

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ПОГОДЖЕНО

**Декан факультету захисту рослин,
біотехнологій та екології**

_____ **Юлія КОЛОМІЄЦЬ**

« ____ » _____ 2026 р.

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

**Завідувач кафедри фізіології,
біохімії рослин та біоенергетики**

_____ **Світлана ПРИЛУЦЬКА**

« ____ » _____ 2026 р.

БАКАЛАВРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**на тему: «Вплив біотичних факторів на ріст та розвиток *Lentinula
edodes* (Berk.)»**

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Біотехнології та біоінженерія»

Гарант освітньої програми

Кандидат біологічних наук, доцент

(Підпис)

Олена КВАСКО

**Керівник бакалаврської
кваліфікаційної роботи**

Доктор біологічних наук, доцент

(Підпис)

Ольга БОЙКО

Виконав

(Підпис)

Роман КОГУТ

Київ – 2026

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

фізіології, біохімії рослин та біоенергетики

доктор біологічних наук, професор _____ Світлана ПРИЛУЦЬКА
“ _____ ” _____ 2026 р.

З А В Д А Н Н Я

**ДО ВИКОНАННЯ БАКАЛАВРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ
ЗДОБУВАЧУ**

Когуту Роману Вадимовичу

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Біотехнології та біоінженерія»

Тема бакалаврської кваліфікаційної роботи

«Вплив біотичних факторів на ріст та розвиток *Lentinula edodes* Berk.»

Затверджена наказом від «30» жовтня 2025 року № 2596 «С»

Термін подання завершеної роботи на кафедру «29» травня 2026 р.

Вихідні дані до бакалаврської роботи: зразки субстратних блоків *L. edodes* штаму ІВК-516, відібрані на базі промислового грибівничого підприємства; науково-технічна та профільна періодична література за темою промислового грибівництва та мікробіології; поживні середовища м'ясо-пептонний агар та картопляно-декстрозний агар; прилади та інструментарій мікробіологічної лабораторії.

Перелік питань що підлягають дослідженню: провести моніторинг стану досліджуваних зразків на етапі першої хвилі плодоношення; здійснити кількісний аналіз мікробіому субстрату та виділити домінуючі штами мікроорганізмів-контамінантів у чисту культуру; дослідити особливості культурально-морфологічного розвитку виділеної умовно-патогенної мікрофлори та характер її біотичного тиску на *L. edodes*; оцінити вплив сторонньої мікрофлори на процеси плодоношення макроміцета та обґрунтувати рекомендації для захисту культури.

Дата видачі завдання: «30» жовтня 2025 р.

**Керівник бакалаврської
кваліфікаційної роботи**

(Підпис)

Ольга БОЙКО

Завдання взяв до виконання

(Підпис)

Роман КОГУТ

РЕФЕРАТ

Відомості про обсяг та структуру роботи. Бакалаврська робота викладена на 50 сторінках. Структура включає вступ, три розділи (огляд літератури, матеріали та методи, результати досліджень), висновки, список джерел. Робота містить 10 ілюстрацій, 3 таблиці. Список джерел налічує 29 найменувань.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: LENTINULA EDODES, ШИЇТАКЕ, БІОТИЧНІ ФАКТОРИ, УМОВНО-ПАТОГЕННА МІКРОФЛОРА, АНТАГОНІЗМ, ПРОМИСЛОВЕ ГРИБІВНИЦТВО, ІНТЕНСИВНЕ КУЛЬТИВУВАННЯ.

Мета роботи: комплексне вивчення та оцінка впливу біотичних факторів на ріст і розвиток *Lentinula edodes* Berk. (шиїтаке). Розгляд причинно-наслідкових взаємозв'язків між ними як деструктивного чинника та ключової проблеми, що виникає в процесі інтенсивного промислового культивування даної культури.

Методи дослідження: порівняльний візуально-структурний аналіз, мікробіологічні методи ізоляції мікроорганізмів у чисту культуру на диференційовано-діагностичних поживних середовищах, кількісний аналіз ступеня контамінації субстрату, аналіз та синтез науково-технічної інформації.

Результати та їх новизна: Проведено моніторинг субстратних блоків. Наведено кількісну характеристику бактеріальної та мікотичної контамінації субстрату в зразках. Виділено в чисту культуру та ідентифіковано домінуючі ізоляти умовно-патогенної мікрофлори. Описано закономірності біотичного тиску сторонніх організмів на міцелій шийтаке. Новизна полягає у комплексному біотехнологічному підході до оцінки мікробіологічної чистоти субстрату штаму ІВК-516 на підприємствах київського регіону.

Рекомендації щодо використання: Сформульовані за результатами досліджень технологічні рекомендації та заходи щодо зниження ризиків контамінації субстрату можуть бути використані на промислових грибовничих підприємствах для підвищення врожайності ксилотрофних макроміцетів та мінімізації біотичного стресу культури.

ABSTRACT

Volume and structure of the thesis. The Bachelor's thesis is presented on 50 pages. The structure includes an introduction, three chapters (literature review, materials and methods, research results), conclusions, and references. The work contains 10 illustrations, 3 tables. The reference list includes 29 entries.

KEYWORDS: LENTINULA EDODES, SHIITAKE, BIOTIC FACTORS, OPPORTUNISTIC MICROFLORA, ANTAGONISM, COMMERCIAL MUSHROOM FARMING, INTENSIVE CULTIVATION, YIELD.

The aim of the study: is a comprehensive investigation and evaluation of the impact of biotic factors on the growth and development of *Lentinula edodes* Berk. (shiitake), as well as analyzing the cause-and-effect relationships between them as a destructive factor and a key problem arising during the intensive commercial cultivation of this culture.

Research methods: comparative visual and structural analysis, microbiological methods for isolating microorganisms into pure cultures on differential diagnostic nutrient media, quantitative analysis of substrate contamination levels, analysis and synthesis of scientific and technical literature.

Results and their novelty: Monitoring of substrate blocks was performed. A quantitative characterization of bacterial and mycotic substrate contamination in samples was provided. Dominant isolates of opportunistic microflora were isolated into pure cultures and identified. The mechanisms of biotic pressure exerted by foreign organisms on shiitake mycelium were established. The scientific novelty lies in the comprehensive biotechnological approach to evaluating the microbiological purity of the strain IBK-516 substrate at commercial production facilities in the Kyiv region.

Recommendations for use: The developed technological guidelines and preventive measures to reduce substrate contamination risks based on the research results can be used at commercial mushroom cultivation enterprises to increase the yield of xylotrophic macromycetes and minimize the biotic stress of the culture.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	10
1.1. Загальний огляд галузі світового грибівництва <i>L. edodes</i>	10
1.2. Загальна біологічна характеристика шиїтаке.....	11
1.3. Методи та особливості культивування <i>L. edodes</i>	14
1.4. Взаємодія <i>L. edodes</i> з біотичними компонентами середовища та функціональні відхилення за умов стресу	16
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	19
2.1. Характеристика об'єкта дослідження та технологічні умови його культивування.....	19
2.2. Характеристика промислового штаму <i>L. edodes</i> та аналіз потенційних біотичних загроз	23
2.3. Методика проведення мікробіологічного аналізу та підготовка живильного середовища.....	27
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	31
3.1. Структурно-морфологічний аналіз розвитку субстратних блоків за умов біотичного стресу	31
3.2. Кількісна оцінка структури мікробіому субстрату, рівень ураження сторонньою мікрофлорою	35
3.3. Біологічна характеристика ізолятів мікроорганізмів субстратного комплексу.....	37
3.4. Вплив мікробних контамінантів на вегетативний розвиток та плодоношення <i>L. edodes</i>	39
ВИСНОВКИ	45
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	47

ВСТУП

Актуальність теми. Століттями гриби відігравали важливу роль у сфері харчування, традиційної медицини та культури людства. Останнім часом їхній статус помітно трансформувався: макроміцети стали стратегічним компонентом для розробки новітніх лікарських засобів і багатофункціональною основою для впровадження інноваційних рішень у промисловості. Завдяки високому вмісту білків, полісахаридів та цінних вторинних метаболітів, гриби є відмінним джерелом поживних речовин. Сучасні дослідження підтверджують, що вони мають виражені антибактеріальні, протипухлинні, імуномодуючі та нейропротекторні властивості. На тлі нинішніх соціально-економічних тенденцій використання грибною сировини в харчовій та фармацевтичній галузях відкриває нові перспективи для розробки продуктів із заданими лікувально-профілактичними властивостями [1].

Поза межами дієтології та медицини, сучасна мікологія може застосовуватися у вирішенні глобальних екологічних та індустріальних викликів. Гриби активно застосовуються у сфері біоремедіації, виступаючи ефективними «біофабриками» для виробництва ферментів. Окремим перспективним напрямком є використання грибних біополімерів для створення екологічно безпечних пакувальних матеріалів і структурних елементів, а також здатність багатьох видів утилізувати й перетворювати сільськогосподарські відходи на біопаливо та цінні промислові ресурси [2].

Серед культивованих макроміцетів гриб *L. edodes* посідає одне з провідних місць, а обсяги його виробництва у світі стрімко зростають. Цінність *L. edodes* зумовлена його унікальним статусом продукту, який поєднує високі смакові якості з доведеним терапевтичним ефектом. Багатий хімічний склад, що містить незамінні амінокислоти, вітаміни та біоактивні полісахариди, робить цей гриб важливою сировиною для створення функціональних добавок і сучасних біотехнологічних продуктів [3].

Як і будь-яка інша промислово культивована біологічна система, *L. edodes* характеризується специфічними фізіологічними потребами та високою

чутливістю до умов навколишнього середовища. В умовах інтенсивного культивування критична проблема – вплив біотичних факторів. Зокрема сторонньої бактеріальної та мікотичної мікрофлори. Вона діє як деструктивний чинник, що спричиняє контамінацію субстрату, а також пригнічує розвиток міцелію. Це призводить до значних втрат урожаю. Відсутність універсальних систем моніторингу чистоти лігноцелюлозного субстрату в штучних умовах зумовлює актуальність комплексних досліджень для оптимізації захисту культури промислового штаму ІВК-516.

Мета кваліфікаційної роботи: комплексне вивчення та оцінка впливу біотичних факторів на ріст і розвиток *L. edodes*, а також розгляд причинно-наслідкових взаємозв'язків між ними як деструктивного чинника та ключової проблеми, що виникає в процесі інтенсивного промислового культивування цієї культури.

Об'єкт дослідження: процеси інтенсивного промислового культивування штамів гриба *L. edodes* на лігноцелюлозних субстратних блоках.

Предмет дослідження: конкретні особливості, характер і механізми впливу сторонньої бактеріальної та мікотичної мікрофлори на вегетативний розвиток міцелію та продуктивність промислового штаму ІВК-516.

Завдання дослідження: Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

- Вивчити та провести порівняльний візуально-структурний моніторинг експериментальних субстратних блоків промислового штаму ІВК-516;
- Встановити кількісну характеристику ступеня бактеріальної та мікотичної контамінації лігноцелюлозного субстрату в досліджуваних зразках;
- Виявити та відібрати осередки ураження лігноцелюлозної основи для подальшого виділення умовно-патогенної мікрофлори контамінованого субстрату в чисту культуру;

- Описати особливості росту, підібрати диференційовано-діагностичні поживні середовища для вирощування, ізоляції та первинної ідентифікації домінуючих ізолятів сторонньої мікрофлори;
- Обґрунтувати причинно-наслідкові механізми біотичного тиску на міцелій шийтаке та розробити технологічні рекомендації щодо зниження ризиків контамінації при промисловому вирощуванні грибів.

