



IVAN JABLONSKÝ, DAVID NOVOTNÝ
A RUDOLF RYZNER

**VYUŽITÍ ANTAGONISTICKÝCH
MIKROORGANISMŮ PRO OCHRANU KULTURY
HLÍVY PŘED VLÁKNITOU HOUBOU
TRICHODERMA PLEUROTII**

METODIKA PRO PRAXI



Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

2016

Metodika vznikla za finanční podpory Technologické agentury České republiky a je výstupem projektu číslo TA03020356: *Vývoj substrátu pro pěstování hlívy s ohledem na ochranu před škodlivými houbami z rodu Trichoderma*.

Metodika je určena pro praxi. O uplatnění metodiky byla 15. 12. 2016 podle ustanovení § 269 zákona 513/1991 Sb., obchodního zákoníku uzavřena smlouva s firmou Blatnička s.r.o.

Oponenti: Doc. Ing. Martin Koudela Ph.D., Česká zemědělská univerzita v Brně, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Praha

Ing. Michaela Budňáková, Ministerstvo zemědělství ČR, Odbor rostlinných komodit, Oddělení polních plodin

Metodika byla schválena Ministerstvem zemědělství ČR – odborem rostlinných komodit pod č.j. 73432/2016-MZE-17221.

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2016
ISBN 978-80-7427-228-8

OBSAH	
Obsah	3
Souhrn	4
I) Cíl metodiky	4
II) Vlastní popis metodiky	4
Vývoj technologie výroby substrátu pro hlívu	5
Organismy poškozující kultury hlívy	5
<i>Trichoderma pleuroti</i> S.H. Yu & M.S. Park (2006)	6
Rozdíl růstu <i>Trichoderma pleuroti</i> na sterilním a pasterizovaném substrátu	8
Charakteristika zařízení pro výrobu pěstebního substrátu a pěstování hlívy ústříčné v různých objemech	9
Propařovací komora na menší objemy pěstebního substrátu	9
Propařovací tunel na velké objemy	9
Postup identifikace přítomnosti <i>Trichoderma pleuroti</i> v pěstírně	11
Uchovávání a příprava kultur bakterií pro aplikaci v laboratorních podmínkách a do substrátů	11
Příprava konzerv založená na bázi směsi pufr Tris + glycerol + voda	12
Hodnocení vztahu bakterií a hub	14
Vliv kvality substrátu na prorůstání hlívy	15
Vliv fermentace a teplotního ošetření pěstební substrátu na růst mycelia <i>Pleurotus ostreatus</i> při riziku poškození kultury druhem <i>Trichoderma pleuroti</i>	15
Aplikace výsledků laboratorních pokusů v praktickém provozu	16
Výběr lignocelulózových materiálů pro výrobu substrátů pro pěstování hlívy odolných vůči <i>Trichoderma pleuroti</i>	17
Mechanická úprava a zvlhčování slámy, míchání přísad	19
Fermentace na venkovní hromadě	19
Fermentace a propařování v propařovacím tunelu	20
Závěr	24
III) Srovnání „novosti postupů“	24
IV) Popis uplatnění metodiky	25
V) Ekonomické aspekty	25
VI) Seznam použité literatury	27
VII) Seznam publikací, které předcházely metodice	27

Využití antagonistických mikroorganismů pro ochranu kultury hlívy před vláknitou houbou *Trichoderma pleuroti*

Souhrn

Při přípravě substrátu pro hlívu ústřičnou (*Pleurotus ostreatus*) ze slámy silně infikované houbou *Trichoderma pleuroti* se osvědčila kombinace aerobní fermentace při 30 °C po dobu 3 dnů s následným teplotním ošetřením při teplotě 70 °C po dobu 24 hodin. Nejrychlejšího růstu dosahovalo mycelium hlívy v kombinaci fermentace při 30 °C po dobu 3 dnů a teplotního ošetření při 60 °C v případě, že se jednalo o slámu neinfikovanou.

Summary

At the preparation of the substrate for the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on heavily infected straw by green-mould *Trichoderma pleuroti* was proven a combination of aerobic fermentation at 30 °C for 3 days followed by subsequent pasteurisation at 70 °C for 24 hours. The fastest growth mycelium *Pleurotus ostreatus* was achieved at combined fermentation at 30 °C for 3 days followed the heat treatment at 60 °C in case of uninfected straw.

I) CÍL METODIKY

Cílem metodiky je poskytnout výrobcům substrátu a pěstitelům hlívy ústřičné základní informace o nových postupech přípravy substrátu spočívající ve výběru vhodné suroviny, přípravě této suroviny, a jejím teplotním ošetření a upozornit na možná rizika související s výskytem nové konkurenční houby *Trichoderma pleuroti*. Metodika doporučuje opatření, která pomohou předcházet a bránit jejímu rozvoji této konkurenční houby.

II) VLASTNÍ POPIS METODIKY

Úvod

Pěstování hlívy ústřičné při současném výskytu konkurenční houby *Trichoderma pleuroti* není jednoduchým výrobním procesem a dosažení žádaného výsledku vyžaduje komplexní řešení, což zahrnuje včasnou detekci *Trichoderma pleuroti*, vhodné technické zařízení a správné pracovní postupy.

Vývoj technologie výroby substrátu pro pěstování hlívy

Na slámovém substrátu se hlíva začala pěstovat v 60. letech minulého století. Nadrcená sláma se namočila, doplnila vápenatou složkou (mletý vápenec, případně sádra) a následně se podrobila teplotnímu procesu. Na teplotním ošetření spočíval úspěch pěstování. Zpočátku se při pěstování v menším množství sláma máčela v horké vodě ve velkých sudech či jímkách, případně se do nádob pouštěla pára.

Velkovýrobní postup přípravy vycházel z toho, že se namočená sláma plnila do takzvaného tunelu, ve kterém se buď propařovala nebo se podrobila fermentaci. V tunelu sláma ležela na roštu, kterým procházel vzduch s přídavkem páry. Propařování spočívalo v postupném zvyšování teploty na 60 - 70 °C, po 12 - 24 hodinách se zastavil přívod páry a teplota se nechala přirozeně klesat. Pro urychlení procesu teplotního ošetření slámy a zvýšení spolehlivosti přípravy substrátu zkoušeli maďarští autoři takzvanou xerothermickou metodu, kdy tunel plnili suchou slámou a tu pak intenzivně provětrávali s přídavkem suché páry tak dlouho až teplota slámy dosáhla teploty 95 - 98 °C. Po několika hodinách působení zvýšené teploty byl substrát doplněn vodou a osázen sadbou. S ohledem na vzniklá rizika spočívající v přežívání konkurenčních plísní při tomto procesu se do vody přidával fungicid Fundazol. Metoda se příliš neosvědčila a navíc hrozilo reálné nebezpečí hromadění fungicidu v plodnicích hlívy. Místo toho se v některých výrobních substrátu používají při jeho výrobě rotační bubnová zařízení, ve kterých se namočená sláma propařuje a po skončení procesu se substrát zchladí a osází.

Porovnávání různých postupů přípravy substrátu vedlo k závěru, že pokud se substrát zahřeje po dobu několika hodin na teplotu 90 - 100°C, zničí se bezpečně spory hub, ale naruší se rovnováha mikroorganismů a to především některých skupin bakterií a substrát se tak vystaví snadné infekci tzv. zelenými plísněmi. Proto se xerothermická metoda využívající teplotu 90 - 100°C nedoporučuje, proti této metodě navíc hovoří i nutnost preventivního použití dnes zakázaných fungicidů. Někteří autoři (Kurtzman 2006) doporučují ošetřovat substrát teplotou 60 °C, aby se vyššími teplotami nepoškozovala populace příznivých mikroorganismů.

Organismy poškozující kultury hlívy

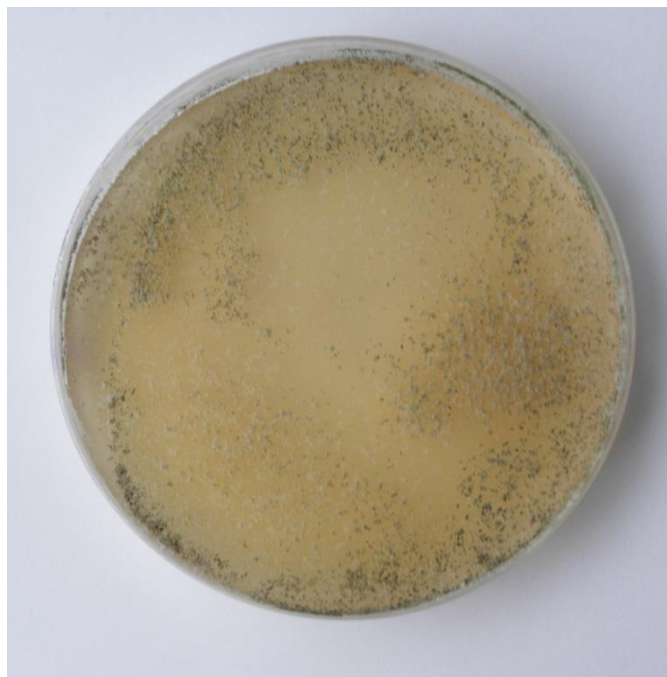
Kulturu hlívy ústříčné a hlívy plicní při pěstování poškozují nejen bezobratlí, ale i bakterie a jiné druhy hub. Zatímco kultury *Agaricus bisporus* poškozují jak parazitické houby, z nichž nejvýznamnější jsou druhy *Verticillium fungicola* a *Mycogone perniciosa*, tak kompetitivní druhy, z nichž nejdůležitějším je *Trichoderma aggressivum*, v případě *Pleurotus ostreatus* a *P. pulmonarius* způsobuje největší ztráty, nejen v Evropě i ale v jiných částech světa,

působení druhů z rodu *Trichoderma*, pěstители označované jako zelené plísňe, a to především druhy *T. pleuroti* a *T. pleuroticola*. V pěstírnách hlívy v České republice je, jak ukázal výzkum autorů této metodiky, tímto škodlivým taxonem dosud pouze druh *T. pleuroti*, který způsobuje pokles výnosu v průměru o 50-100%. Ukázalo se, že stávající teplotní ošetření prováděné v obvyklém teplotním režimu 60 - 70 °C není dostatečné.

