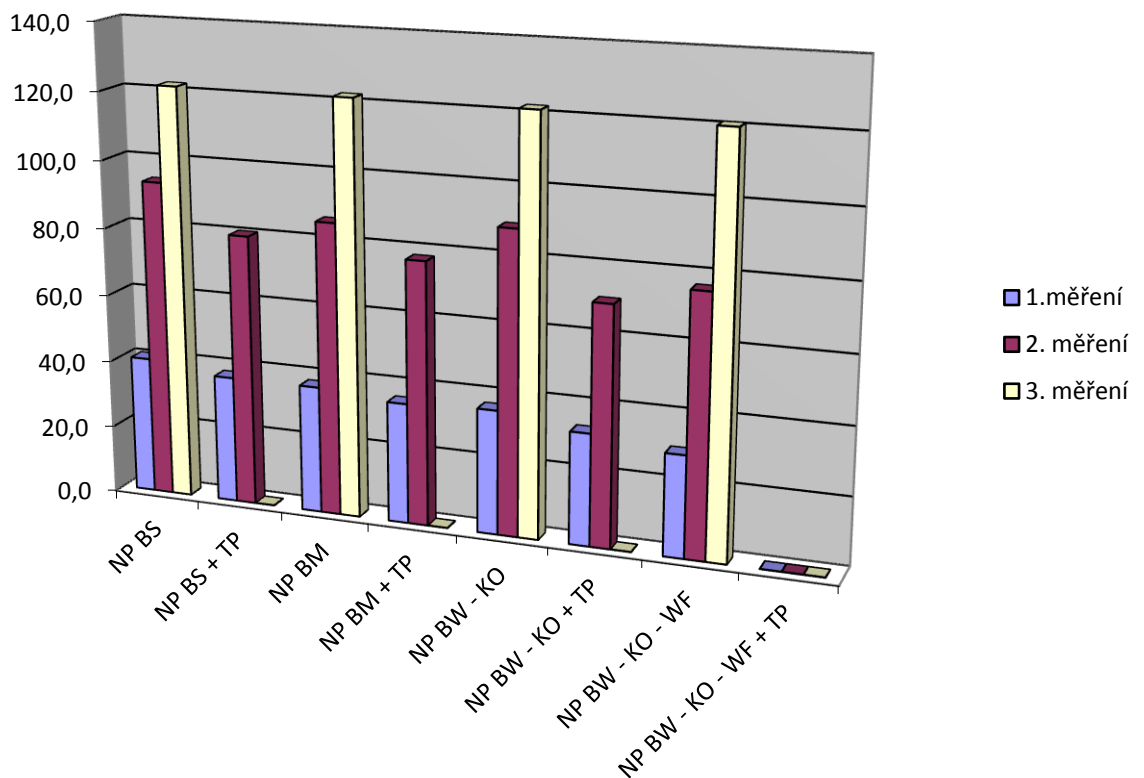


Varianty	1. měření mm	2. měření mm	3. měření mm
NP BS - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus subtilis</i>	33,8	71,9	121,3
NP BS + TP - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma pleurotum</i>	24,6	63,4	116,0
NP BM - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus macerans</i>	34,3	73,9	121,9
NP BM + TP - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus macerans</i> + <i>Trichoderma pleurotum</i>	30,3	67,7	118,5
NP BW - KO - Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola	32,7	72,5	121,3
NP BW - KO + TP - Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola + <i>Trichoderma pleurotum</i>	29,4	69,4	119,4
NP BW - KO - WF - Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola bez fermentace	24,3	60,8	106,2
NP BW - KO - WF + TP - Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola bez fermentace + <i>Trichoderma pleurotum</i>	0,0	0,0	0,0

Graf č. 11 znázorňuje přírůstky mycelia po 5. dnech fermentace při 30°C a 24 hodin při 50°C a následnému naočkování povrchu substrátu sadbou hlívy. Stejně jako u předchozího došlo ke kontaminaci nesterilizovaných pelet spařených vroucí vodou - kontrola bez fermentace + *Trichoderma pleurotum* již od počátku pokusu. U prvního měření se nejlépe projevila varianta nesterilizovaných pelet se suspenzí *Bacillus subtilis*. Ostatní varianty prorůstaly odlišně intenzivně. U druhého měření byla varianta nesterilizovaných pelet se suspenzí *Bacillus macerans* dominantnější a také mycelium touto variantou prorostlo nejrychleji až na dno sklenic.