Методи дослідження. Для вирішення поставлених завдань було використано комплекс методів: порівняльний візуально-структурний аналіз субстратних блоків; мікробіологічні методи ізоляції мікроорганізмів у чисту культуру на диференційовано-діагностичних поживних середовищах; кількісний аналіз ступеня контамінації лігноцелюлозного субстрату; методи аналізу та синтезу науково-технічної інформації.

Практична значущість результатів. Отримані розробки мають безпосереднє значення для промислового грибовництва. Сформульовані технологічні рекомендації та заходи щодо зниження ризиків контамінації субстрату можуть бути використані на підприємствах галузі з метою мінімізації біотичного стресу культури, запобігання браку субстратних блоків та підвищення врожайності ксилотрофних макроміцетів.

Апробація результатів. Результати дослідження були представлені на наукових конференціях, таких як міжнародна наукова конференція «АКТУАЛЬНІ ПИТАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ, ЕКОЛОГІЇ ТА ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ» (16-17 квітня 2026 р., м. Харків), V Всеукраїнська науково-практична конференція здобувачів вищої освіти «Досягнення та перспективи в захисті та карантині рослин» (19 травня 2026 р., м. Київ), XXI Міжнародна науково-практична конференція студентів, аспірантів і молодих вчених «Екологія – філософія існування людства» (22-23 квітня 2026 р., м. Київ). Публікація матеріалів за результатами цих заходів сприяла глибшому аналізу досліджуваної теми, дала змогу чіткіше окреслити межі дослідження та апробувати окремі наукові висновки.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальний огляд галузі світового грибівництва *L. edodes*

Історія культивування *L. edodes* бере свій початок близько 1000 р. н.е., в Китаї. Це робить його третім видом грибів в історії (після *Auricularia auricula-judae* (Bull.) Quél та *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer), який людина почала штучно вирощувати. Метод “шоку” – найдавніша технологія культивування даного виду, вона передбачає вирощування шийтаке на деревних колодах [4].

Важливою точкою в історії культивування *L. edodes* стало поширення грибівництва з Китаю до Японії, де традиційні підходи було вдосконалено завдяки науковим дослідженням. Вважається що це сталося приблизно через 400-500 років після винайдення методу “шоку”. Крім того, Японія стала піонером у започаткуванні спеціалізованих наукових інституцій, таких як Інститут мікології Тотторі. Така діяльність дозволила Японії протягом тривалого часу утримувати світове лідерство за технологічністю та якістю культивування *L. edodes* [4].

Стрімкий розвиток у галузі спостерігався у 1970-1980-ті роки. В цей період часу відбувся масштабний перехід від екстенсивного методу вирощування на деревних колодах до інтенсивних технологій. Ключовим рішенням стало впровадження методу “синтетичних колод”, що дозволяв отримувати врожай вже за декілька місяців. Це зумовило перехід грибівництва на промислові масштаби [4, 5].

Ринок *L. edodes* росте в середньому на 8,7% у рік. Китай лідирує з-поміж понад 60 країн що займаються культивуванням даного виду. На його частку припадає понад 98% світового виробництва. У 2022 році в Китаї було вироблено приблизно 12.96 млн тонн грибів *L. edodes*. Інші країни, відповідно, сильно поступаються показниками [6].

Історично, у країнах західної півкулі домінували печериці (*Agaricus bisporus* (J. E. Lange) Imbach). Проте попри беззаперечне лідерство східної Азії, протягом ХХІ століття у місцевому грибівництві спостерігається активна

інтеграція культивування *L. edodes*. У США сегмент “спеціальних грибів”, куди входить шіїтаке демонструє демонструє стабільні показники. Схожа ситуація спостерігається в Канаді, там їх частка разом з іншими екзотичними грибами становить близько 2% від загального ринку. Щодо Європи, на яку припадає відносно велика частка грибів, особлива увага приділяється диверсифікації фермерських господарств. Наприклад у Швейцарії культивування *L. edodes* стає важливою альтернативою традиційному грибівництву. Глобальний розвиток галузі супроводжується пошуком нових субстратних формул, тому що дефіцит деревини та тирси спостерігається навіть у Китаї. Активно практикується використання альтернативної сільськогосподарської сировини як субстрату для культивування [7].

Таблиця 1.1.

Об’єми культивування *L. edodes* у світі (Cao B., Zhang Y., Gao B., 2024)

Рік	Китай, · 10 ⁶ т	Японія, · 10 ⁴ т	Пд. Корея, · 10 ⁴ т	США, · 10 ³ т	Інші, · 10 ⁴ т	Світ, · 10 ⁶ т	Частка Китаю, %
1974	0,001	13,514	0,003	—	0,167	0,143	~1%
1985	0,055	22,730	2,340	—	0,940	0,359	15,3%
1995	0,583	15,520	1,900	—	1,800	0,799	73,0%
2005	2,430	10,610	3,936	—	10,000	2,675	90,8%
2015	7,671	9,460	3,088	4,271	10,000	7,901	97,1%
2017	9,968	9,507	3,069	4,961	10,000	10,199	97,7%
2018	10,436	11,220	3,060	3,144	10,000	10,682	97,7%
2019	11,163	9,610	2,889	3,144	10,000	11,391	98,0%
2020	11,886	9,330	2,676	3,284	10,000	12,110	98,1%
2021	12,962	9,322	2,706	3,364	10,000	13,185	98,3%
2022	12,960	8,987	2,239	3,633	10,000	13,176	98,4%

1.2. Загальна біологічна характеристика шиїтаке

Гриб *L. edodes* має відносно складну таксономічну історію, що є наслідком постійного вдосконалення критеріїв класифікації грибів. Вперше був описаний Майлзом Джозефом Берклі у 1877 р. під назвою *Agaricus edodes*. Після цього, внаслідок розвитку морфологічних підходів, вид багато раз перекласифіковувався. У 1976 р. британський міколог Девід Пеглер переніс вид до роду *Lentinula*, надавши йому нині актуальну назву *Lentinula edodes* [5]. Гриб має таке таксономічне положення:

Царство: Гриби (*Fungi*)

Відділ: Базидіомікотові (*Basidiomycota*)

Клас: Агарикоміцети (*Agaricomycetes*)

Порядок: Агарикальні (*Agaricales*)

Родина: Маразмієві (*Marasmiaceae*)

Рід: Лентинула (*Lentinula*)

Вид: Шиїтаке (*Lentinula edodes* Berk.)

L. edodes – сапрофітний гриб, що живиться органічними рештками рослинного походження. Протягом росту, його міцелій виділяє позаклітинні ферменти. Вони забезпечують розщеплення складних компонентів субстрату, таких як целюлоза, геміцелюлоза, лігнін, до більш простих сполук, що доступні для засвоєння. На рівні з іншими базидіальними грибами, для шиїтаке характерна наявність вегетативного тіла – міцелію, й репродуктивного органа – плодового тіла. Воно формується на субстраті й відповідає за функцію утворення та поширення спор, які забезпечують розмноження гриба [4].

Для *L. edodes* характерна варіабельність морфологічних ознак. Вони є безпосередньо залежними від умов зростання та віку плодових тіл. У молодому віці шапинка – темно-коричнева (майже чорна), в ході старіння змінює своє забарвлення до червонувато-коричневого. Можливою є поява світлих лусочок на поверхні. Розмір шапинки може коливатися в межах 4,5-25 см. На ранніх стадіях росту форма напівкуляста, з часом стає опуклою або навіть майже плоскою.

Пластинки спочатку світлі та рівні, проте з плином часу здатні набувати темнішого відтінку та своєрідної зубчастості. Ніжка щільна, волокниста, довжиною 2,5-5,5 см, може бути як прямою, так і дещо зміщеною. Міцелію на початкових стадіях розвитку притаманне біле або кремове забарвлення, потім може темніти, стаючи також більш щільним. Споривий порошок світлий, спори овально-еліпсоїдні, безбарвні, гладкі, розмірами $5,5-6,5 \times 3-3,5$ мкм [8].



Рис. 1.1. Плодові тіла *L. edodes*

L. edodes характеризується високою харчовою цінністю завдяки багатому хімічному складу. Є джерелом харчових волокон, що сприяють нормалізації травлення [10].

Плодові тіла містять значну кількість білка. У перерахунку на суху речовину це близько 15-25%. Амінокислотний склад включає всі незамінні амінокислоти, які є необхідними для організму людини. Гриби містять калій, фосфор і магній [11]. Вміст жирів у шиїтаке – низький, проте містять корисні поліненасичені жирні кислоти. У їх складі наявні вітаміни групи В, які відіграють важливу роль у метаболічних процесах [12]. Основну частину вуглеводів становлять полісахариди, зокрема β -глюкани [13].

L. edodes розглядається як цінне джерело біологічно активних сполук, це обумовлює його високе медичне значення. Полісахариди, зокрема β -глюкани, що містяться у плодових тілах, проявляють імуномодулюючі властивості. Вони здатні активувати клітини імунної системи [13]. Доведено, що сполуки які містяться у шиїтаке можуть застосовуватися як допоміжні засоби в

протиухлинній терапії. Відповідно, шиїтаке розглядається як перспективне джерело природних сполук для профілактики, а також комплексної терапії низки захворювань [14]. У складі грибів також міститься еритаденін. Це речовина, що сприяє зниженню рівня холестерину в крові шляхом регуляції ліпідного обміну [15]. Крім того, біоактивні компоненти шиїтаке проявляють антиоксидантні властивості, що пов'язано з їх здатністю зменшувати оксидативний стрес [12].

1.3. Методи та особливості культивування *L. edodes*

Метод “шоку” – найперший, розроблений людиною, метод штучного вирощування *L. edodes*. Стародавні грибники робили зарубки на колодах та здійснювали по них удари за допомогою дерев'яних молотків. Така процедура стимулювала ріст міцелію через вібрацію, а також сприяла збільшенню доступу повітря до пошкоджених ділянок. Користь такого “шоку” полягає у тому що це активує перехід міцелію від вегетативного росту до репродуктивної фази. Це дозволяє отримати значно більший врожай. Щодо сучасного вирощування, окрім механічного биття, для досягнення “шоку” широко практикуються: різке коливання температури, освітлення, вологості. Разом із традиційним замочуванням колод у воді, підхід обумовлює необхідний рівень стресу для масової появи зачатків плодових тіл [4].

В індустрії культивування *L. edodes* відбувся перехід від традиційної методології з використанням натуральної деревини до використання “синтетичних колод”. Етап став можливим завдяки розвитку технологій з використанням чистих культур міцелію [16].