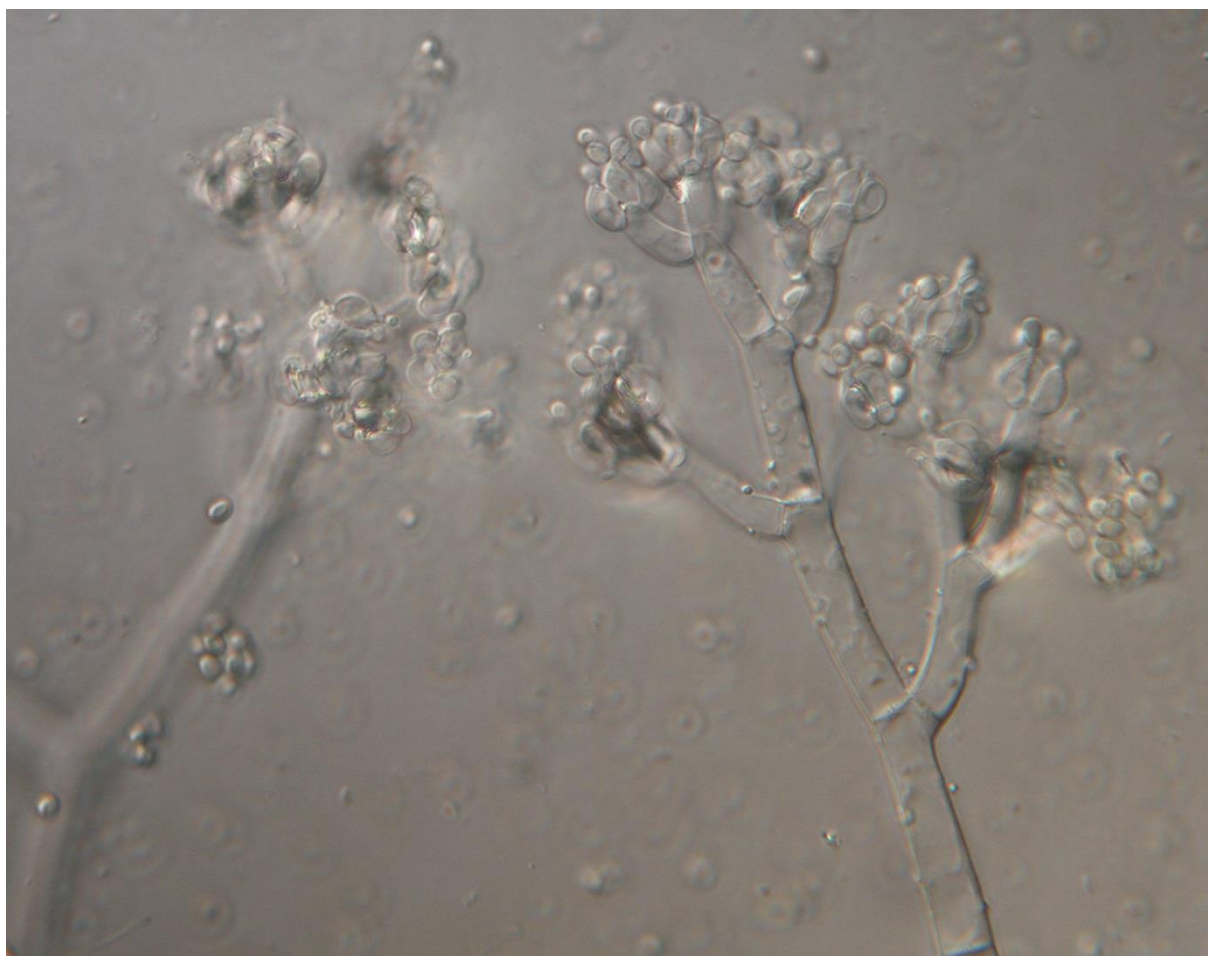
***Trichoderma pleuroti* S.H. Yu & M.S. Park (2006)**

Kolonie na PDA (bramborovo-dextrózovém agaru) jsou bílé, později zelenkavé, při teplotě 25 °C po 3 dnech 35-60 mm velké, tvořené vzdušným myceliem. Tvorba konidií je řídká a práškovitá. Konidie jsou zelenavě bílé nebo šedozelené, později tmavnou. Konidiofory jednoduše větvené, primární větve jsou často v pravém úhlu ke konidioforu, vrcholky konidioforů a primárních větví jsou obvykle podobné rodu *Gliocladium* a jsou složeny ze 2 - 4 větví uspořádaných terminálně v přeslenech. Fialidy jsou většinou úzce až široce lahvicovité, většinou v nahloučených přeslenech po 4 - 7 o velikosti je 4,2 - 7 x 2,0 - 4,0 µm. Konidie elipsoidní až obvejčité, 2,8 - 4,2 x 1,6 - 2,2 µm (průměr 3,4 x 2,0 µm), hladké, světle zelené (Park et al. 2006, Samuels et Hebbbar 2015). Chlamydospory většinou nejsou v kultuře pozorovány (Samuels et Hebbbar 2015), byť autoři (Park et al 2006), kteří druh popsali, pozorovali skoro kulovité až elipsoidní, hladké, 5 - 10 µm velké chlamydospory (Park et al. 2006).

Druh *Trichoderma pleuroti* je řazen do větve Harzianum a je podobný druhu *Trichoderma virens* (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Arx, který ale patří do větve Virens. Rozdíly mezi těmito druhy je jednak v sekvenci úseku rpb2, velikosti konidií (*T. pleuroti* má menší a užší konidie než *T. virens*) a částečně v místech výskytu. *T. pleuroti* je známa především z pěstebního substrátu hlívy a půdy, zatímco *T. virens* je známa pouze z půdy a dřeva. (Samuels et Hebbbar 2015)-



Obr. č. 1 - Kolonie *Trichoderma pleuroti* na 2% sladínovém agaru



Obr. č. 2 - *Trichoderma pleuroti* - konidiofor, s fialidami a konidiemi

Rozdíl růstu *Trichoderma pleuroti* na sterilním a pasterizovaném substrátu

Autoři metodiky v pokusu založeném ve zkumavkách porovnávali reakce mycelia prorůstajícího celým profilem sterilního substrátu ze slaměných pelet se stejným substrátem, který byl pouze spařen vodou. Každý z obou substrátů byl smíchán s 2 % sadby a na povrchu zkumavek zaočkován suspensí spor *T. pleuroti*. Po 14 dnech byly oba substráty hodnoceny. Ukázalo se, že tam, kde substrát byl sterilizován, mycelium *T. pleuroti* potlačilo mycelium hlívy prorůstající substrát v celém profilu, zatímco substrát pouze spařený vřelou vodou prorostl podhoubím hlívy a *T. pleuroti* se v něm nerozšířila (viz obr 3). Ukázalo se, že substrát zbavený přirozené mikrobioty je náchylnější k infekci konkurenční houbou *T. pleuroti*. Proto není vhodné pěstební substrát na bázi slámy sterilizovat a naopak je potřeba činit taková opatření, aby byl cíleně podpořen rozvoj příznivé mikrobioty, která by usnadnila kolonizaci tohoto substrátu hlívou ústříčnou a omezovala rozvoj *T. pleuroti*.



Obr. č. 3 - Růst mycelia hlívy ústříčné na pasterizovaném (vlevo) a na sterilizovaném (vpravo) substrátu následně infikovaném houbou *Trichoderma pleuroti*

Charakteristika zařízení pro výrobu pěstebního substrátu a pěstování hlívy ústříčné v různých objemech

Substrát lze připravovat v různě velkém množství. Níže jsou popsány jednak zařízení na menší objemy pěstebního substrátu (pro malou komerční pěstírnu nebo pokusnou pěstírnu) a větší objemy (pro střední nebo velkou komerční pěstírnu).