9.1.6 POKUS Č. 6

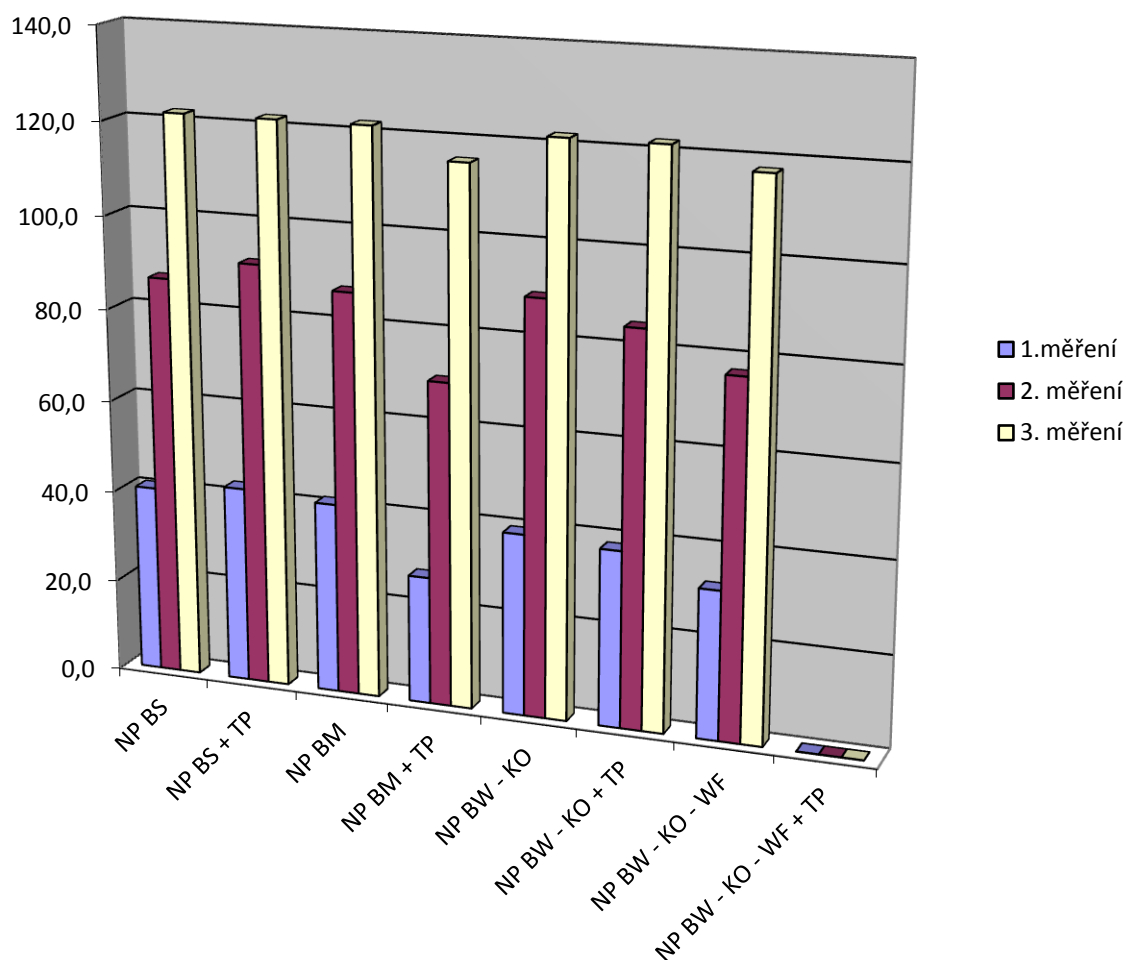
Dosažené přírůstky mycelia po 3. dnech fermentace při 30°C:



Varianty	1. měření mm	2. měření mm	3. měření mm	
NP BS - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus subtilis</i>	40,6	93,8	122,0	
NP BS + TP - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma pleurotum</i>	37,6	80,2	0,0	100% KONTA
NP BM - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus macerans</i>	37,6	86,3	122,0	
NP BM + TP - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus macerans</i> + <i>Trichoderma pleurotum</i>	35,6	77,6	0,0	100% KONTA
NP BW - KO - Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola	36,6	89,0	122,0	
NP BW - KO + TP - Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola + <i>Trichoderma pleurotum</i>	33,0	70,4	0,0	100% KONTA
NP BW - KO - WF - Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola bez fermentace	29,9	76,3	120,8	
NP BW - KO - WF + TP - Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola bez fermentace + <i>Trichoderma pleurotum</i>	0,0	0,0	0,0	100% KONTA

Graf č. 12 znázorňuje přírůstky mycelia po 3. dnech fermentace při 30°C a následném naočkování povrchu substrátu sadbou hlívy. U tohoto pokusu se nejlépe projevila varianta nesterilizovaných pelet se suspenzí *Bacillus subtilis*. Touto variantou mycelium prorůstalo nejrychleji a projevilo se jako ideální v tomto pokusu. Nejhůře se projevila varianta ošetření substrátu z nesterilizovaných pelet spařených vroucí vodou - kontrola bez fermentace. Došlo ke kontaminaci u všech variant s přidavkem *Trichoderma pleurotum*.