Сучасний метод галузі – інтенсивна технологія вирощування *L. edodes* у мішках. Такий підхід дозволяє кратно прискорити цикл виробництва, а також підвищити врожайність порівняно з традиційним методом у якому фігурують натуральні колоди. Основний субстрат методу – тирса. Її змішують з поживними добавками, такими можуть виступати наприклад висівки чи соєве борошно, та гіпсом (з метою регуляції рівня кислотності). Підготовка субстрату передбачає його зволоження до 60-70%. Обов'язковою частиною є термічна обробка: стерилізація паром проводиться при 97-100% протягом 8-10 годин.

Альтернатива – автоклавування під тиском. Після того як субстрат охолоджується до температури нижче 25°C, проводиться інокуляція чистими культурами міцелію. Процедура здійснюється згідно дотримання асептичних вимог. Етап інкубації по часу займає близько 1-2 місяців, підтримується температура 25°C. На етапі розростання міцелію, поверхня субстрату поступово набуває коричневого забарвлення. Явище свідчить про готовність плодоношення. З метою ініціювання появи грибів, блоки піддають температурному шоку та здійснюють інтенсивне зволоження. Дана процедура дозволяє отримувати декілька хвиль урожаю протягом року. Метод забезпечує біологічну активність у діапазоні 50-100%. Наразі розглядається як найбільш економічно вигідний для промислового виробництва [17].

Задля інтенсифікації виробництва необхідно строго дотримуватися оптимальних фізико-хімічних параметрів середовища. Зокрема, йдеться про фракційний склад тирси, мінеральне збагачення. Розмір часток субстрату визначає його пористість. Оптимальна фракція тирси запобігає надмірному ущільненню блока, це забезпечує ліпшу аерацію та вільний доступ кисню. Ці аспекти є життєво важливим для дихання міцелію. Окремим технологічним етапом можна виділити процедуру внесення мінеральних добавок. Зазвичай це гіпс чи крейда. Вони виконують подвійну функцію: виступають як джерело кальцію, слугують рН-буфером [18, 19].

Важливо також відмітити, що рівень аерації та концентрації діоксиду вуглецю є критичними факторами, що відіграють свою роль на різних етапах культивування. Під час активного росту міцелію, *L. edodes* споживає значну кількість кисню. Якщо порівнювати з іншими видами грибів, то потреба в O₂ є вищою. Для метаболізму міцелію характерними є значні виділення CO₂ [20].

Синє світло – ключовий екологічний регулятор морфогенезу. Даний чинник ініціює каскад метаболічних змін на молекулярному рівні. Порівняльний аналіз демонструє що під впливом синього спектра відбувається диференціальна експресія 22 типів білків що відповідають за енергетичний обмін, стресостійкість гриба, синтез нуклеїнових кислот. Зокрема, фотостимуляція здійснює активацію

білків, що залучені до метаболізму вуглеводів і виробництва АТФ. Це необхідно для формування плодового тіла. На морфологічному рівні, вплив синього світла – обов’язкова умова для формування пілеуса та темно-коричневої пігментації шапинки [21].

Для успішного культивування *L. edodes* критично важливим фактором є дотримання оптимального співвідношення вуглецю та азоту в субстраті. Баланс цих елементів є фактором, що визначає доступність енергії та азоту для синтезу білків і росту міцелію. Субстрати з нижчим співвідношенням С : N сприяють більш швидкій колонізації та кращому врожаю грибів, а надлишок лігноцелюлозних компонентів обмежує розвиток гриба через меншу доступність азоту та повільне зростання міцелію [19].

1.4. Взаємодія *L. edodes* з біотичними компонентами середовища та функціональні відхилення за умов стресу

Для життєдіяльності *L. edodes* у природних та штучних екосистемах, характерним є безперервний контакт з різноманітними біотичними компонентами. Це формує складну мережу міжвидових взаємодій. Відповідно, один із критичних аспектів такого співіснування – постійна боротьба за обмежені ресурси субстрату. Гриб змушений весь час конкурувати з іншими видами. Як наслідок, трофічне суперництво, що виникає в таких умовах – потужний стресовий фактор для *L. edodes*, що здатен викликати значні функціональні відхилення. Зокрема, динаміка взаємодії міцелію *L. edodes* з патогеном *Trichoderma harzianum* Rifai дозволяє встановити залежність від хімічної структури субстрату, а саме – від концентрації та природи джерел азоту й вуглецю. Кількісний вміст азотистих сполук (зокрема казеїнових амінокислот) фактор що модулює рівень опірності гриба. Занадто велика концентрація азоту в середовищі безпосередньо корелює зі зростанням індексу тяжкості ураження культури конкурентом [22].

Взаємодія міцеліальної маси *L. edodes* із представниками роду *Trichoderma* веде до глибокої перебудови профілю екстрацелюлярної секреції в оточуючому субстраті. Дослідження на лігноцелюлозних субстратах демонструють: за умов

подібного біотичного пресингу фіксується аномальна стимуляція комплексу полісахаридаз. Зокрема – целюлази, ксиланази, β -глюкозидази. Дане явище породжується агресивною ферментативною експресією патогена. Вона спрямована на деструкцію не тільки компонентів середовища, а й клітинних стінок самого шийтаке. Специфічне функціональне відхилення у метаболізмі *L. edodes* за умов індукції стресу – істотне інгібування його ростових процесів, що верифікується через зниження активності Mn-залежної пероксидази. Це ключовий фермент лігнінолітичного комплексу його продукція прямо корелює з динамікою накопичення біомаси гриба [23].

Поряд із трофічним антагонізмом, у лігноцелюлозних екосистемах важливим є явище бактеріального синергізму. Зокрема, воно здатне виступати позитивним модулятором процесів деструкції субстрату. Дослідження модельних консорціумів за участю грибів-деструкторів, а також специфічних бактеріальних штамів (зокрема такі роди як *Citrobacter* та *Sphingobacterium*) дозволило виявити механізм "пілінг-синергізму". Стратегія базується на ферментативній комплементарності. Поєднання ксилозидаз та целлобіогідролаз забезпечує пошарове розщеплення лігноцелюлозного матриксу, що істотно підвищує ефективність деградації порівняно з ізольованими культурами [24].

Особливе місце у системі міжвидових взаємодій *L. edodes* посідають бактерії роду *Pseudomonas*. Характер їх контактів варіює від патогенезу до активного бактеріолілізу. Встановлено, що агресивні штами *Pseudomonas tolaasii* Paine здатні викликати лізис тканин плодових тіл. Це супроводжується їх побурінням та формуванням некротичних заглиблень [25].

Важливий чинник біотичного стресу для *L. edodes* – ураження міковірусами. Зокрема представником роду *Betapartitivirus* – *Lentinula edodes partitivirus 1* (LePV1). Дослідження штаму SX12 підтверджують: наявність вірусу LePV1 безпосередньо асоціюється з тяжким виродженням міцелію гриба, а також з нездатністю культури до формування плодових тіл. Одним із ключових функціональних відхилень за умов такої вірусної інфекції є порушення процесу

побуріння субстрату в мішках. Із нормального воно стає недосконалим. Це критично впливає на розвиток грибниці [26].

Розвиток *L. edodes* прямо залежить від здатності розщеплювати компоненти деревини, а це полегшуватися завдяки синергічній взаємодії з певними бактеріями. Присутність деяких термостійких мікроорганізмів, зокрема родів *Paenibacillus* та *Bacillus* – біотичний фактор, що сприяє деструкції субстрату. Такого роду біологічна допомога дозволяє гіфам гриба швидше проникати у лігноцелюлозний комплекс. Це явище скорочує термін початку колонізації на 3-4 дні порівняно зі стерильним субстратом [27].

Атаки шкідників можуть призводити до значних втрат врожаю. Явище характеризується порушеннями на етапах колонізації субстрату та формування плодових тіл. Основну загрозу становлять такі представники: *Coleoptera* (родини *Bostrichidae*, *Staphilinidae*, *Dermestidae* та жуки-грибоїди роду *Dacne*), *Diptera* (*Sciaridae*, *Mycetophilidae*, *Calliphoridae*), а також гусениці *Stenomatidae*, мурахи *Formicidae*, колемболи, нематоди та кліщі. Цей комплексний біотичний тиск не лише руйнує тканини гриба, він пригнічує ріст міцелію, знижує імунітет грибниці, стаючи першопричиною розвитку вторинних патогенів. Відтак, успішна культивування за рустикальними технологіями вимагає суворого дотримання гігієнічних норм для мінімізації ризиків пошкодження [28].

Щодо нематодів, їх взаємодія з *L. edodes* базується на унікальній здатності гриба до хижацтва. Гриб здатен активно пригнічувати таких паразитів, як наприклад *Panagrellus* чи *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhrer) Nickle. Використовуючи арсенал токсинів та гідролітичних ферментів, грибниця фактично паралізує шкідників, а відпрацьований субстрат здатен знищити понад 70% личинок протягом перших кількох діб. Ця природна нематофагова активність – критичний інструмент біологічного контролю, що захищає цілісність міцелію. Проте без належного нагляду, надмірний тиск фітонематод може виявитися сильнішим за захисні механізми гриба. Зрештою це призведе до виснаження його імунітету та подальшої деградації культури [29].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Характеристика об'єкта дослідження та технологічні умови його культивування

Вихідний матеріал для проведення досліджень – субстратні блоки гриба *L. edodes*. Вони були відібрані на базі одного із промислових грибівничих господарств міста Києва. У дослідженні фігурував штам ІВК-516. Здатність до інтенсивного плодоношення, висока адаптивність – риси завдяки яким він використовується у вітчизняному грибівництві. Об'єкти були отримані з виробничої ділянки, на стадії першої хвилі формування плодових тіл. Важливо зазначити: відібрані блоки належали до однієї партії виготовлення. Вони мали ідентичний склад субстрату, перебували в однорідних мікрокліматичних умовах камер вирощування (температура, рівень вологості, освітлення та аерація). Такі обставини дозволили нівелювати вплив зовнішніх факторів середовища, та зосередити увагу на внутрішніх біотичних чинниках, які зумовлювали різницю біологічної продуктивності субстратних блоків у межах однієї технологічної партії.

На досліджуваному підприємстві *L. edodes* культивується інтенсивним методом, із використанням синтетичних колод. Це найбільш прогресивна технологія в сучасному грибівництві. Основа субстрату – подрібнена тирса листяних порід дерев (переважно дуб, бук). Вона збагачується поживними добавками органічного походження з метою забезпечення потрібного вуглецево-азотного співвідношення. Оптимальний баланс поживних речовин, а також фізико-хімічні властивості субстратної суміші забезпечувалися суворим дотриманням технологічного регламенту її приготування. Компонентний склад експериментального субстрату у відсотковому співвідношенні до загальної сухої маси: подрібнена тирса дуба та бука (у пропорції 1:1) – 80%, висівки пшениці – 18%, крейда (кальцію карбонат) – 1% та гіпс (кальцію сульфат) – 1%. Висівки слугували джерелом органічного азоту, вітамінів групи В та легкозасвоюваних вуглеводів. Внесення крейди та гіпсу відбувалося для стабілізації структури

субстрату, підтримання оптимального рН суміші (в межах значення 5,8-6,2), що є сприятливим для активного росту первинного міцелію *L. edodes*. Вихідна вологість готового субстрату перед початком стерилізації та пакування у поліпропіленові пакети становила 62-64%. Такий показник повністю відповідає фізіологічним потребам даного штаму на етапі вегетативного росту. Технологічний регламент передбачає стерилізацію сформованих блоків вагою 2,5-3 кг. Після цього – інокуляція чистими культурами гриба в асептичних умовах. Процес інкубації міцелію триває до повної колонізації субстрату. Потім блоки переносяться в камери плодоношення. Там, шляхом зміни режимів температури та вологості ініціюється вихід плодових тіл.