Propařovací komora na menší objemy pěstebního substrátu

Při přípravě substrátů ze slámy bylo nutné jejich zahřátí za účelem zničení zárodků konkurenčních hub. Proto bylo navrženo a realizováno zařízení, ve kterém lze dosáhnout teploty do 100 °C, kterou lze udržovat po dobu několika dnů. K teplotnímu ošetřování substrátů byla vybudována propařovací komora. Její konstrukce je zhotovena z polyuretanových panelů o tloušťce 70 mm, jejich vnitřní plocha je z nerezového plechu. Jednotlivé panely jsou spojeny L profily a celá komora je pro snadnou manipulaci na kolečkách. Na vnitřních bočních stěnách konstrukce jsou výstupky pro umístění sedmi podlážek z pletiva tak, aby byl umožněn prostup páry mezi jednotlivými podlažkami. Celková kapacita komory je 96 kusů kelímků o objemu každého 2,6 litrů (hmotnost 1 kelímku je asi 1,8-2 kg), celkové množství substrátu, které je možno najednou ošetřit je zhruba 250 litrů (= 192 kg). Komora se uzavírá parotěsnou deskou zavěšenou na šesti pantech a je do ní zaveden přívod páry z vyvíječe o výkonu 12 kW. Přívod páry z vyvíječe do komory je automaticky regulován teplotním čidlem a hladina vody ve vyvíječi je automaticky hlídána, tak, aby topná tělesa byla automaticky chráněna. Mísení vzduchu uvnitř komory zajišťuje ventilátor, jehož motor je umístěn vně komory, rotor uvnitř propařovacího prostoru.

Propařovací tunel na velké objemy

Propařovací tunel je tepelně izolovanou komorou se stavební konstrukcí odolnou vůči střídavým teplotám do +80°C a 100% relativní vzdušné vlhkosti. Z důvodu snadného naskladňování a vyskladňování bývá tunel široký 3-4 metry, délka se řídí požadovanou kapacitou. Výška závisí na používané mechanizaci, obvykle cca 4 m. Tunel je vybaven podlahovým roštem a oběhovým ventilátorem s klapkovým systémem, kterým se řídí teplota v tunelu a obsah kyslíku v cirkulující vzdušině. Ovládání klapek, parního vyvíječe a řízení otáček ventilátoru provádí procesní počítač s frekvenčním měničem na základě údajů teplotních, tlakových a kyslíkových čidel podle předem nastaveného programu.



Obr. č. 4 - Propařovací komora na výrobu menších objemů pěstebního substrátu



Obr. č. 5 – Propařovací tunel na výrobu substrátu v provozních podmínkách

Postup identifikace přítomnosti *Trichoderma pleuroti* v pěstírně

První příznaky napadení a poškození kultury houbou *Trichoderma pleuroti* se začínají v pytlech, kelímcích pytlech nebo blocích objevovat po 4-7 (-14) dnech od osázení pěstebního substrátu sadbou hlívy. Kultura hlívy ze sadby vykazuje omezený, až nulový rozvoj oproti situaci v substrátu bez přítomnosti *Trichoderma*. Pěstební substrát zůstává hnědý až černající a postupně se objevují typické sytě až tmavě zelené kolonie. Pro spolehlivé určení, zda se jedná o druh *T. pleuroti*, je potřeba sterilně odebrat do čistého dosud nepoužitého sáčku vzorek substrátu a diagnostikovat pomocí mikroskopu. Ze vzorku se odebere pomocí dvou injekčních jehel do kapky vody na podložním sklíčku část pozorovaného mycelia a přikryje krycím sklíčkem. Pro identifikaci je potřeba využít ve světelném mikroskopu zvětšení minimálně 600-krát, ale lépe 1000-krát. Je možné provést inkubaci vzorku na agarovém živném medium (2% sladinový agar s chloramfenikolem), kdy se sterilně pomocí injekční jehly nebo jemné pinzety odebere ze vzorku pěstebního substrátu část mycelia nebo kus slámy s myceliem a inkubuje se 7 dní při 25 °C, po té se provede identifikace pomocí mikroskopu.

Důležité je provádět průběžně průzkum výskytu v provozních objektech, jak ve výrobně substrátu, tak v pěstírně a to inkubací vzorků na agarových živných mediích (2% sladinový agar s chloramfenikolem a půdní agar s bengálskou červení a streptomycinem). Důležité je zjišťovat výskyt v sadbě, pěstebním substrátu a případně i v ovzduší technologicky významných částí provozu.

V případě nejasností ohledně správnosti identifikace je užitečné se obrátit na specializované mykologické pracoviště, které má zkušenosti s identifikací mikroskopických hub.

Uchovávání a příprava kultur bakterií pro aplikaci v laboratorních podmínkách a do substrátů

Na základě získaných poznatků byly použity a odzkoušeny bakterie druhů *Bacillus licheniformis*, *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus macerans* a *Bacillus subtilis* o kterých je známo, že se mohou vyskytovat v prostředí pěstebního substrátu nebo na povrchu různých částí rostlin.

Po zvážení možností byly vybrány dvě varianty paralelního uchovávání kultur bakterií v podmínkách laboratoře pěstírny schopné vyrábět vlastní sadbu. Jednak kolonie narostlé na šikmém agaru ve zkumavkách a skladované v chladničce při teplotě 4°C a následně zamražené ve formě konzerv založených na směsi pufr Tris + glycerol + voda.



Obr. č. 6 - Pytel pěstebního substrátu osázený sadbou hlívy ústříčné infikovaných houbou
Trichoderma pleuroti

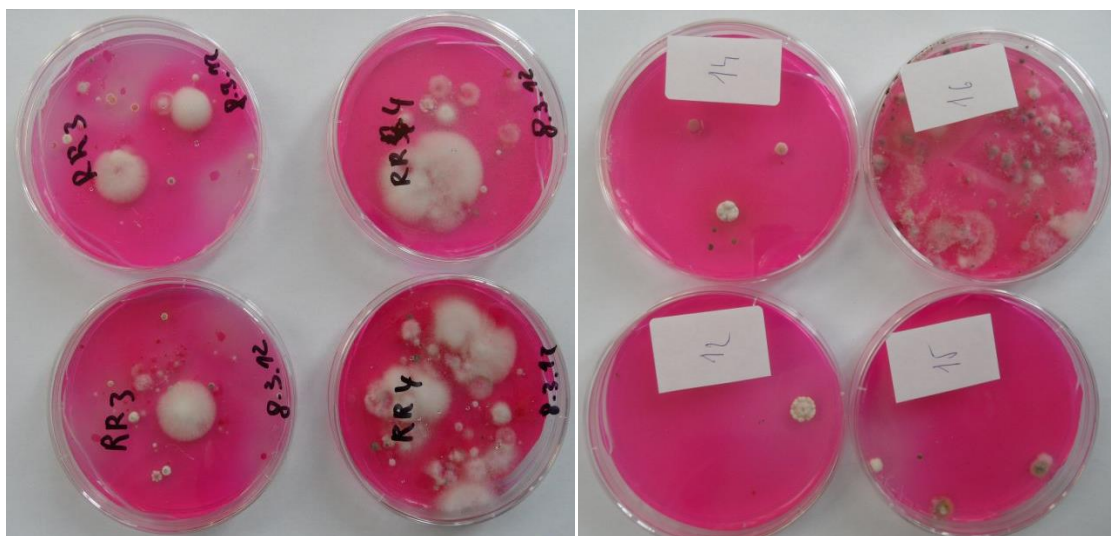
Příprava konzerv založená na bázi směsi pufr Tris + glycerol + voda

Nejprve je třeba připravit roztok 1 - rozpustit 0,758 g Trisu (Serva) ve 100 ml H₂O a následně doplnit do 150 ml H₂O a přidat 6,25 g MgSO₄ x 7H₂O. Následně tento roztok 1 smíchat se 100 ml glycerolu a následně vysterilizovat. Mezitím připravit bakteriální suspenzi ve sterilní vodě (koncentrace spor alespoň 10⁶ buněk / 1 ml). Poté smíchat bakteriální suspenzi se směsí pufr Tris + glycerol + voda v poměru 1:1. Vzniklou suspenzi v kryozkumavkách o objemu 1,5 nebo 1,8 nebo 2,0 ml a uložit do mrazničky. Takto je možno suspenzi uchovávat až do teploty -80°C.

Bylo hodnoceno několik variant počtu otáček (rpm) třepacího inkubátoru a ukázalo, se že tento faktor není zcela zásadní, ale měl by se pohybovat v rozmezí 50-150 rpm / min a tedy není potřeba pořizovat přesné třepačky, které udrží otáčky v rozmezí 5-10 rpm.



Obr. č. 7 - Pěstební substrát hlívy infikovaný houbou *Trichoderma pleuroti*.