Dosažené přírůstky mycelia po 5. dnech fermentace při 30°C a 24 hodin při 45°C:



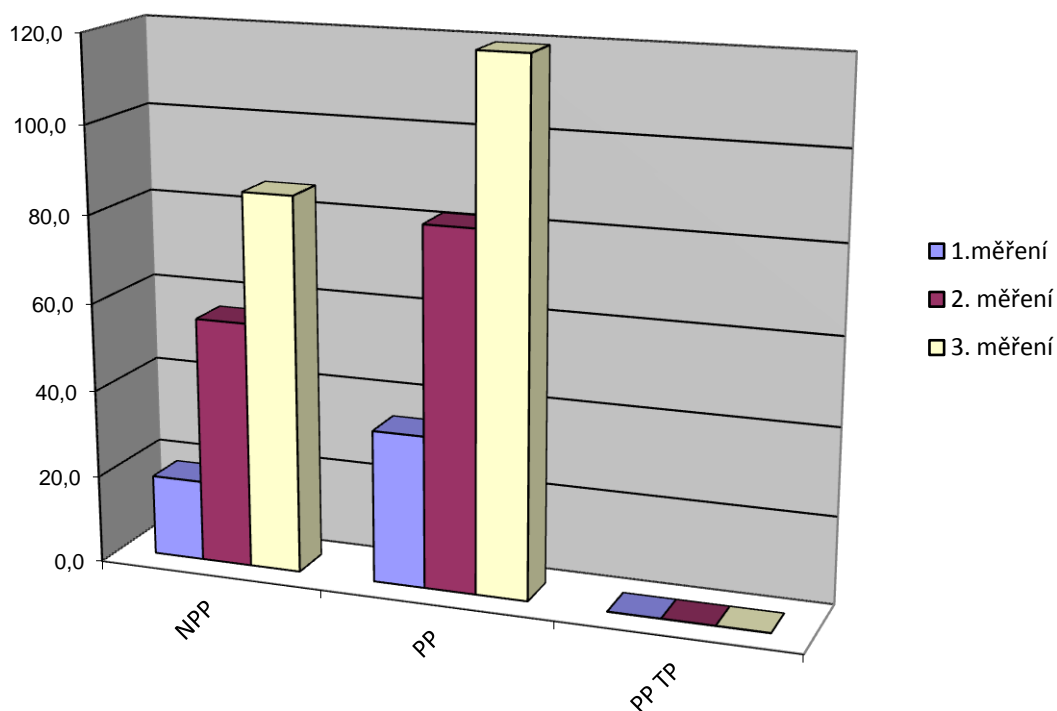
Varianty	1. měření mm	2. měření mm	3. měření mm	
NP BS - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus subtilis</i>	40,6	86,8	122,0	
NP BS + TP - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma pleurotum</i>	42,6	91,4	122,0	
NP BM - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus macerans</i>	41,3	87,2	122,0	
NP BM + TP - Nesterilizované pelety se suspenzí <i>Bacillus macerans</i> + <i>Trichoderma pleurotum</i>	27,6	70,0	115,8	
NP BW - KO - Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola	39,4	89,3	122,0	
NP BW - KO + TP - Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola + <i>Trichoderma pleurotum</i>	38,2	84,9	122,0	

NP BW - KO - WF - Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola bez fermentace	32,2	76,9	117,7	
NP BW - KO - WF + TP - Nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola bez fermentace + <i>Trichoderma pleurotum</i>	0,0	0,0	0,0	100% KONTA

Graf č. 13 znázorňuje přírůstky mycelia po 5. dnech fermentace při 30°C a 24 hodin při 45°C a následnému naočkování povrchu substrátu sadbou hlívy. U prvního a druhého měření se nejlépe projevila úprava substrátu u varianty nesterilizovaných pelet se suspenzí *Bacillus subtilis* + *Trichoderma pleurotum* zatímco nejhůře mycelium prorůstalo substrátem z nesterilizovaných pelet se suspenzí *Bacillus macerans* + *Trichoderma pleurotum*. Varianty se suspenzí *Bacillus subtilis*, *Bacillus macerans*, nesterilizované pelety spařené vroucí vodou - kontrola, dorostlo mycelium na dno sklenic bez problémů. Na rozdíl od varianty nesterilizovaných pelet spařených vroucí vodou - kontrola bez fermentace, u které mycelium nedorostlo na dno sklenice.