Рис. 2.1. Вирощування *L. edodes* на багатоярусних стелажних конструкціях

Стерилізація проводилась у спеціальних автоклавних камерах. Процес відбувався протягом 12 годин при 100 °С та нормального атмосферного тиску. При дотриманні всіх вимог, такі умови забезпечують повне знищення конкурентної мікрофлори у всьому об'ємі субстратного блоку. Після закінчення термообробки, блоки залишали в герметичній камері для поступового охолодження, до температури 24-25 °С. Вона є безпечною для внесення посівного міцелію. Після цього блоки транспортували в асептичну зону для подальшої інокуляції.

Для інокуляції готового субстрату використовували зерновий посівний міцелій. Попередньо він вирощувався на зерні пшениці твердих сортів. Перед

внесенням, обов'язковим пунктом є візуальний та мікробіологічний контроль якості міцелію. Якісний, здоровий посівний матеріал має такий вигляд: рівномірно колонізована зернова маса, повністю охоплена щільним, білим, міцелієм. Характерним є приємний грибний аромат. Неприпустимою є наявність поверхневих виділень або зон бактеріального чи мікотичного зараження. Норма внесення посівного міцелію – 3-4% від загальної вологої маси субстратного блока. Інокуляцію здійснювали в асептичних умовах ламінарного боксу, дотримувалися всі правила стерильності для запобігання випадкової контамінації.

Важливо відмітити що саме по собі інтенсивне культивування проводилося при чітко дотриманих умовах мікроклімату, що різнився залежно від фази. Інкубація міцелію тривала 45-50 діб, в темноті. Температура повітря стала, 22°C. Відносна вологість становила 65-70, концентрація вуглекислого газу – до 2500 ppm. Блоки піддавали температурно-вологісному шоку Після цього їх переправляли в камери вирощування. У період диференціації примордіїв і подальшого росту плодових тіл підтримували температуру 16 °C, відносна вологість повітря становила 85-90%, концентрація CO₂ – 800-1000 ppm. Також обов'язковою умовою було забезпечення штучним освітлення інтенсивністю 300-400 люкс. Фотоперіод – 9 годин на добу.

Таблиця 2.1.

Регламент мікрокліматичних умов культивування *L. edodes*

Технологічний етап / Фаза	Температура повітря, °C	Відносна вологість, %	Концентрація CO ₂ , ppm	Освітленість, люкс / фотоперіод
Інкубація міцелію (45–50 діб)	22	65-70	до 2500	Темрява
Ініціація плодоношення (Шок, 12 год)	14-15	100 (замочування)	—	—
Диференціація примордіїв та ріст	16	85-90	800-1000	300-400 лк / 9 год

З метою проведення контролю якості та моніторингу виробничого процесу на підприємстві здійснюється багатоетапна перевірка субстратних блоків. Вона проводиться на кожній стадії культивування. Первинний контроль – безпосередньо після термічної обробки. Вимірюється температура всередині блоку, здійснюється експрес-аналіз рівня рН, а також вологості субстратної суміші. На етапі інкубації блоки піддаються регулярному візуальному огляду кожні 3-5 діб. Мета – оцінка швидкості та характеру колонізації субстрату міцелієм, а ще, для раннього виявлення можливих вогнищ конкурентної мікрофлори. Перед перенесенням у камери плодоношення проводиться фінальне дефектування партії. Під час нього оцінюється ступінь щільності міцеліального матриксу та рівень «коричневіння» поверхні блоків. Рівень коричневіння – головний індикатор фізіологічної зрілості грибниці та її готовності до продуктивної фази.



Рис. 2.2. Блок-схема технологічного циклу інтенсивного культивування шийтаке

Під час огляду субстратних блоків було виявлено певну нерівномірність у розвитку та формуванні плодових тіл штаму ІВК-516. Більша частина блоків демонструвала високу біологічну врожайність та активне утворення примордіїв, але окремі одиниці субстрату мали ознаки пригнічення росту. Зокрема, спостерігалася низька щільність плодоношення. Це не відповідало загальним показникам даної технологічної серії. Оскільки всі об'єкти культивувалися при однакових умовах – виявлена нерівномірність стала підставою для подальшого

лабораторного аналізу, а також проведення мікробіологічних досліджень з метою з'ясування ймовірної причини виникнення даного явища.

2.2. Характеристика промислового штаму *L. edodes* та аналіз потенційних біотичних загроз

Штам ІВК-516 характеризується високою адаптивною здатністю і стабільною врожайністю на різних типах лігноцелюлозних субстратів. Йому притаманне формування плодових тіл високої щільності по поверхні блоку. Має виражені характеристики для комерційного штаму. Якщо дотримуватися умов інтенсивного повітрообміну та помірних температур – штам дозволяє отримати масовий врожай плодових тіл середнього розміру, з темним забарвленням шапинки. В разі зниження інтенсивності вентиляції та підтримці більш високого температурного режиму – спостерігається збільшення розміру плодових тіл і зміна текстури їхньої поверхні.

Найкращим чином плодоношення штаму активізується, якщо концентрація вуглекислого газу тримається у межах 800-1200 ppm. Застосування методу «температурного шоку» (різке зниження температури на 5-7°C) стимулює одночасне закладання великої кількості примордіїв. Підхід забезпечує вищу врожайність першої та подальших хвиль. М'який режим ініціації сприяє формуванню великих, м'ясистих плодових тіл. Така продукція має підвищений попит на ринку.

Шапинки технічно зрілих грибів зазвичай коливаються від п'яти до десяти сантиметрів у діаметрі. Форма – спочатку напівкуляста, з віком стає більш плоскою, із підігнутим краєм. Забарвлення – каштаново-коричнєве. Поверхня вкрита численними світлими лусочками. Гіменофор – пластинчастий, густий, білого або кремового кольору. Якщо зазнає механічного пошкодження, то злегка буріє. Ніжка гриба може бути центральною або ексцентричною; циліндрична, волокниста, довжиною 3-6 см та діаметром 1-1,5 см. Забарвлена в тон шапинки, проте має світліший відтінок біля основи. М'якуш плодових тіл білий, не змінює кольору на зламі. Відрізняється вираженим специфічним ароматом та високою

щільністю – це забезпечує стійкість продукції до механічних ушкоджень під час збору та транспортування.

Штам однаково ефективно культивується як за інтенсивною технологією синтетичних колод, так і на натуральній деревині. Плодові тіла відзначаються тривалим терміном зберігання. Це робить їх ідеальними для реалізації у свіжому вигляді, а також для висушування та подальшої переробки.

Протягом етапу колонізації субстрату слід підтримувати температуру всередині блоку на рівні 24-26°C. Активне виділення метаболічного тепла зазвичай спостерігається на 14-20 добу інкубації, а перевищення температури субстрату понад 28°C призводить до пригнічення росту міцелію, порушення процесів ферментації, а також суттєво знижує загальну біологічну ефективність штаму.



Рис. 2.3. Плодоношення *L. edodes* штаму ІВК-516

Паралельно з тим як відбувається колонізація субстрату міцелієм – визначається склад супутнього мікробіому. Взаємодія між грибом та мікрофлорою може бути різною. Одні штами вступають у мутуалістичні відносини з *L. edodes*, стимулюючи його ріст та розвиток, інші – навпаки, зумовлюють трофічну конкуренцію та виступають інгібіторами. Дисбаланс у структурі мікробіому може призводити до нерівномірної швидкості колонізації блоків, навіть якщо це одна технологічна партія [27].

Важливо зазначити що штами які розглядаються для комерційної культивування зазвичай проходять тривалий селективний відбір. Визначаються такі аспекти як генетична стабільність штаму, інтенсивність росту вегетативного

міцелію, ступінь адаптивності до умов штучного культивування тощо. На грибівничих господарствах, таких як те що фігурує у дослідженні, ризик ураження штамів патогенами зведений до мінімуму. Такі умови забезпечуються суворим дотриманням стандартів асептики, регламентів щодо стерилізації субстрату ті іншими моментами. Проте, навіть якщо на перший погляд ознаки контамінації відсутні, об'єкт культивування весь час перебуває під впливом прихованих біотичних факторів. У товщі лігноцелюлозного субстрату здатні виживати чи вторинно проникати представники супутньої та умовно патогенної мікрофлори. На практиці, найчастіше такими представниками є бактерії родів *Pseudomonas* та *Bacillus*. Не вступаючи у відкритий паразитизм і не знищуючи гіфи вищого гриба напряду, мікроорганізми функціонують як латентні трофічні конкуренти. У періоди коли гриб зазнає гідротермічного стресу чи коли проходять зміни фаз розвитку гриба, бактерії здатні різко активізувати свій метаболізм. Тим самим, відбувається перехоплення легкодоступних вуглеводів та пригнічення ферментативної експресії гриба. Явище призводить до локального фізіологічного гальмування міцеліальної маси та зумовлює виражену нерівномірність, скучкованість плодоношення в межах однієї технологічної серії.

З метою проведення диференційованого аналізу та дефектування субстратних блоків у промисловому культивуванні *L. edodes*, прийнято застосовувати комплексну систему оцінки морфотипів. Аналізується загальна структура субстратного блоку, характер просторового розподілу примордіїв по всій площі субстрату. В нормі блоки характеризуються високою щільністю, монолітною структурою, рівномірним формуванням пігментованого захисного шару – кори покори́чневіння. Вона формується по всьому периметру, що забезпечує дружну, рівномірну, масову ініціацію плодових тіл під час першої хвилі плодоношення. Якщо говорити про протилежне, то загальними критеріями розвитку прихованої конкурентної бактеріальної мікрофлори є поява зон із пухким, неосвоєним або локально знебарвленим міцелієм. Також може спостерігатися вогнищева плямистість поверхні субстрату. Фізіологічне

пригнічення гриба на генеративній стадії можна чітко розпізнати за просторовим розташуванням відповідних органів. Якщо в нормі повинно спостерігатися рівномірне покриття, то у випадку відхилення від норми відбувається редукція робочої поверхні блоку. Також характерною є аномальна локальна скучкованість примордіїв. Це свідчить про глибокий трофічний дисбаланс. Диференціація тканин вищого гриба стає можливою лише в ізольованих мікронах субстрату, де міцелій зміг подолати метаболічний тиск з боку конкурентної бактеріальної мікрофлори.

У промислових умовах інтенсивного культивування *L. edodes* інвазії умовно-патогенної та конкурентної мікрофлори відбуваються через чітко диференційовані, типові вектори проникнення. Оскільки сучасні технологічні лінії передбачають жорстку термічну обробку субстратних компонентів, логічним джерелом контамінації є ендогенний шлях. Зазвичай він зумовлений технологічними відхиленнями під час стерилізації. Якщо був проведений нерівномірний прогрів внутрішніх шарів субстратного блока чи відбулося недотримання регламентованих умов стерилізації – спороутворюючі бактерії просто переходять у стан анабіозу. Після охолодження субстрату до 24-25 °C регенеративно активізуються та випереджають ріст внесеного посівного міцелію.