Obr. č. 8 - Výsledky inkubace vzorků vzdušných spadů na agarovém živném mediu s Bengálskou červení a streptomycinem

Pro kultivaci všech testovaných kmenů se ukázalo dostačující médium určené pro kultivaci druhů z rodu *Bacillus* v následujícím složení: pepton – 5g, extrakt z hovězího masa – 3 g, $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ – 0,01 g, agar 20 g, voda – 1000 ml. V případě použití agaru pro

potravinářské účely je nutné zvýšit navážku alespoň o 50%. Při přípravě tekutého media se agar logicky nepřidává. Teplotu je potřeba udržovat v rozmezí $\pm 2^{\circ}\text{C}$ od doporučené hodnoty.

Inokulační vsázku do fermentoru, kde dojde k namnožení bakterií v řádech desítek litrů, je vhodné připravit si na menší třepače nebo třepacím inkubátoru v Erlenmeyerových baňkách s disruptory, které zvýší účinnost promíchávání. Vsázka dostačuje v poměru 1:100 k objemu kultivačního media

Hodnocení vztahu bakterií a hub

Za experimentálních podmínek ověřovali různí autoři vliv různých druhů bakterií, které příznivě působily na rozvoj mycelia hlívy v substrátu (Nagy et. al 2012). Proto studium bylo zaměřeno na vztah hlívy, houby *Trichoderma pleuroti* a některých bakterií. Před aplikací jednotlivých kmenů bakterií do pěstebního substrátu je potřeba zhodnotit vztah daného kmene bakterie, hlívy a kmene *Trichoderma pleuroti* a to ve formě duálních nebo triálních kultur a pokud výsledek v in vitro podmínkách ukazuje tzv. zajímavé výsledky, tak provést aplikaci do pěstebního substrátu. Příkladem je hodnocení vztahu s kmeny bakteriálních druhů *Bacillus subtilis* a *B. macerans*.

Byl zjišťován vliv bakterií *B. subtilis* a *B. macerans* na růst *Pleurotus ostreatus* a *Trichoderma pleuroti* na agarovém živném mediu. Bakterie byly zaočkovány bodově nebo plošně a to tři dny před testovanou houbou nebo současně se zkoumanou houbou nebo tři dny po testované houbě. V situaci kdy kmen *Bacillus macerans* neb *B. subtilis* kolonizoval agarové medium, tak nedošlo k růstu kolonií *T. pleuroti*. Pokud bakterie byly očkované na médium 3 dny po zaočkování *T. pleuroti*, tak tato houba vytvořila velké kolonie na agarovém mediu. Pokud dostala *Trichoderma* možnost využít zdroje z agarového média a vytvořit mycelium, tak převládla. Pokud kmen *Bacillus macerans* neb *B. subtilis* kolonizoval agarové medium, tak byl růst hlívy velmi potlačen, ale nebyl nulový oproti *T. pleuroti*. Pokud dostala hlíva možnost využít zdroje z agarového média a vytvořit mycelium, tak převládla. Ke stejnému výsledku se došlo i v případě, kdy bakterie byly očkované na médium 3 dny po zaočkování hlívy, kdy hlíva také vytvořila velké kolonie a na agarovém mediu převládla.

Další možností jak zjistit zda daný kmen bakterie je schopen potlačovat *T. pleuroti* je hodnocení vlivu filtrátů kultury dané bakterie na růst *T. pleuroti* a hlívu v in vitro podmínkách. Nejprve je připravena tekutá kultura dané bakterie, která je pomocí

stříkačkových filtrů s póry 0,2 μm zbavena vlastních bakteriálních buněk, po té je 0,5 ml filtrátu aplikováno (a rozetřeno) na 90 mm Petriho misku s 2% sladinovým agarem. Misky jsou inkubovány v termostatu ve tmě při teplotě 30 °C a po 3 dnech je hodnocen vztah mezi organismy.

V případě, že chceme hodnotit vliv filtrátů společenstva bakterií v substrátu, tak odebereme 100 gramů substrátu, přidáme 300 ml sterilní destilované vody, necháme třepat 15 minut při 200 rpm. Po té pomocí stříkačkových filtrů s póry 0,2 μm získaný supernatant vysterilizujeme a zbavíme veškerých organismů, 0,5 ml filtrátu aplikujeme (a rozetřeno) na 90 mm Petriho misku s 2% sladinovým agarem. Misky jsou inkubovány v termostatu ve tmě při teplotě 30 °C a po 3 dnech je hodnocen vztah mezi organismy. Pokud vzorek substrátu nezpracováváme ihned, tak ho zmrazíme a rozmrazíme teprve až před vytřepáním.

Byl zjišťován vliv filtrátů (přes filtry určené pro sterilizaci roztoků) z kultur bakterií *Bacillus subtilis*, *B. macerans*, z pěstebního substrátu zpracovaného venku na hromadě s následným teplotním ošetřením v tunelu a substrátu zpracovaného pouze venku na máčecí hromadě a neošetřený v tunelu (obojí od fy ing. Rudolf Ryzner) na růst tří kmenů *Pleurotus ostreatus* a dvou kmenů *Trichoderma pleuroti* (CPPF 416 a CPPF 432). Při posuzování vlivu filtrátů na *T. pleuroti* nebyl v porovnání s kontrolou zjištěn negativní vliv filtrátů z *B. subtilis* a *B. macerans*. Omezení růstu *T. pleuroti* bylo pozorováno u filtrátu z 2 a 3, které pocházely z pěstebního substrátu. To se zejména projevilo u kmene CPPF432, který byl izolován z pěstírny ve středních Čechách. U kmene CPPF 416 pocházejícího z pěstírny Kojátky byl růst výrazně méně omezen. Negativní vliv filtrátů na růst mycelia *P. ostreatus*, nebyl zjištěn.

Vliv kvality substrátu na prorůstání hlívy

V současné době je při komerčním pěstování hlívy (i jiných jedlých a léčivých hub) důležitá jejich odolnost vůči škodlivým činitelům, rychlost prorůstání mycelia v substrátu a doba kdy začne kultura plodit.

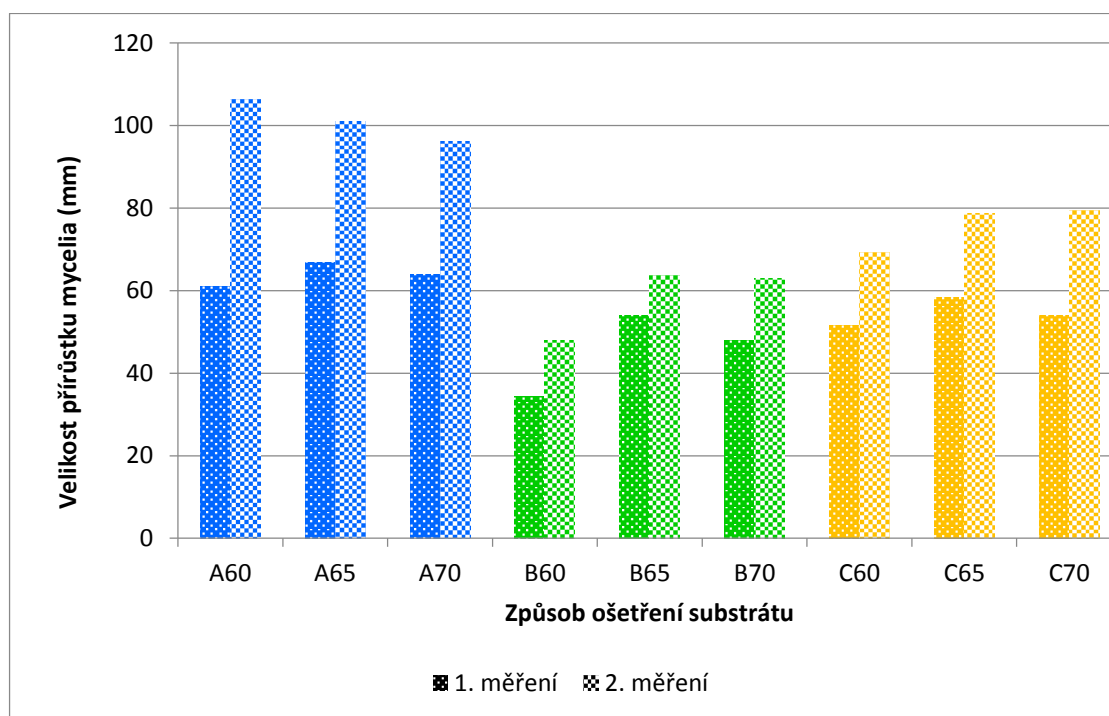
Vliv fermentace a teplotního ošetření pěstební substrátu na růst mycelia *Pleurotus ostreatus* při riziku poškození kultury druhem *Trichoderma pleuroti*.

Na rychlost růstu mycelia hlívy v pěstebním substrátu má vliv jak využití / nevyužití fermentace, tak teplota ošetření substrátu při jeho přípravě.