9.1.7 POKUS Č. 8

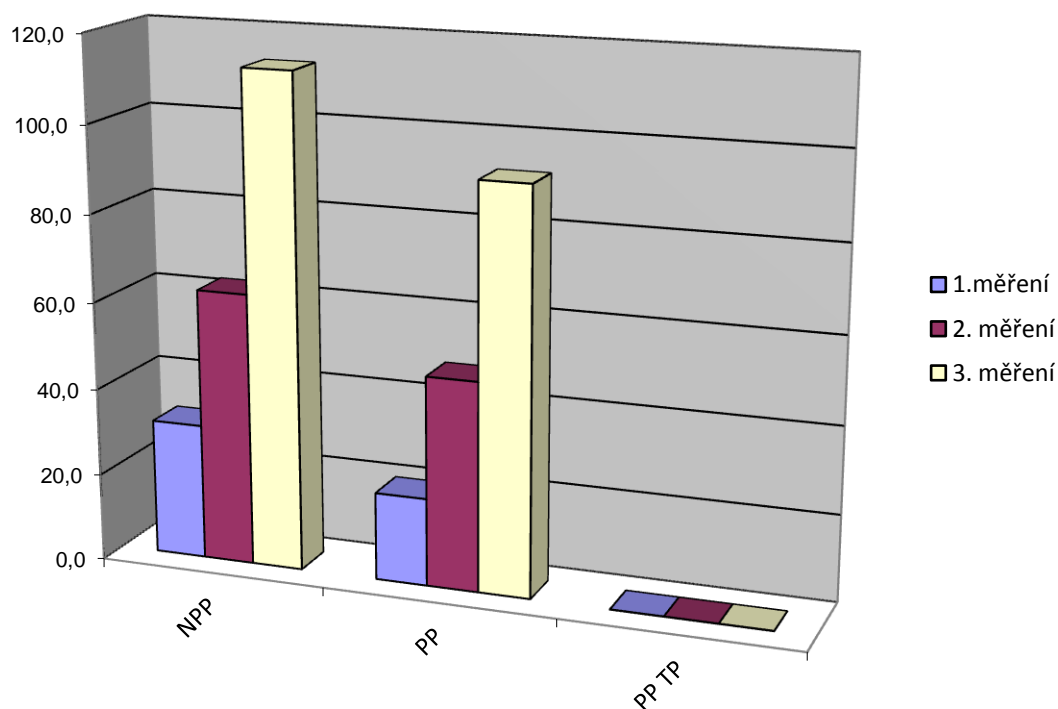
Dosažené přírůstky mycelia po 3. dnech fermentace při 30°C a 48 hodinách při 50°C:



Varianty	1. měření	2. měření	3. měření	
NPP - Nefermentované pasterizované pelety	18,4	56,3	85,8	
PP - Pasterizované pelety	34,8	81,8	119,4	
PP TP - Pasterizované pelety se suspensí <i>Trichoderma pleurotum</i>	0,0	0,0	0,0	100% KONTA

Graf č. 14 znázorňuje přírůstky mycelia po 3. dnech fermentace při 30°C a 48 hodinách při 50°C a následném naočkování povrchu substrátu sadbou hlívy. U tohoto pokusu v prvním a druhém měření došlo k jasné převaze ošetření substrátu variantou pasterizovaných pelet oproti variantě nefermentovaných pasterizovaných pelet. U varianty pasterizovaných pelet se suspensí *Trichoderma pleurotum* došlo ke kontaminaci již na začátku pokusu. Tento pokus jednoznačně zvolil jako nejvhodnější variantu pasterizované pelety.

Dosažené přírůstky mycelia po 3. dnech fermentace při 30°C a 24 hodinách při 70°C:



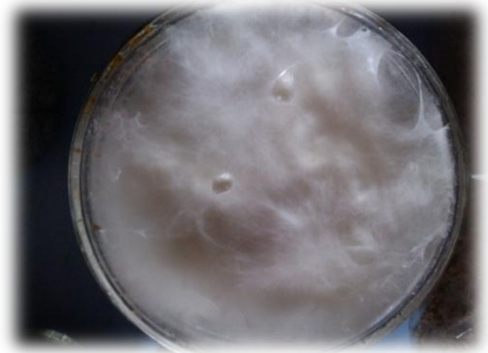
Varianty	1. měření	2. měření	3. měření
NPP - Nefermentované pasterizované pelety	31,1	62,6	112,9
PP - Pasterizované pelety	20,1	48,0	92,1
PP TP - Pasterizované pelety se suspenzí <i>Trichoderma pleurotum</i>	0,0	0,0	0,0