Ще один ключовий вектор – екзогенна контамінація аерогенним шляхом. Здатна відбуватися безпосередньо під час інокуляції, а також на початкових етапах інкубації. Хоч і практикується використання ламінарних систем, мікроскопічні потоки повітря здатні переносити клітини *Pseudomonas* spp. та спори цвілевих грибів. Часто це явище викликане турбулентністю та недостатньою ефективністю НЕРА-фільтрів. Мікроорганізми потрапляють на незахищену, багату на легкодоступні нутрієнти поверхню свіжоінокульованого субстрату та миттєва фіксуються.

Також окремим вектором виступає технологічний та антропогенний фактор під час проведення операцій із блоками. Контактна контамінація зазвичай відбувається через робочі поверхні стелажів, інструменти для перфорації, руки

персоналу. Це ще раз підтверджує важливість процедур дезінфекції. Особливу загрозу становить гідрогенний шлях. Він активізується на етапі ініціації плодоношення, вода, що використовується для тривалого 12-годинного замочування блоків, у промислових умовах рідко є абсолютно стерильною. За наявності мікроскопічних дефектів у захисній "корі" коричневіння, або при механічному пошкодженні блоків під час транспортування, бактеріальні клітини разом із водою проникають вглиб субстратного матриксу. Тим самим формуючи приховані вогнища конкуренції для штаму.



Рис. 2.4 Карта технологічних ризиків та вектори проникнення конкурентної мікрофлори в субстратний блок *L. edodes*

2.3. Методика проведення мікробіологічного аналізу та підготовка живильного середовища

Логіка експериментальної частини роботи базується на порівняльному аналізі мікробних спільнот двох зразків субстрату, що продемонстрували різну біологічну продуктивність у межах однієї партії. Основний план досліджу: визначити наявність та ступінь мікробіологічного ураження, що могло спричинити пригнічення росту та розвитку гриба. Для досягнення цієї мети було застосовано метод посіву на щільні живильні середовища з подальшим візуальним та морфологічним аналізом колоній. Після цього проводилося виділення чистої культури.

Приготування серійних розведень здійснювалося за класичним методом Коха. Наважка об'єднаної проби субстрату (маса 10 г) переносили у стерильну конічну колбу, в якій знаходилося 90 мл 0,9% розчину натрію хлориду. Суспензію струшували на орбітальному шейкері (15-20 хвилин). Мета – досягти максимального десорбування бактеріальних клітин із поверхні субстратних частинок. Отриманий зразок вважався базовим розведенням 10^{-1} . Потім, наступні серійні розведення готувалися шляхом послідовного перенесення 1 мл суспензії у пробірки з 9 мл стерильного фізрозчину. Отримуючи концентрації, відповідно, – 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} та 10^{-5} . Для висіву бактеріальної мікрофлори використовували розведення від 10^{-3} до 10^{-5} . Це забезпечувало формування зручних для подальшого підрахунку ізольованих колоній.

Належна увага приділялась стабілізації суспензії після механічного струшування. Досліджуваний субстрат містить значну кількість дрібнодисперсних органічних часток і лігнін-целюлозних комплексів, а вони здатні сорбувати клітини мікроорганізмів. Відмивання проводили в оптимізованому режимі, без утворення надмірної піни. Після завершення циклу на орбітальному шейкері грубі частки субстрату осаджували шляхом природного гравітаційного відстоювання протягом 3-5 хвилин в асептичних умовах ламінарного боксу. З метою подальшого приготування серійних розведень відбирали виключно верхню надосадову рідину. Це дозволило мінімізувати потрапляння макрочастинок у наступні пробірки. А також попередити механічне пошкодження дозаторів.

Поверхневий посів здійснювався шляхом внесення 0,1 мл отриманого зразку відповідного розведення на поверхню застиглого й попередньо підсушеного агаризованого середовища в чашці Петрі. Використовувалась мікропіпетка. Суспензію необхідно було рівномірно розподілити по всій поверхні середовища за допомогою використання стерильного скляного шпателя Дригальського до повного вбирання вологи. Щоб в результаті отримати статистично достовірний результат – висів кожної проби для кожного окремого

розведення виконували у трикратній повторності. Для кожної маніпуляції використовувався стерильний інструментарій.

Ключовим етапом роботи стало виділення потенційних патогенів із внутрішніх шарів субстратного блоку. Алгоритм досліджу передбачав такі дії:

1. Спочатку відбиралися зразки субстрату з обох, контрольного та дослідного блоків, в асептичних умовах. Зовнішні шари субстратних блоків попередньо оброблялися 70% розчином етилового спирту, після чого видаляли стерильним скальпелем на глибину 1-2 см. Це робилося з метою нівелювання фактору поверхневої контамінації. Відповідно, відбір експериментальних зразків здійснювали безпосередньо з внутрішніх шарів блока. Використовувався пробійник (щоб сформувати отвір) та стерильний анатомічний пінцет. Робота проводилась із дотриманням всіх вимог асептики, дії відбувалося в зоні ламінарного повітряного потоку над полум'ям спиртівки, використовуючи заздалегідь прожарений та охолоджений інструментарій. Відібрані фрагменти (маса близько 15-20 г) поміщали у стерильні скляні бюкси. Герметично закривали для проведення подальших аналізів. Приготування серійних розведень отриманих проб у стерильному фізіологічному розчині.
2. Проводилося здійснення посіву отриманих суспензій на поверхню агаризованого середовища методом поверхневого розселення.
3. Інкубація посівів при стабільній температурі для стимуляції росту колоній супутньої мікрофлори.

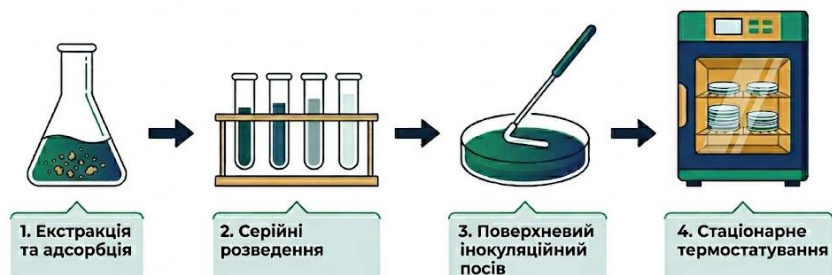


Рис. 2.5. Технологічна схема етапів серійного розведення та поверхневого посіву для аналізу субстратних мікробіому

Параметри культивування досліджуваних груп мікроорганізмів диференціювали залежно від використаного живильного середовища. Це робилося з міркувань врахування їх відмінностей у фізіології. Засіяні чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром розміщували в термостаті (догори дном) для запобігання конденсації вологи на поверхні агару, оскільки це могло б спричинити злиття колоній. Інкубацію бактеріальних контамінантів проводили за стабільної температури 30 °С, по часу – 24-48 години. В результаті було отримано чітко диференційовані колонії. Щодо чашок з картопляно-декстрозним агаром, вони були призначені для виявлення мікопатогенів та цвілевих грибів. Їх інкубували у затіненому термостаті, за умов нижчого температурного режиму (25 °С). Беручи до уваги повільніші темпи росту еукаріотичних мікроорганізмів, тривалість культивування на картопляно-декстрозному агарі становила 5-7 діб. Це дозволило забезпечити не лише формування колоній, а й розвиток їхніх характерних морфологічних ознак та репродуктивних структур, необхідних для подальшої ідентифікації.

Оскільки дослідження передбачало паралельний облік як бактерій так і мікроскопічних грибів – у роботі було використано два типи щільних живильних середовищ.

Для виділення та диференціації супутньої бактеріальної мікрофлори застосовувався стандартний м'ясо-пептонний агар. Значення рН – 7,2. Сухе середовище масою 40 г розчиняли в 1 л дистильованої води. Потім підігрівали до повного розчинення агару, після чого стерилізували в автоклаві за температури 121 °С (тиск 1,1 атм) протягом 20 хвилин.

Вибір зазначених живильних середовищ зумовлений їхньою селективністю та здатністю забезпечувати оптимальні трофічні потреби цільових груп мікроорганізмів. Нейтральне значення рН м'ясо-пептонного агару (7,2) є сприятливим для більшості бактеріальних контамінантів субстрату, зокрема представників родів *Pseudomonas* та *Bacillus*. Водночас картопляно-декстрозний агар завдяки високому вмісту доступних вуглеводів стимулює швидке відновлення та вегетацію мікроскопічних грибів.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Структурно-морфологічний аналіз розвитку субстратних блоків за умов біотичного стресу

Первинним етапом оцінки характеру біотичного впливу на життєдіяльність промислової культури *L. edodes* стало проведення детального структурно-морфологічного аналізу сформованих субстратних одиниць.



Рис. 3.1. Досліджувані зразки *L. edodes*

Зразок 1. Характеризується високою біологічною продуктивністю. На його поверхні спостерігалось масове, рівномірне утворення плодових тіл. Вони перебували на активній стадії розвитку, мали типовий зовнішній вигляд, а також високу щільність розміщення по всій площі блока. Зразок демонструє стабільні біотехнологічні показники.

Зразок 2. Блок із суттєвими ознаками пригнічення продуктивності. Кількість плодових тіл на ньому була значно меншою, а самі вони були дрібнішими порівняно з типовими. Також характеризувалися специфічною локалізацією в одному місці, незважаючи на перебування зразків у ідентичних мікрокліматичних умовах.

Встановлено: лігноцелюозна основа субстратного блока зразку 1 повністю, рівномірно колонізована гіфами вищого гриба. Для субстратної маси характерним є високий ступінь монолітності, щільна текстура, відсутність ознак деструкції. Не спостерігається розсипання при механічному контакті.

Варто також відмітити що контрольний зразок продемонстрував стабільні часові інтервали розвитку. Етапи повної колонізації субстрату, стадії утворення горбкуватих міцеліальних наростів та покори́чневіння проходили послідовно. Інтервалами часу в межах технологічної норми. Відповідно, це забезпечило своєчасний початок першої хвилі плодоношення. Щодо дослідного зразку, спостерігалось помітне зміщення термінів і загальне уповільнення зазначених етапів. Це підтверджувало вплив латентного біотичного тиску супутньої мікрофлори.

Колонізація субстрату проходила відносно повільно. Це відбувалося через постійне гальмування росту гіф екзотоксинами контамінантів. Первинна стадія утворення горбкуватих міцеліальних наростів мала млявий, неоднорідний характер, а формування захисної меланізованої кори проходило повільно. Спостерігаються ділянки де вона так і не сформувалася. Загальна хронологічна затримка переходу до етапу плодоношення свідчить про одне: значна частина внутрішніх метаболічних ресурсів міцелію *L. edodes* вимушено витрачалася не на закладання примордіїв та формування плодових тіл, вона витрачалася на біохімічний захист і подолання трофічного бар'єру, створеного контамінантами.