Byla sledována rychlost růstu mycelia hlívy na substrátu ze slámy s 75% vlhkostí a za předpokladu, že hrozí poškození kultury hlívy druhem *T. pleuroti*,

Nejvyšších přírůstků dosáhla hlíva ve fermentovaném substrátu, přičemž nejrychlejší růst byl zaznamenán při ošetření teplotou 60 °C. Nefermentovaným substrátem ošetřeným jednou ze tří zvýšených teplot (60 °C, 65 °C a 70 °C) prorůstalo mycelium nejpomaleji, protože v průběhu kolonizace se projevila přítomnost *T. pleuroti*. Výsledky prokázaly, že žádné z použitých teplotních ošetření nebylo schopno přítomnou *T. pleuroti* zničit. V kontrolní neinfikované a nefermentované variantě nedosáhlo mycelium hlívy stejné rychlosti růstu jako v substrátu fermentovaném. (graf č. 1)

Pokud se bude pěstovat hlíva na substrátu s 75% vlhkostí a za předpokladu, že hrozí poškození *T. pleuroti*, pak je na základě laboratorních poznatků pro rychlejší růst vhodné substrát fermentovat a teplota následného tepelného ošetření substrátu by se měla pohybovat mezi 65-70°C.



Graf č 1 - Vliv ošetření substrátu na velikost nárůstu mycelia *P. ostreatus*

Vysvětlivky: A - fermentovaný infikovaný substrát ošetřený při 60°C, 65°C a 70 °C
 B - nefermentovaný infikovaný substrát ošetřený při 60°C, 65°C a 70 °C
 C - kontrolní substrát ošetřený při 60°C, 65°C a 70 °C

Aplikace laboratorních pokusů v praktickém provozu

V průběhu 4-letých pokusů bylo založeno 82 pokusných provozních dávek v různých ročních obdobích. V každé dávce bylo připraveno 30-40 t substrátu hlívy a

1. byl zjišťován vliv přídavku očkovacího substrátu a vápenatých přídavků
2. byl hodnocen vliv doby a průběhu fermentace slámy na venkovní hromadě v různých ročních obdobích.
3. byly hodnoceny různé propařovací režimy v propařovací komoře.

4. byl zjišťován vliv časového odstupu od sklizně slámy na výskyt *T. pleuroti* v připravovaných substrátech.



Obr. č. 9 - Horní vrstva pěstebního substrátu kolonizovaná *Pleurotus ostreatus*



Obr. č. 10 - Spodní vrstva pěstebního substrátu nekolonizovaná hlívou vykazující četný výskyt cf. *Scytalidium*

Vápenaté přídavky (uhličitan vápenatý a hydroxid vápenatý) vykazovaly vyšší efekt v letním období a v případě použití čerstvé slámy, kdy ve fermentační hromadě docházelo k rychlejšímu rozvoji anaerobní mikrobioty. Přídavek propařeného substrátu do máčené slámy se v praxi osvědčil zejména v zimním období.

Výběr lignocelulózových materiálů pro výrobu substrátů pro pěstování hlívy odolných vůči *Trichoderma pleuroti*.

V podmínkách České republiky je nejfrekventovanějším materiálem pro substráty hlívy sláma obilovin. Jako další zdroje jsou použitelné také slámy i jiné rostlinné části luskovin, olejnin, kořeninových rostlin a trav nebo dřevní hmota.

V současné době je za nejvhodnější materiál vzhledem k masové dostupnosti, snadné zpracovatelnosti a téměř optimálnímu chemickému složení považována sláma pšenice. Má i příznivé fyzikální vlastnosti, vhodnou tvrdost stébel a nasákavost. Tyto parametry ovlivňují

schopnost optimálního navlhčení substrátu a následně propustnost pro cirkulující vzduch během teplotního ošetření.

Přidávky jiných rostlinných materiálů mohou optimalizovat chemické i fyzikální parametry substrátů. Cílem použití přísadků bývá zejména zvýšení obsahu dusíkatých látek, snadněji dostupných zdrojů uhlíku i biologicky aktivních látek. Pro optimalizaci obsahu vlhkosti je možné použít přísadky materiálů s jinou nasákavostí.

Přestože produkce lignocelulózových materiálů v současné zemědělské výrobě je velmi vysoká, pro účely výroby substrátů pro pěstované houby je k dispozici jen omezené množství. Limitujícím faktorem je obsah reziduí pesticidů ve sklizených rostlinách. Nejproblematictějšími se jeví rezidua herbicidů a morforegulátorů. Snaha o dosažení velké intenzity výroby vede zemědělce k uplatnění zúžených osevních postupů a zvýšenému hnojení, což vyvolává vyšší potřebu používání vícesložkových vysoce účinných herbicidů a použití morforegulátorů. Podstatná část osevních ploch pšenice je ošetřována herbicidy obsahujícími účinné látky aminopyralid, pyroxsulam, klopyralid, pikloram. Obchodní názvy přípravků jsou Hurricane, Mustang Forte, Corello, Kantor + a další. Tyto herbicidy mají v etiketách uvedeno, že sláma obilovin ošetřených těmito přípravky nesmí být použita pro přípravu substrátů pro houby a jahody. Řada dalších herbicidů obsahujících sulfonyl močoviny sice v etiketách nemá uvedeno takovéto striktní omezení, ale jejich etikety obsahují varování, že mohou ovlivnit fermentační procesy. Mírné zimy posledních let spolu s časným zakládáním porostů, zvýšenými dávkami hnojení a účinnou podzimní ochranou proti plevelům způsobují, že v jarním období bývá velká část porostů ozimých pšenic velmi dobře vyvinutá a někdy přehuštěná. To vyvolává potřebu vícesledového používání morforegulátorů s několika skupinami účinných látek. Sláma ošetřená přípravky s kombinací prohexadion + mepiquat, nebo ethephon + chlormequat chlorid nesmí být vůbec použita pro přípravu substrátů. V případě jednosložkových přípravků s účinnými látkami trinexapacethyl nebo chlormequat je v návodech na použití přípravků uváděn vliv na fermentační procesy. V Holandsku je sledování výskytu reziduí morforegulátorů v plodnicích hub stejně standardním postupem jako sledování obsahu těžkých kovů.

Z uvedeného vyplývá, že pro pěstování hub může být použita sláma nebo jiné rostlinné části jen z honů, na kterých byly z ošetřování plodin cíleně vyloučeny problematické herbicidy i morforegulátory. V praxi to však znamená snížení intenzity pěstování pšenice a pěstování nepoléhavých odrůd. Použití slámy z nekontrolovaného zdroje se jeví jako vysoce rizikové a neodpovídající platné legislativě. Pravděpodobně touto cestou byly kontaminovány některé zachycené zásilky importovaných hub. Pokud je k dispozici sláma bez nadlimitních obsahů

škodlivých reziduí, měla by být sklízena za sucha a kvalitně uskladněna. Výskyt provlhčených partií slámy znamená nejen riziko rozvoje nežádoucí mikrobioty, ale i lokálního převlhčení částí substrátů během přípravy. Na převlhčených částech substrátu (přes 75% obsah vody) pak dochází během prorůstání k potlačení mycelia hlívy oportunními bakteriemi a k následnému rozvoji nežádoucích hub. V provozních pokusech bylo ověřeno, že i sláma za sucha sklizená a dobře uskladněná bývá rozdílně infikovaná nejzávažnější konkurenční plísní *T. pleuroti*. Dále se potvrdilo, že infekční potenciál *T. pleuroti* během skladování slámy klesá, při čemž nejvýraznější pokles nastává během prvních tří měsíců po sklizni. Z tohoto důvodu lze doporučit pro výrobu substrátu pro pěstování hlívy používat novou slámu ne dříve než tři měsíce po sklizni.

Mechanická úprava a zvlhčování slámy, míchání přísad.

Podmínkou, která je zcela zásadní pro přípravu substrátů odolných vůči *T. pleuroti* je dokonalé navlhčení všech částic substrátů na optimální vlhkost v rozmezí 67-75%. Aby této podmínky mohlo být dosaženo a také aby se substrát stal manipulovatelným, je nutné jeho nadrcení na částice o maximální velikosti 5 cm, přičemž je žádoucí použít drtič nebo štípač, který porušuje kruhový průřez stébel. Pro spolehlivé navlhčení je třeba použít způsob, kdy všechna zpracovávaná hmota projde ponořením pod vodní hladinu. Pro tento účel je vhodné zařízení dle patentu PV 2015-918, které je zároveň schopno přimíchat eventuální přísady a kontinuálně odseparovat a vrátit zpět do máčecí vany většinu přebytečné máčecí vody. Očkovací kultury v submerzi nebo i ve formě čerstvě propařeného substrátu je výhodné přidávat do máčecí vany, tím se dosáhne homogenního zaočkování veškerého zpracovávaného substrátu.

Fermentace na venkovní hromadě.

Namočený substrát obsahuje přebytečnou vodu, která několik hodin po namočení vytéká z hromady. Zároveň začíná rozvoj mikroorganismů, jak uměle naočkovanych, tak i přirozeně žijících jako epifyty, které mají zásobárnu svých spor zejména v půdě, protože sláma je vždy do určité míry znečištěna půdou z pozemku, z kterého pochází. Které skupiny mikroorganismů nakonec v substrátu převládnu, závisí na tom, jaké podmínky se v hromadě vytvoří. Podmínky v hromadě závisí na složení substrátů, venkovní teplotě a šířce hromady, která ovlivňuje průběh zásobování kyslíkem na základě komínového efektu. Provzdušení takové hromady se dosáhne pravidelným přehazováním.