Graf č. 15 znázorňuje přírůstky mycelia po 3. dnech fermentace při 30°C a 24 hodinách při 70°C a následnému naočkování povrchu substrátu sadbou hlívy. Zde došlo k úplně opačným výsledkům než u předchozího pokusu s teplotou ošetření 50°C po dobu 48 hodin. Zde došlo k jednoznačné převaze nefermentovaných pasterizovaných pelet u prvního i druhého měření. U varianty pasterizovaných pelet se suspenzí *Trichoderma pleurotum* došlo ke kontaminaci.

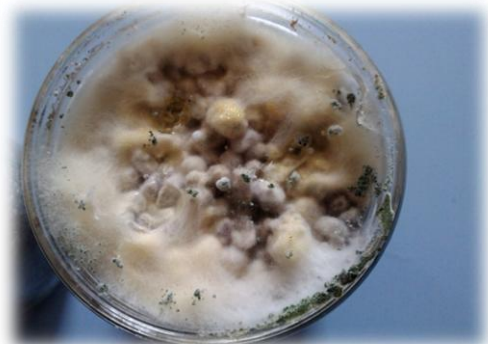
U tohoto pokusu je z výsledků jasně patrné, že zvolení způsobu teplotního ošetření substrátu pro hlívu je velmi důležité. Je potřeba důkladně zvážit použitou teplotu fermentace a pasterizace, protože při využití vysokých teplot dochází k omezení, tak i potlačení jak prospěšných, tak i konkurenčních organismů. Není prospěšné zbytečně používat vyšší teploty v dojmu, že tato teplota stoprocentně zlikviduje veškeré škodlivé organismy, ale je důležité brát ohled i prospěšné mikroorganismy, které se touto vysokou teplotou zlikvidují.

9.2 FOTODOKUMENTACE

POKUS Č. 1



Prorůstání substrátu myceliem hlívy ústříčné u varianty se suspenzí 10 ml přípravku Ema Super Comp.



Kontaminace fermentovaného substrátu ošetřeného suspenzí 5 ml přípravku Ema Super Comp.

POKUS Č. 2



Prorostlý substrát ošetřený inokulem *Bacillus subtilis*.



Prorostlý substrát ošetřený inokulem *Bacillus macerans*.



Prorostlý fermentovaný substrát kontrolní varianty.

POKUS Č. 3



Substrát fermentovaný 3 dny při teplotě 30°C ošetřený suspenzí *Bacillus subtilis*.



Porovnání varianty substrátu ošetřeným suspenzí *Bacillus subtilis* fermentovaného po dobu 3 dní při teplotě 30°C a následnému zvýšení teploty na 50°C.

POKUS Č 4.



Kontrolní varianta se suspenzí *Trichoderma pleurotum* fermentovaná po dobu 3 dní při teplotě 30°C a následnému zvýšení teploty na 50°C.



Kontrolní varianta se suspenzí *Trichoderma pleurotum* bez fermentace, která pohledla kontaminaci.



Varianta s *Bacillus subtilis* a se suspensí *Trichoderma pleurotum* fermentovaná po dobu 3 dní při teplotě 30°C, ve které došlo ke 100% kontaminaci.

POKUS Č. 5



Ukázka vzájemné konkurence mycelia hlívy ústříčné a zelenatky (*Trichoderma pleurotum*) u varianty s *Bacillus subtilis* fermentovanou 3 dny při teplotě 30°C.



Ukázka vzájemné konkurence mycelia hlívy ústříčné a zelenatky (*Trichoderma pleurotum*) u varianty s *Bacillus macerans* fermentovanou 3 dny při teplotě 30°C.

POKUS Č. 6



Kontrolní varianta se suspenzí zelenatky (*Trichoderma pleurotum*) fermentovaná 3 dny při teplotě 30°C a její postupná kontaminace sklenic.

POKUS Č. 7



Postupný ústup mycelia *Pleurotus ostreatus* na substrátu vytvořeném ze separátu z bioplynky.

POKUS Č. 8



Varianta fermentovaných pasterizovaných pelet se suspensí *Trichoderma pleurotum* ošetřená 3. dny při teplotě 30°C a následné pasterizaci při teplotě 70°C po dobu 24 hodin, kde došlo ke kontaminaci hned na počátku pokusu.



Viditelné rozdíly v růstu mycelia u substrátu vytvořeném z nefermentovaných pasterizovaných pelet následně ošetřených pasterizací při teplotě 70°C po dobu 24 hodin.