Особливу увагу привертає стан поверхневих покривів контрольного блока: вегетативний міцелій успішно пройшов стадію утворення горбкуватих міцеліальних наростів. В результаті сформував зрілу, суцільну кору кори́чневіння. Цей меланізований шар покриває понад 95% площі поверхні контрольного зразка, виконуючи бар'єрну функцію. Вона ефективно запобігає втраті вологи з глибинних шарів субстрату, а також нівелює ризики проникнення сторонніх інвазійних мікроорганізмів. Характер плодоношення контрольного блока визначається рівномірним закладанням примордіїв. Між ними спостерігається достатня відстань один від одного по всій поверхні субстратного блока. Це забезпечило формування правильної анатомічної форми шапинок і ніжок, високу біологічну ефективність першої хвилі плодоношення.

Якщо говорити про дослідний блок, було виявлено глибокі деструктивні зміни субстратної основи, спостерігалось виражене пригнічення міцелію *L.*

edodes. Це було зумовлено тиском супутньої мікрофлори. Візуально зафіксовано чітку неоднорідність зон пігментації, а ще локальне руйнування структури блока. Виявлено неокolonізовані ділянки. На них деревна тирса не освоєна гіфами, у цих зонах субстрат втратив монолітність. Він став пухким, набув ознак бактеріального гниття. Захисна кора коричневіння на дослідному блоці сформована фрагментарно.

Особливе значення має факт наявності "мокрих плям" на поверхні дослідного зразка. Фізико-хімічний стан лігноцелюлозної основи в цих зонах кардинально відрізнявся від монолітної структури контрольного зразка, відбувся процес глибокої мацерації субстрату – руйнування міжклітинних зв'язків тирси.

Текстура субстрату в місцях бактеріальних вогнищ набула слизистої, м'якої консистенції. Відбулось помітне потемніння (зміна кольору від світло-жовтого до глибокого темно-бурого). Ослизнення поверхні блоку призвело до блокування аерації у внутрішні шари блока. Це створило локальні анаеробні зони. Оскільки міцелій *L. edodes* є аеробом, виникнення локальних анаеробних умов у товщі перезволожених ділянок призвело до пригнічення клітинного дихання грибниці, що в свою чергу порушило транспорт поживних речовин до периферійних зон, викликало локальний некроз гіф. Це візуально підтверджується абсолютною відсутністю примордіїв.

Важливим етапом візуально-структурного аналізу стало виявлення та детальний опис специфічної просторової аномалії плодоношення – локальної скучкованості сформованих плодових тіл на дослідному зразку. Встановлено, що внаслідок потужного біотичного тиску супутньої мікрофлори та часткового фізіологічного лізису гіф, ефективна поверхня субстратного блока, здатна до плодоношення, скоротилася на 70-80%. Перехід вищого гриба *L. edodes* до генеративної фази розвитку, формування горбкуватих міцеліальних наростів та подальша поява повноцінних примордіїв стали біологічно можливими виключно в ізольованих, просторово обмежених мікронах.

Наслідком такого жорсткого просторового обмеження став аномальний, неприродний характер плодоношення. Якщо порівнювати з рівномірним

розподілом контрольного зразку – на дослідному блоці відбувся масовий вихід плодових тіл з однієї локальної зони лігноцелюлозної основи. Гриби змушені розвиватися у формі надзвичайно щільної, зрослої кучки. У ній спостерігається гострий брак вільного простору. Саме тому через взаємний механічний тиск у процесі росту більшість плодових тіл у цій кучці зазнали суттєвих морфологічних деформацій. Шапинки сплюснені, нерівномірно розвиваються. Отримані дані наочно доводять: супутня мікрофлора не лише пригнічує вегетативну масу гриба, вона повністю руйнує природну структуру плодоношення. Як наслідок – критичне зниження товарної якості та загальної врожайності культури.

Таблиця 3.1.

Структурно-морфологічні показники дослідних зразків субстратних блоків

Параметр структури	Зразок 1	Зразок 2
Ступінь колонізації субстрату	Повна, рівномірна	Часткова
Стан захисної кори блаунінгу	Суцільна	Фрагментарна
Стан закладання примордіїв	Рівномірний	Локальний
Морфологічні деформації	Відсутні	Присутні (більшість плодових тіл у кучці)
Текстура матриксу	Монолітна, щільна	Пухка, наявність “мокрих плям”

Якщо не брати до уваги візуальні показники, зафіксовано чітку диференціацію органолептичних показників субстрату. Субстратна маса зразку 1 мала виражений специфічний грибний аромат із нотами свіжої деревини. Він характерно виділяється здоровим міцелієм шийтаке. У товщі зразка 2 спостерігався стійкий затхлий запах із солодкуватим відтінком. Це є прямим наслідком накопичення бактеріальних екзометаболітів та свідчить про глибоку анаеробну деструкцію лігноцелюлозної основи контамінантами.

3.2. Кількісна оцінка структури мікробіому субстрату, рівень ураження сторонньою мікрофлорою

Наступний етап досліджень – кількісний та якісний аналіз структури мікробіому лігноцелюлозної основи досліджуваних зразків. Змиви субстрату досліджували за допомогою методу граничних розведень із посівом на поживні середовища. Оцінку рівня ураження виражали у кількості колонієутворюючих одиниць на один грам сухого субстрату. Для встановлення контамінації бактеріальною мікрофлорою було використано м'ясо-пептонний агар. Картопляно-декстрозний агар – для мікроскопічних грибів-конкурентів.

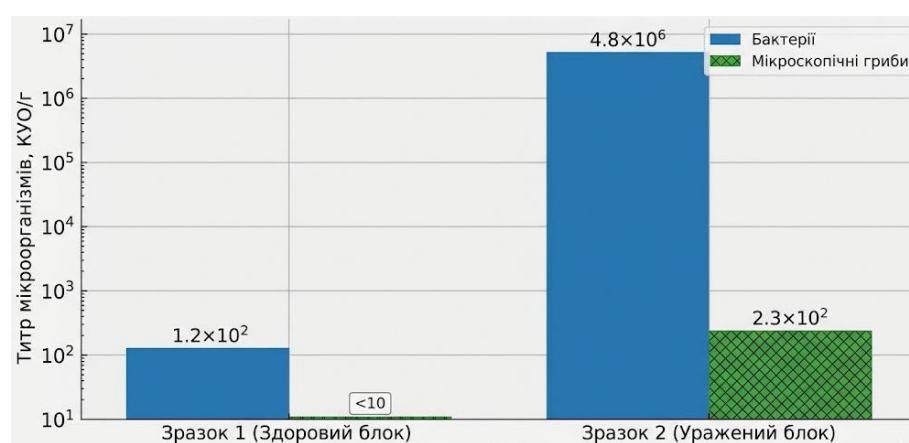


Рис. 3.2. Порівняння мікробіомів досліджуваних зразків

Після проведення аналізу можна зробити висновок що існує значна відмінність в рівнях бактеріального тиску між контрольним та дослідним зразками субстрату. Встановлено: у лігноцелюлозній основі зразка 1 загальний титр бактерій перебуває в межах екологічної норми. Він не перевищує ризикових значень. Присутня мікрофлора представлена переважно спороутворюючими сапротрофними паличками роду *Bacillus*. Зазвичай вони є природними компонентами нестерильної тирси та стримуються потужним антибіотичним та ферментативним бар'єром здорового міцелію шиїтаке.

Щодо дослідного зразка, ситуація зовсім відмінна. У змивах із зони "мокрих плям" було зафіксовано відносно високу щільність бактеріальних популяцій. Такий показник свідчить про глибокий бактеріоз субстрату. Первинний мікроскопічний аналіз ізолюваних колоній підтвердив домінування бактерій роду *Pseudomonas*.

Результати паралельного посіву на картопляно-декстрозний агар дозволили деталізувати структуру грибного пулу супутньої мікрофлори. У контрольних варіантах ріст мікроскопічних грибів-конкурентів був практично відсутній. Це вказує на високу фунгістатичну активність меланінізованої кори блаунінгу. Натомість у зразку 2 зафіксовано появу колоній пліснявих грибів, проте їхній загальний кількісний показник залишився на відносно низькому рівні. Титр мікопатогена на тлі колосального бактеріального фону низький – зелена пліснява не виступала першопричиною деструкції блока. Вона лише спробувала колонізувати ділянки, що вже були фізіологічно ослаблені життєдіяльністю бактерій роду *Pseudomonas*.

Якщо розглядати біотехнологічний процес культивування *L. edodes*, то можна зазначити що він базується на принципі штучного домінування. Міцелій шийтаке після термообробки лігноцелюлозної основи має повністю колонізувати екологічну нішу, пригнічуючи анабіотичні форми інших організмів. Це відбувається за рахунок потужного ферментативного комплексу та синтезу антибіотичних речовин. Проте, якщо сталися хоч найменші технологічні відхилення – баланс руйнується.

Якщо окремо розглядати зразок 2, можна сказати що в ньому сформувалася специфічна трикомпонентна система контамінантів. Кожен з них посів свою екологічну нішу відповідно до власних фізіологічних особливостей:

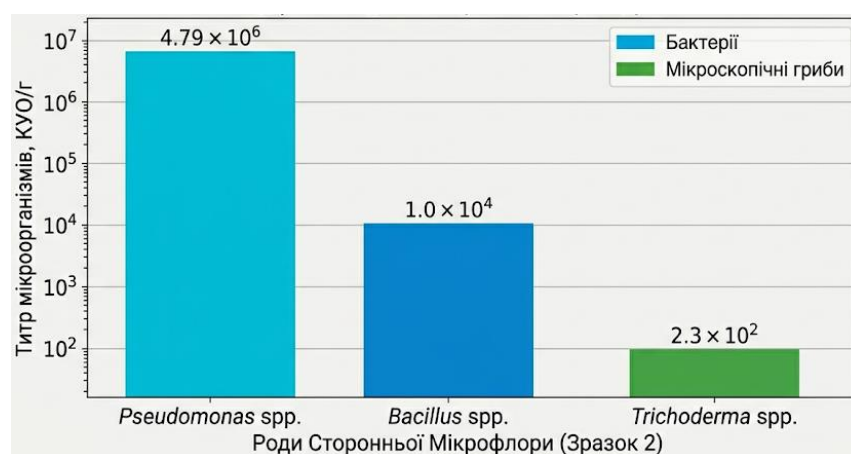


Рис. 3.3. Аналіз мікробіому зразка 2

- *Pseudomonas* spp. – первинний агент бактеріозу. Він виступив деструктором захисних бар'єрів. Присутність мокрих плям та відсутність примордіїв на більшій частині площі зразка 2 є прямим наслідком їхньої життєдіяльності, характеризуються значним титру $4,79 \cdot 10^6$ колонієутворюючих одиниць на один грам.
- *Trichoderma* spp. – вторинний контамінант. Цей мікроміцет традиційно вважається одним із найбільш небезпечних паразитів у грибівництві. Проте кількісний аналіз та відсутність видимого спороношення на поверхні субстрату доводять: у цьому випадку мікопатоген посів місце вторинної інфекції.
- Бактерії роду *Bacillus* – перманентний біологічний фон. У структурі мікробіому обох зразків займають позицію постійної мікрофлори. Їхній титр у контрольному Зразку 1 та в ураженому Зразку 2 залишається в межах значень коли мікроорганізми не здатні самостійно ініціювати патологічний процес.