Fermentace na venkovní hromadě není nutnou podmínkou nové technologie, může mít pozitivní i negativní efekt na výskyt kompetitivních mikroorganismů. Pozitivní výsledky přináší zejména v chladnějším období. V období vysokých letních teplot bývá obtížné zabránit vytváření anaerobně zkvašených partií substrátu, zvláště tehdy, používá-li se měkkí, více nasákavá sláma s větším podílem snadno zkvasitelných živin. V takovém případě je nutné zvýšit frekvenci přehazování až na 2 přehazování za den a neprodlužovat dobu fermentace na více než 5 dní.

Fermentace a propařování v propařovacím tunelu.

Fermentace a propařování podle nového experimentálně ověřeného postupu v řízeném propařovacím tunelu má 2 základní fáze. První fází je řízená aerobní fermentace při teplotě 30°C. V této fázi probíhá vlivem činnosti mikroorganismů v substrátu tak intenzivní tvorba tepla, že je nutné vznikající teplo odvádět, aby nedocházelo ke zvyšování teploty mimo požadované rozpětí, ve kterém se rozvíjí požadovaná mikrobiota. Vznikající teplo se odvádí cirkulujícím vzduchem s přidavkem čerstvého vzduchu. Podíl čerstvého vzduchu v této fázi je tak velký, že koncentrace kyslíku neklesá pod 20 %. Po 3 až 4 dnech je přívod čerstvého vzduchu uzavřen a začíná etapa zvyšování teploty na 65 až 70°C. Ke zvyšování teploty se využívá přívod páry a částečně i samozáhřev substrátu. Během této etapy klesá obsah kyslíku v cirkulující vzdušině. Pokud by obsah kyslíku klesl pod 8%, je nutné přidávat čerstvý vzduch. Po dosažení teploty 65°C se snižuje spotřeba kyslíku mikroorganismy a jeho koncentrace stoupá k hodnotám okolo 15%. Teplota 65-70 °C se udržuje regulovaným přívodem páry po dobu 24 až 48 hodin. Potom se zastavuje přívod páry a zahajuje se snižování teploty otevíráním přívodu čerstvého filtrovaného vzduchu. Vybírání substrátu z tunelu a jeho osazování se zahajuje až po snížení teploty na 25 °C.

Doba a průběh venkovní fermentace výrazně ovlivnily výskyt *T. pleuroti* v připravených substrátech. V zimním období byly nejlepší výsledky dosahovány při fermentaci trvající 4 a více dní při sníženém počtu přehazování, kdy teplota v jádru hromady nepřesahovala 40 °C.

V letním období vícedenní fermentace vedla k samozáhřevu na teploty 50 – 60 °C a rychlému rozvoji anaerobních procesů v jádru hromady. Pokud následoval nezměněný propařovací režim, docházelo k vysokému výskytu *T. pleuroti* v připravených substrátech. V těchto případech byly lepší výsledky dosahovány, pokud byla pasterizační teplota zvýšena na 70 °C po dobu minimálně 24 hodin. Nejmenší výskyt *T. pleuroti* byl zaznamenán na substrátech, které byly fermentovány 4-5 dnů při teplotě nepřesahující 40 °C v jádru hromady, následně fermentovány v tunelu minimálně 3-4 dny při teplotě 30 °C a poté zahřáty na 65-70 °C po

dobu minimálně 24 hodin. Zatímco zkušenosti jiných výrobců substrátu ukazují, že pro dostatečné teplotní ošetření slámy vyhovuje teplota 60-70 °C po dobu do 24 hodin, naše výsledky ukazují, že tato teplota v době vysokého výskytu *T. pleuroti* nebyla účinná a úspěch procesu přípravy substrátu závisel na předchozím teplotním ošetření slámy.

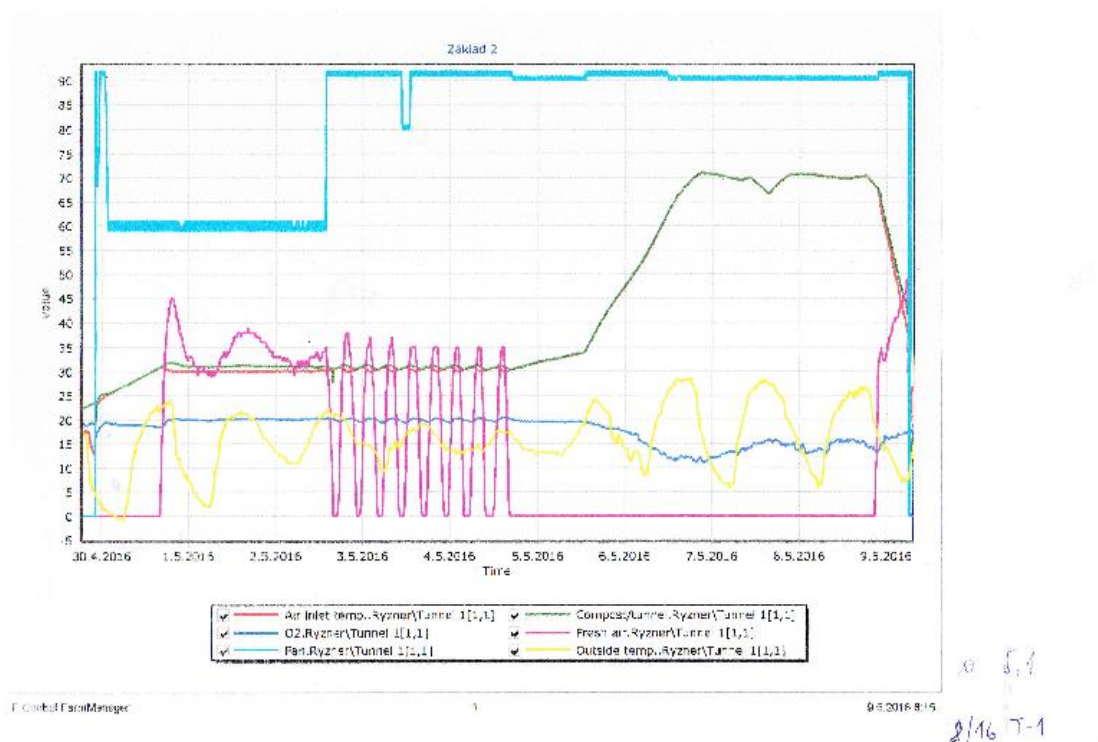


Obr. č. 11 - Substrát hlívy kontaminovaný houbou *Trichoderma pleuroti*.

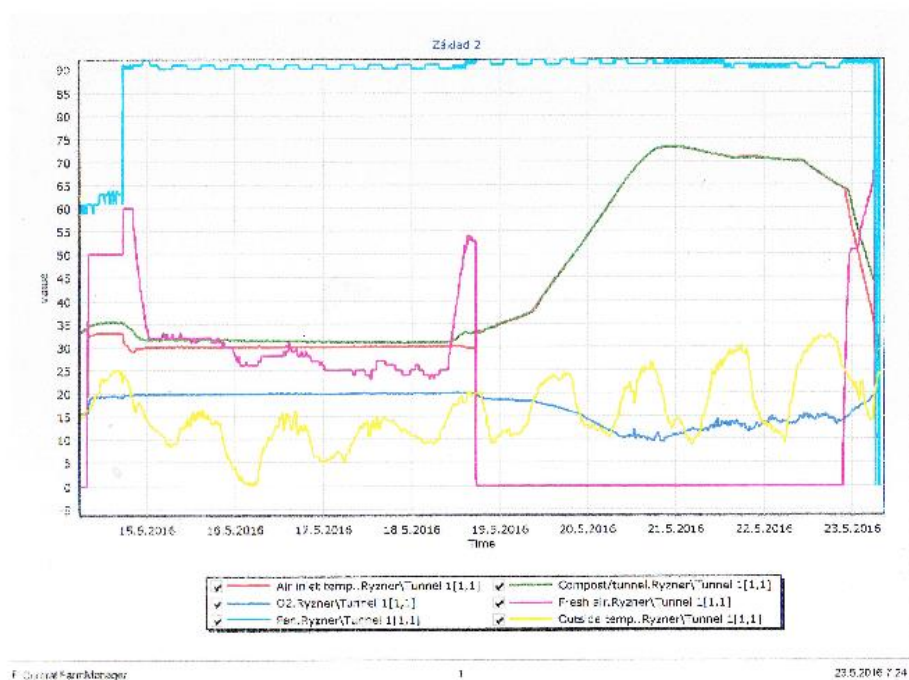


Obr. č. 12 -. Zdravá kultura hlívy (dole).

V roce 2015 stejně jako v roce 2014 byl při použití čerstvé slámy po žních zaznamenán výrazně vyšší výskyt *T. pleuroti* v připravovaných substrátech, přestože sláma v roce 2015 na rozdíl od roku 2014 byla sklizena za sucha ve výrazně vyšší kvalitě. Protože při hledání zdroje *T. pleuroti* v předchozích letech bylo zjištěno, že infekce *T. pleuroti* se nešíří vzduchem, nejpravděpodobnější zdroj je sláma kontaminovaná zeminou z pozemků, na kterých se asi *T. pleuroti* vyskytuje ve zvýšené míře. Byl proveden opakovaně mikrobiologický rozbor založený na inkubaci vzorků slámy na agarovém živném mediu v Petriho miskách, ale druh *T. pleuroti* nebyl zjištěn, což znamená, že infekce slámy je sice malá, ale dostačující k rozvoji mycelia při pěstování. Výsledky provozních pokusů v pěstírně ukazují, že infekční potenciál *T. pleuroti* klesá s délkou doby skladování slámy. Výsledky také ukázaly, že tato infekční schopnost není spolehlivě potlačena ani teplotou vyšší než 70°C. Naopak ošetření při teplotě 30°C v tunelu za přítomnosti spontánně se vyskytujících mikroorganismů způsobí, že následná pasterizace výrazně sníží riziko výskytu a rozvoje *T. pleuroti*.

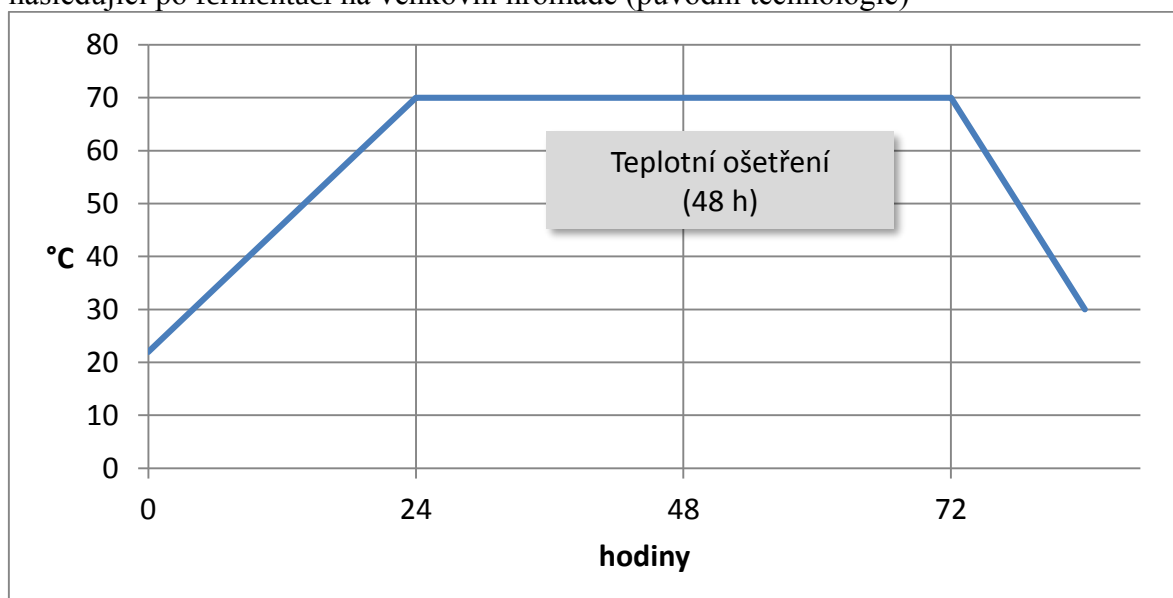


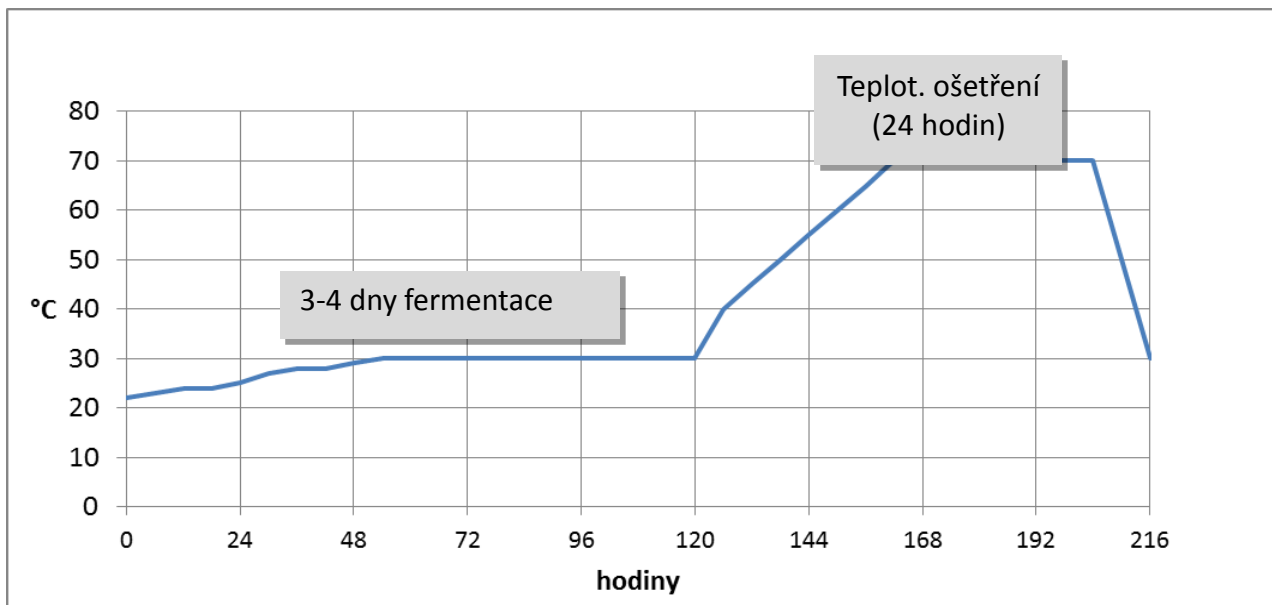
Grafy č. 2 - Průběh teplot, koncentrací kyslíku, výkon ventilátoru a množství přidávaného venkovního vzduchu během řízené fermentace a propařování šarže 8/16 v tunelu, ve které byl výskyt *T. pleuroti* zcela potlačen.



Grafy č. 3 - Průběh teplot, koncentrací kyslíku, výkon ventilátoru a množství přidávaného venkovního vzduchu během řízené fermentace a propařování šarže 9/16 v tunelu, ve které byl výskyt *T. pleuroti* zcela potlačen.

Graf č. 4. - Teplotní ošetření pěstebního substrátu hlívy ústříčné v propařovací tunelu následující po fermentaci na venkovní hromadě (původní technologie)





Graf. č. 5 - Teplotní ošetření pěstebního substrátu hlívy ústříčné zahrnující fermentaci v řízeném tunelu v délce 3-4 dny dle nového postupu.

Závěr

Ošetření slámy za účelem výroby substrátu hlívy ústříčné probíhá obvykle v teplotním procesu, kdy je namočený materiál podroben v propařovacím tunelu teplotám v rozmezí 55-70 °C po dobu 24 – 42 hodin. Závisí to na kvalitě slámy a přítomnosti konkurenční houby *Trichoderma pleuroti*. Výskyt spor většiny ostatních druhů vláknitých hub v ošetřeném substrátu rozvoji kultury hlívy ústříčné nevadí. V případě slámy kontaminované houbou *T. pleuroti* se osvědčila její předchozí fermentace při 30 °C po dobu 3 dnů následovaná teplotním procesem při 70 °C po dobu 24 hodin.

III) SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Technologie přípravy substrátů hlívy odolného vůči *T. pleuroti* vyvinutá za podpory projektu TAČR TA03020356 a obsažená v této metodice je nová ve dvou základních aspektech.

1. Využívá zařízení dle PV 2015-918, které umožňuje dosáhnout optimálního navlhčení všech částic zpracovávaného materiálu za současného přimíchávání přísad v časovém intervalu kratším než 10 minut v kontinuálně pracující lince. Toto řešení vylučuje možnost výskytu nepromočených částic substrátu, ve kterých by propařování přežily vitální formy *T. pleuroti*.

2. Pro dosažení odolnosti substrátů vůči *T. pleuroti* využívá postup přípravy substrátů založený na rozvoji zaočkované nebo i spontánně se vyskytující mikrobioty při experimentálně ověřeném fermentačním a propařovacím postupu. Tento postup je charakteristický teplotní křivkou aerobní fermentace v řízeném propařovacím tunelu, která v první fázi umožní rozvoj zejména bakterií při teplotě 30°C po dobu 3-4 dnů a potom následuje pasterizační fáze při teplotě 65 – 70°C po dobu 24 – 48 hodin.

IV) POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika je určena primárně pro výrobce substrátů pro pěstování hub. Podává konkrétní návod pro přípravu substrátů odolných vůči *T. pleuroti* a zabývá se i popisem zdravotních rizik a ekonomickými přínosy nové technologie.