3.3. Біологічна характеристика ізолятів мікроорганізмів субстратного комплексу

Представників супутньої бактеріальної мікрофлори зі зразків було перенесено в чисту культуру. Для цього використовувалися все ті ж картопляно-декстрозний агар та м'ясо-пептонний агар. Наступним етапом досліджень стало вивчення їх культурально-морфологічних властивостей, а також здатності до забарвлення за методом Грама. Культуральні ознаки оцінювали макроскопічно. Звертали увагу на характер росту колоній на твердому поживному середовищі (форма, розмір, консистенція, колір, тип краю та поверхні). Морфологічні особливості клітин визначали за допомогою світлової мікроскопії забарвлених за методом Грама фіксованих мазків. Виявлено що дві групи бактеріальних ізолятів суттєво відрізнялися за своїми біологічними параметрами.

Виділення бактеріальних культур *Pseudomonas* spp. та *Bacillus* spp. здійснювали шляхом мікробіологічного пересіву окремої колонії бактеріологічною петлею методом виснажливого штриха на свіжі скошені

поживними середовищами пробірки з м'ясо-пептонним агаром. Чисті культури мікроскопічних грибів *Trichoderma* spp. ізолювали за допомогою стерильної мікологічної голки, відбираючи фрагменти повітряного міцелію або спороношення з подальшим висівом у центр чашок Петрі з картопляно-декстрозним агаром для отримання моноізолятів.

Ізолят №1 (представник роду *Pseudomonas*) за макроскопічного вивчення на МПА формувалася специфічні дрібні колонії (діаметр в межах 1.5-2.5 мм). Вони мали округлу форму з рівними або трішки хвилястими краями. Поверхня колоній характеризувалася вираженою гладкістю, був помітний глянцеви́й блиск, структура – здебільшого напівпрозора. Консистенція біомаси м'яка, слизиста, легко знімалася мікробіологічною петлею. Характерною біотехнологічною особливістю даного ізоляту стало виділення у товщу агару водорозчинного флуоресціюючого пігменту (жовто-зелений відтінок). Це є класичним маркером бактерій цього таксону.

При мікроскопуванні фіксованих препаратів, забарвлених за Грамом, було виявлено дрібні, прямі палички з закругленими кінцями. Розташовувалися переважно поодинокі чи короткими ланцюжками. Ізолят №1 визначено як грамнегативний (клітини набували інтенсивного рожево-червоного забарвлення). Спороутворення та капсуляції зафіксовано не було. Даний ізолят через свою активну рухливість та високу швидкість репродукції виступає основним чинником мацерації субстрату.

Ізолят №2 (представник роду *Trichoderma*) при макроскопічному дослідженні на картопляно-декстрозному агарі характеризувався інтенсивним круговим розростанням.

Ранні етапи культивування – забарвлення біле. Структура пухнаста, ватоподібна. Пізніше, вже у процесі спороутворення поверхня поступово набувала характерного зеленого та темно-зеленого відтінку внаслідок масового формування конідій. Для поверхні притаманною є щільна оксамитова текстура. Повітряний міцелій був добре розвинений, біомаса легко фрагментувалася при механічному контакті мікробіологічною петлею. Мікробіологічною особливістю

ізоляту стало те що він швидко колонізував поживне середовище, а також активне спороношення. Це є типовими ознаками представників даного роду мікроскопічних грибів.



Рис. 3.4. Ізольована культура *Trichoderma* spp.

Ізолят №3 (представник роду *Bacillus*) демонстрував абсолютно відмінний тип росту на щільному середовищі. Він утворював великі (діаметр приблизно 4.0-6.0 мм) розлогі колонії, спостерігався виражений амебоподібний чи ризоїдний тип краю. Поверхня колоній була сухою, матовою, дрібнозернистою, шорсткою. Забарвлення біомаси не було однорідним, варіювалося від кремового до брудно-білого кольору. Відсутнє виділення експігментів у середовище.

Мікроскопічний аналіз дозволив чітко диференціювати Ізолят №3 як великі, довгі палички з чітко вираженими прямими кутами. Вони були схильні до утворення довгих ниток (стрептобацили). Бактерії грампозитивні (глибокий фіолетово-синій колір). У процесі культивування (особливо з віком) зафіксовано масове утворення ендоспор овальної форми. Вони розташовані центрально, не перевищували діаметр самої вегетативної клітини. Отримані дані підтверджують належність Ізоляту №3 до сапротрофної бацилярної мікрофлори, що є стійкою до термообробки та виступає супутнім фоном. Активізуються після первинного бактеріального ушкодження лігноцелюлозної основи псевдомонадами.

3.4. Вплив мікробних контамінантів на вегетативний розвиток та плодоношення *L. edodes*

Аналіз вегетативної фази розвитку *L. edodes* показав: присутність сторонньої мікрофлори в лігноцелюлозній основі дослідного зразка чинить

деструктивний пресинг на розвиток грибного міцелію. Це відбувається ще до моменту закладання генеративних органів. На перших етапах колонізації субстрату, контамінанти вступають із шийтаке у жорстку трофічну конкуренцію.

Бактерії роду *Pseudomonas* володіють високою швидкістю розмноження та метаболічною активністю. У випадку конкуренції з *L. edodes* вони здатні швидко перехоплювати ініціативу в споживанні легкодоступних моно- та дисахаридів, що вивільняються в процесі гідролізу деревини. В такому випадку міцелій *L. edodes* змушений енергетично перебудовувати свій вторинний метаболізм. Експресія додаткових комплексів екзогідролаз для розщеплення важкодоступних целюлози та лігніну призводить до фізіологічного виснаження культури.

Паралельно з цим фіксується різка зміна структури, а також морфологічних ознак грибних гіф у зоні ураження. Якщо у зразку 1 міцелій характеризується як густий, із високою щільністю розгалуження та вираженим сніжно-білим забарвленням, то натомість у зразку 2 в місцях бактеріальної щільності він втрачає свою цілісність. Спостерігається суттєве зниження швидкості просування росту гриба. Гіфи стають розрідженими, тонкими, набувають брудно-сірого відтінку.

Цей процес супроводжується лізисом клітинних стінок *L. edodes*. Він спричиняється дією гідролітичних ферментів бактерій, а також можливим латентним проникненням гіф *Trichoderma* spp. Розвиваючись у товщі субстрату, цей мікроміцет обплітає ослаблені бактеріозом нитки *L. edodes*, породжуючи явище мікопаразитизму.

Таким чином, на вегетативній стадії комплексний вплив контамінантів призводить до зупинки росту *L. edodes*, скороченні його біомаси аж до повної втрати фізіологічного контролю над екологічною нішею субстратного блоку.

Важливим моментом у патогенезі ураженого субстратного блоку посідає деструкція специфічних захисних та адаптаційних механізмів *L. edodes*. У нормі життєвий цикл ксилотрофа передбачає обов'язкову стадію блаунінгу. Під час неї вегетативний міцелій під дією світла та кисню починає активно синтезувати

певні позаклітинні ферменти. Вони окислюють ендogenousні фенольні сполуки з подальшим утворенням щільної меланінізованої кори. Цей морфологічний бар'єр в тому числі виконує потужну захисну функцію від сторонньої мікрофлори. Він повністю ізолює внутрішню екосистему блоку від зовнішніх контамінантів. Це явище чітко прослідковується у здоровому зразку 1.

Аналіз зразка 2 продемонстрував що за умов контамінації цей захисний механізм повністю або частково блокується. Сформовані бактеріями *Pseudomonas* spp. щільні екзополісахаридні біоплівки, які створюють бар'єр для вологи та ведуть до кисневого голодування міцелію. В такому випадку ферментативні системи *L. edodes* (зокрема і механізм синтезу меланіну) не здатні функціонувати у штатному режимі. Як наслідок – у місцях утворення так званих «мокрих плям» меланінізована кора блаунінгу або не формується взагалі (це залишає субстрат беззахисним перед супутньою інфекцією), або утворюється хаотично. Це виглядає як фрагментарні аномальні плями темного кольору.

Таке локальне, часто передчасне, плямисте коричневіння є класичним маркером надлишкового окиснювального стресу. У спробі локалізувати бактеріальне вогнище гриб хаотично виділяє фенолоксидази, через що швидко виснажує свій ферментативний потенціал. В досліджуваному випадку зниження фунгістатичної активності цієї меланінової кори через її структурну неповноцінність відкриває ворота для вторинної інвазії. У цих незахищених, позбавлених щільної кори та фізіологічно ослаблених зонах починає розвиватися міцелій *Trichoderma* spp. У нормальних умовах він був би повністю зупинений антибіотичним бар'єром блаунінгу.

Перехід від вегетативного росту до генеративної фази є найбільш чутливим етапом у життєвому циклі *L. edodes*. Він вимагає суворого фізіологічного гомеостазу та специфічних тригерів, що надходять з навколишнього середовища. Фінальним та найбільш деструктивним наслідком масованого ураження субстрату в зразку 2 стало значне блокування стадії ініціації плодоношення. У той час як контрольний зразок 1 успішно перейшов до

фази генеративного розвитку з формуванням кондиційних примордіїв, дослідний блок у зонах контамінації залишився без примордіїв.

Головна причина відсутності закладання генеративних органів полягає у специфіці умов, що створені *Pseudomonas* spp. Для того щоб вегетативні гіфи шийтаке почали агрегувати, необхідний високий рівень аерації та активний рух поживних речовин. Проте життєдіяльність псевдомонад у зоні «мокрих плям» призводить до хронічного локального перезволоження та накопичення слизової екзополісахаридної речовини. Відповідно, замість стимуляції морфогенезу, енергетичні ресурси гриба витрачаються на підтримання базової життєздатності клітин у несприятливому середовищі.

Додатковий фактор блокування – порушення осмотичного тиску та хімічного градієнту в товщі субстрату. Розм'якшення рослинних волокон під дією бактеріальних ферментів руйнує структуру тирси. Як наслідок: перенесення мобілізованих цукрів та азотистих сполук до поверхні блоку припиняється. Міцелію просто бракує нутрієнтів для старту плодоутворення.

Іноді на межі між здоровою та ураженою зонами, там пресинг контамінантів був послабленим, були помітні спроби закладання зачатків плодових тіл. Проте вони демонстрували глибокі аномалії раннього морфогенезу. Примордії формувалися виродженими, а також мали розм'якшену структуру та характеризувалися асиметричною формою. Швидко піддавалися бактеріальному некрозу ще до моменту диференціації шапички. Ось так мікробний тиск контамінантів повністю нівелює генеративний потенціал культури, що робить подальше культивування уражених блоків економічно недоцільним.

Окрім опосередкованого екологічного та трофічного тиску, сторонні мікроорганізми спричиняють прямий деструктивний вплив на клітинному рівні. Вони розгортають проти міцелію *L. edodes* «хімічну війну», механізм що базується на синергетичній дії агресивного ферментативного комплексу та екзогенних токсичних метаболітів. Вони виділяються у середовище *Pseudomonas* spp. та *Trichoderma* spp.

Фізичне руйнування гіф шийтаке відбуваються високоактивними позаклітинними гідролазами контамінантів. Бактерії роду *Pseudomonas* секретують потужні ферменти і оскільки клітинна стінка вищих грибів містить складний комплекс білків та ліпідів, ці ензими викликають розм'якшення та хімічний розпад тканин міцелію. Ферменти триходерми буквально розчиняють захисні стінки гіф шийтаке, що дозволяє мікопатогену перфоровати їх і паразитувати на внутрішньому вмісті клітин.