V) EKONOMICKÉ ASPEKTY

Z rozboru tržeb od roku 2013, kdy byly zahájeny pokusy, se ukazuje, že se postupně zvyšovaly výnosy. Musíme brát ale v úvahu, že byly prováděny pokusy ve kterých byly také někdy zaznamenány negativní výsledky. V posledním roce 2016 i přes některé pokusy se po zahájení využívání nového postupu podařilo zvýšit tržbu firmy ing. Rudolf Ryzner v porovnání s rokem 2013 o 933 984 Kč.

Předpokládané ekonomické přínosy pro jiné pěstitele spočívají ve zvýšení výnosu pěstované hlívy ústříčné. Při pěstování hlívy ústříčné ve firmě ing. Rudolf Ryzner došlo ke zvýšení výnosu o 35%. V roce 2013 před použitím novém metodiky pěstování bylo z jednoho bloku v uvedené firmě sklízeno v průměru 2,59 kg plodnic hlívy ústříčné. V roce 2016 na základě informací obsažených v metodice bylo sklízeno 3,5 kg plodnic hlívy ústříčné. Velkoobchodní cena, za kterou tato pěstírna prodávala plodnice hlívy, byla 48 Kč /kg. To znamená, že z jednoho bloku došlo ke zvýšení finančního výnosu v průměru o 43,68 Kč. Pokud pěstitel bude hlívu pěstovat v menší pěstírně na 500 blocích / jedna pěstební komora tak jeho finanční příjmy se zvednou v průměru o 21 840 Kč při uvedené velkoobchodní ceně. Při předpokládaném provozu pěstírny, kdy pěstírna bude navážet a následně sklízet hlívu z nových šarží pěstebního substrátu po 14 dnech, tedy bude 25 šarží během 1 roku, zvýší se finanční příjmy o 546000 Kč. Pokud bude pěstírna prodávat hlívu maloobchodně za např. 80 Kč /kg, za kterou někteří pěstitelé v době certifikace prodávají, tak se finanční výnos z jednoho bloku zvýší v průměru o 72,8 Kč. Pokud pěstitel bude hlívu pěstovat na 500 blocích, tak se při maloobchodním prodeji finanční příjmy zvýší v průměru o 36 400 Kč z jedné šarže, respektive 910 000 Kč, za jeden rok.

Tab. č. 1 Porovnání výnosů v průběhu řešení projektu v komerční pěstírně

Porovnání výnosů původní a nové technologie za prvních 17 ukončených kultur v každém roce.								
rok	počet bloků	celková sklizeň	výnos z jednoho bloku	index k roku 2013, celková sklizeň	index k roku 2013, průměr na jeden blok	Realizační cena za 1 kg v Kč	Roční tržba v Kč	Rozdíl od roku 2013
2013	24 726	64 258	2,59	1	1	48	3 084 384	0
2014	24 030	71 443	2,97	1,11	1,14	48	3 429 264	344 880
2015	23 429	59 825	2,55	0,93	0,98	48	2 871 600	-212 784
2016	23 875	83 716	3,5	1,3	1,35	48	4 018 368	933 984

Porovnání průměru let 2013-2015 s novou technologií v roce 2016					
rok	počet bloků	celková sklizeň	výnos z jednoho bloku	index k průměru let 2013-15, celková sklizeň	index k průměru let 2013-15, průměr na jeden blok
průměr 2013-15	24 061	65175	2,71	1	1
2016	23 875	83716	3,5	1,28	1,29

VI) SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- Baldrian P., Kolařík M., Štursová M., Kopecký J., Valášková V., Větrovský T. et Voříšková J. (2012): Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. - The ISME journal, 6(2): 248-258.
- Gea F. J. (2009): First report on *Trichoderma pleurotum* on oyster mushroom crops in Spain. J. Plant. Pathol. 91 (2):504
- Komoń-Zelazowska M., Bissett J., Zafari D., Hatvani L., Manczinger L., Woo S., Lorito M., Kredics L., Kubicek C. P., Druzhinina I. S. (2007): Genetically closely related but phenotypically divergent *Trichoderma* species cause green mold disease in oyster mushroom farms worldwide. - Applied and Environmental Microbiology. 73 (22): 7415-7426.
- Kurtzman, R. Oyster Mushroom Cultivation [online]. (2006): [cit. 2015-4-3]. Dostupné z <<http://www.oystermushrooms.net/front.htm>>
- Nagy A., Manczinger L., Tombácz D., Hatvani L., Györfi J., Antal Z., Sajben E., Vágvölgyi C. et Kredics L. (2012): Biological control of oyster mushroom green mould disease by antagonistic *Bacillus* species. - Biological control of fungal and bacterial plant pathogens. - IOBC-WPRS Bulletin. 78: 289-293.
- Park M. S., Bae K. S. et Yu S. H. (2006): Two new species of *Trichoderma* associated with green mold of oyster mushroom cultivation in Korea. - Mycobiology 34: 111-113.
- Samuels G. J. et Hebbard P. K. (2015): *Trichoderma* Identification and agricultural applications – St. Paul, 196 s.

VII) SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Adamčík D. (2014): Vztah hlívy ústřičné (*Pleurotus ostreatus*) a klanolístky obecné (*Schizophyllum commune*) během kolonizace jabloňové a slivoňové štěpky. - ms. bakalářská práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Praha, 58 s.
- Antonín V., Jablonský I., Šašek V., Vančuríková Z. (2013): Houby jako lék. – Praha, 200 s.
- Balíková E. (2014): Ošetření substrátu pro pěstování hlívy ústřičné (*Pleurotus ostreatus*) vybranými bakteriemi. Ms Diplomová práce Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Praha. 103 s.
- Jablonský I. et Novotný D. (2015): Podmínky v substrátu hlívy ústřičné ve vztahu k výskytu *Trichoderma pleuroti* – Mykologické listy 132:41-49

Jablonský I., Novotný D. et Ryzner R. (2016): The influence of *Pleurotus* substrate microbial colonisation on the growth of *Trichoderma pleurotum*. s. 140-146, In: Science and cultivation of edible and medicinal fungi: Mushroom Science IXX, eds. A. S. M. Sonnenberg et J. J. P Baars. Proceedings of the 19th Congress of the International Society for Mushroom Science, Amsterdam, the Netherlands, 30 May -2 June 2016.

Jablonský I. et Novotný D.: Metody moderní přípravy substrátu hlívy ústříčné –Zahradnictví (přijato do tisku)

JABLONSKÝ I., ŠAŠEK V. (2006): Jedlé a léčivé houby, pěstování a využití. Praha, 264 s. + 16 stran příloh,

Novotný D., Jablonský I. (2016): Occurrence and characterisation of strains *Trichoderma pleuroti* from Czech Republic. in Science and cultivation of edible and medicinal fungi: Mushroom Science IXX, eds. A. S. M. Sonnenberg and J. J. P Baars. Proceedings of the 19th Congress of the International Society for Mushroom Science, Amsterdam, the Netherlands, 30 May -2 June 2016.

Otradovcová Š. (2016): Vliv ošetření substrátu a teplotních podmínek na vývoj kultury *Pleurotus eryngii* a *Pleurotus nebrodensis*. Ms. Diplomová práce Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Praha. 72 s.

Reich J. (2014): Odolnost kmenů hlívy ústříčné a hlívy plicní vůči *Trichoderma pleurotum*. Ms. Diplomová práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta lesnická a dřevařská. Praha. 60 s.

Sobotová R. (2016): Příprava substrátu pro pěstování korálovce ježatého (*Hericium erinaceus*) za použití různých přísad a teplotních ošetření. Ms. Diplomová práce Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Praha. 58 s.

Wiesnerová L. (2016): Vliv podmínek prostředí na vztah kultury hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*), *Trichoderma pleuroti* a mikrobiota v substrátu. Ms. Diplomová práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Praha. 58 s.

Zadobilová L. (2015): Vztah mikroorganismů v substrátu k myceliu hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*) a konkurenční houbě *Trichoderma pleurotum*. Ms. Diplomová práce Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Praha. 97 s.

Autoři: Ing. Ivan Jablonský CSc, RNDr. David Novotný, Ph.D.
a Ing. Rudolf Ryzner
Název: Využití antagonistických mikroorganismů pro ochranu kultury
hlívy před vláknitou houbou *Trichoderma pleuroti*
Vydal: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, 161 06
Praha 6 - Ruzyně ve Výzkumném ústavu zemědělské techniky,
v.v.i., Drnovská 507, 161 06 Praha 6 - Ruzyně
Sazba a tisk: Výzkumný ústav zemědělské techniky, v.v.i., Drnovská 507,
161 06 Praha 6 - Ruzyně
Náklad: 20 ks
Metodika je veřejně přístupná na adrese www.vurv.cz.
Vyšlo v roce 2016.
Vydáno bez jazykové úpravy.

Kontakt na autora: novotny@vurv.cz

Autor titulní fotografie: Ing. Ivan Jablonský CSc,

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2016
ISBN: 978-80-7427-228-8