Не менш руйнівним вектором атаки є хімічна інтоксикація субстратного середовища. У процесі метаболізму псевдомонади синтезують метаболіти, що вбудовуються в цитоплазматичні мембрани клітин шийтаке, порушують їхню проникність та викликають миттєвий витік внутрішньоклітинних іонів і метаболітів. Це призводить до незворотного автолізу грибної клітини.

Зі свого боку, *Trichoderma* spp. доповнює цей токсичний пресинг виділенням летких та нелетких антибіотиків (зокрема, триходерміну). Вони повністю пригнічують дихальні ланцюги в мітохондріях *L. edodes*. Таким чином, пряма ензиматична деструкція у поєднанні з тотальним хімічним отруєнням субстрату метаболітами контамінантів призводить до масової загибелі клітин *L. edodes* у зоні інвазії, що унеможлиблює будь-яку фізіологічну регенерацію грибного блока.

Масштабне втручання сторонньої мікрофлори у біотехнологічний процес культивування ксилотрофів завжди неминуче призводить до повної втрати його практичної цінності. Комплексний аналіз ураженого зразка 2 дозволяє констатувати: синергетичний тиск первинного бактеріозу та вторинної мікоінвазії руйнує потенційну продуктивність грибниці. Оскільки зона «мокрих плям» та розповсюдження *Trichoderma* spp. сумарно охопила більшу частину робочої площі та товщі субстратного блока, то життєвий простір та запаси поживних речовин, необхідні для живлення *L. edodes*, виявилися заблокованими або знищеними.

Навіть якщо на ізольованих від інфекції ділянках ураженого блоку згодом відбудеться закладання генеративних органів – розраховувати на отримання

повноцінного врожаю неможливо. Хронічний дефіцит нутрієнтів, а також системне отруєння всього субстратного блоку токсинами контамінантів призводить до того що поодинокі гриби формуються фізіологічно неповноцінними. Вони мають суттєві морфологічні дефекти, слабкий тургор, зменшену масу. А високий рівень прихованого бактеріального ураження веде до пришвидшеного загнивання після збору.

Таким чином, фінальний результат сукцесії сторонньої мікрофлори в зразку 2 – деградація культури *L. edodes*. Мікробна контамінація не просто знижує якість окремих плодових тіл. Вона повністю припиняє функціонування блоку як цілісної продуктивної системи, переводить його в категорію біологічних відходів, що підлягають утилізації.

ВИСНОВКИ

У кваліфікаційній роботі наведено теоретичне обґрунтування та проведено оцінку впливу біотичних чинників на ріст та розвиток грибів *L. edodes* в умовах інтенсивного культивування на профільному господарстві. На основі проведених комплексних досліджень сформульовано такі висновки:

1. Порівняльний моніторинг досліджуваних субстратних блоків показав, що відхилення від параметрів мікроклімату провокують спалах сторонньої мікрофлори, яка блокує нормальний розвиток *L. edodes*. Замість природного процесу дозрівання та «коричневіння» міцелію, на субстраті з'являлася характерна, викликана контамінантами, пігментація, структура блоку ставала менш щільною, формування примордіїв пригнічувалося.

2. Кількісний аналіз продемонстрував: в ураженому зразку щільність бактеріальних та грибових конкурентів значно перевищує показники контрольного блоку. Такий надмірний біотичний тиск, який позбавляє міцелій *L. edodes* можливості накопичити поживні речовини, що є необхідними для переходу до стадії плодоношення.

3. Виділено в чисту культуру найактивніші пласти умовно-патогенної мікрофлори. Лінійка ізолятів дозволила детально вивчити їх як прямих біологічних конкурентів *L. edodes*. Встановлено: ці організми випереджають цільовий штам у швидкості колонізації лігноцелюлозного субстрату. Вони буквально витісняють його з екологічної ніші.

4. Досліджено особливості росту виділених мікроорганізмів на спеціально підібраних диференційовано-діагностичних поживних середовищах. Підхід дозволив встановити, що навіть незначна кількість бактерій чи агресивних мікроміцетів на ранніх етапах вирощування помітно змінює морфологію колоній *L. edodes*., спричиняючи деструкцію його гіфів.

5. З'ясовано комплексний механізм гальмування розвитку продуцента. Контамінанти не лише перехоплюють легкі вуглеводи із субстрату, а й виділяють токсичні метаболіти та ферменти. Вони руйнують вегетативне тіло *L. edodes*.

На основі виявлених векторів контамінації сформульовано рекомендації для захисту штаму ІВК-516. З метою знищення ендогенних бацил слід суворо дотримуватися режиму стерилізації. Необхідно забезпечити стабільні 100 °С у товщі блока протягом 12 годин. Рекомендується впровадити автоматичний моніторинг температури для кожної партії.

Аерогенний вектор потрапляння псевдомонад і триходерми нівелюють плановою заміною НЕРА-фільтрів. Чистоту повітря в ламінарних зонах контролюють щотижня, можна застосовувати седиментаційний метод. Контактний шлях інвазії блокують триетапною дезінфекцією стелажів, також інструментів для перфорації захисної поліпропіленової оболонки блоків. Доступ персоналу до інкубаційних приміщень потрібно суворо обмежувати.

Гідрогенний вектор на етапі замочування усувають обов'язковим знезараженням технологічної води. Для цього застосовують озонування, УФ-опромінення чи каскадну мікрофільтрацію. Такі заходи забезпечать цілісність захисної кори коричневіння міцелію *L. edodes*, а впровадження рішень гарантує рівномірне закладання примордіїв та підвищення врожайності.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Nutritional and Pharmacological Potential of Edible Mushroom / Sahu R. та ін. *Acta Scientific Pharmaceutical Sciences*. 2023. Vol. 7, №4. P. 17-28.
2. A Comprehensive Review of the Diversity of Fungal Secondary Metabolites and Their Emerging Applications in Healthcare and Environment / Wadhwa K. та ін. *Mycobiology*. 2024. Vol. 52, № 6. P. 335–387.
3. *Lentinula Edodes* (Edible Mushroom) as a Nutraceutical: A Review / Ponnusamy C. та ін. *Biosciences Biotechnology Research Asia*. 2022. Vol. 19, № 1. P. 1-11.
4. Chang S. T., Miles P. G. Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact : monograph. Boca Raton : CRC Press LLC, 2004. 451 P.
5. Cultivation methods and biology of *Lentinula edodes* / Song X. та ін. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2025. Vol. 109, № 63.
6. Cao B., Zhang Y., Gao B. Development History, Current Situation and Trends of Global *Lentinula edodes* Industry. *Acta Edulis Fungi*. 2024. Vol. 31, №3. P. 1-20.
7. Singh M., Kamal S., Sharma V. P. Status and trends in world mushroom production-III World production of different mushroom species in 21st century. *Mushroom Research*. 2020. Vol. 29, №2. P. 75-111.
8. Morphological characterization and nutritional value of *Lentinula edodes* / Zohmangaiha C. та ін. *Journal of Agriculture, Food and Environment*. 2023. Vol. 4, № 3. P. 9-12.
9. A Review on General Nutritional Compounds and Pharmacological Properties of the *Lentinula edodes* Mushroom / Finimundy T. C. та ін. *Food and Nutrition Sciences*. 2014. Vol. 5. P. 1096.
10. Kalač P. A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013. Vol. 93, №2. P. 209-218.

11. Basic Composition and Amino Acid Contents of Mushrooms Cultivated in Finland / Mattila P. та ін. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002. Vol. 50, № 22. P. 6419-6422.
12. Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: An inter-species comparative study / Filipa S. Reis та ін. *Food and Chemical Toxicology*. 2012. Vol. 50, № 2. P. 191-197.
13. Wasser S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002. Vol. 60. P. 258-274.
14. Patel S., Goyal A. Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review. *3 Biotech*. 2012. Vol. 2. P. 1-15.
15. Enman J., Rova U., Berglund K. A. Quantification of the Bioactive Compound Eritadenine in Selected Strains of Shiitake Mushroom (*Lentinus edodes*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007. Vol. 55, №4. P. 1177-1180.
16. Cultivation of Shiitake on Natural and Synthetic Logs : manual / comp. : College of Agricultural Sciences. PennState University, 2009. 11 P.
17. Chen A. W. Shiitake Bag Cultivation. *Mushroom Growers' Handbook 2: Shiitake Cultivation* : manual / comp. : MushWorld. 2004. P. 73-111.
18. Substrates used for the cultivation of Shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*): a review / Nabhan S. та ін. Agricultural University - Plovdiv, Scientific Works. 2025. Vol. 67, №1. C. 270-282.
19. Substrate Optimization for Shiitake (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) Mushroom Production in Ethiopia / Desisa B. та ін. *Journal of Fungi*. 2023. Vol. 9, №8. 811.
20. Effects of Aeration of Sawdust Cultivation Bags on Hyphal Growth of *Lentinula edodes* / Lee H. Y. та ін. *Mycobiology*. 2012. Vol. 40, №3. C. 164-167.
21. Park Y. J., Jang M. J. Blue light induced edible mushroom (*Lentinula edodes*) proteomic analysis. *Journal of Fungi*. 2020. Vol. 6. 127.
22. Ohmasa M., Cheong M. L. Effects of culture conditions of *Lentinula edodes*, Shiitake mushroom, on the disease resistance of *Lentinula edodes* against

Trichoderma harzianum in the sawdust cultures. The 3rd ICMBMP : proceedings, Oct. 1999, Penang / WSMBMP. 1999.

23. Savoie J. M., Mata G. The antagonistic action of *Trichoderma* sp. hyphae to *Lentinula edodes* hyphae changes lignocellulolytic activities during cultivation in wheat straw. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1999. Vol. 15, №3. P. 369-373.

24. Cortes-Tolalpa L., Salles J. F., van Elsas J. D. Bacterial synergism in lignocellulose biomass degradation - complementary roles of degraders as influenced by complexity of the carbon source. *Frontiers in Microbiology*. 2017. Vol. 8. 1628.

25. Tsuneda A., Thorn R. G. Interactions between *Lentinula edodes* and *Pseudomonas*. *Canadian Journal of Microbiology*. 1994. Vol. 40, №11. P. 937–943.

26. Biological and molecular characteristics of a novel Partitivirus infecting the edible fungus *Lentinula edodes* / Guo M. та ін. *Plant Disease*. 2017. Vol. 101, №5. P. 726-733.

27. The microbial community in a substrate of solid-state fermentation by *Lentinula edodes*: a preliminary study / Eilertsen L. та ін. *Fermentation*. 2023. Vol. 9. 736.

28. Insects associated with edible mushroom *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (*Agaricales: Agaricaceae*) cultivation in Brazil / Barreto M. R. та ін. *Semina: Ciencias Agrarias*. 2006. Vol. 23. P. 83-86.

29. Ferreira J. M., Braga F. R., Soares F. E. F. Nematicidal activity of the *Lentinula edodes*' spent mushroom compost. *South African Journal of Botany*. 2022. Vol. 146. C. 101-102.