НАУЧНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ АГРОПРОМЫШЛЕННОГО КОМПЛЕКСА

SCIENTIFIC PROVISION OF AGROINDUSTRIAL COMPLEX

АГРОНОМИЯ

AGRONOMY

УДК 635.8 (Д 571.6)
Анненков Б.Г., д. с.-х. н., чл.-кор. РАСХН;
Азарова В.А., ДальНИИСХ

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ BACILLUS CEREUS В СОЗДАНИИ КАЧЕСТВЕННЫХ ИЗБИРАТЕЛЬНЫХ СУБСТРАТОВ ДЛЯ ИНТЕНСИВНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВЕШЕНКИ ОБЫКНОВЕННОЙ

В ДальНИИСХ определена возможность и разработана методика повышения селективности у анаэробно ферментируемых соломистых субстратов при интенсивном нестерильном культивировании вешенки обыкновенной (Pleurotus ostreatus)с применением чистой культуры Bacillus cereus.

Annenkov B.G., Doc.Agr.Sci., Member-correspondent of Russian Academy of Agrarian Sciences; Azarova V.A., Far East Research Institute Of Agriculture

THE USE OF BACILLUS CEREUS IN CREATION OF QUALITATIVE SELECTIVE SUBSTRATUM FOR INTENSIVE CULTIVATION OF OYSTER MUSHROOM (Pleurotus ostreatus)

In Far East Research Institute Of Agriculture there was found an opportunity and the technique of increasing of selectivity at anaerobically fermented hay substratum was developed in conditions of intensive unsterile cultivation of oyster mushroom (pleurotus ostreatus) with application of pure Bacillus cereus culture.

Съедобно-целебный базидиальный ксилосапротроф вешенка обыкновенная (Pleurotus ostreatus) является одним из наиболее ценных объектов мирового и отечественного грибоводства. Она самая экономически выгодная среди других культивируемых видов грибов [1,2].

Существует два метода её искусственного выращивания: экстенсивный (летом на чурках осины, тополя, в трёхлетних оборотах) и интенсивный (с конца лета до начала следующего лета, в двух-трёх «волновых» двухмесячных грибооборотах) в контролируемых условиях закрытых помещений, на соломистых или опилочных субстратах.

Всё многообразие существующих способов и приёмов интенсивного культивирования вешенок составляют две различающиеся технологии. Первая, это индустриальная полустерильная евротехнология, где грибы растут на крупных блоках или перфорированных полиэтиленовых мешках, наполненных предварительно подготовленным (инокулированным зерновым посевным мицелием) и заращенным грибницей доступном соломистом субстрате (солома зерновых, полова, стержни кукурузы, шелуха подсолнечника и т.д.). Вторая − азиатская абсолютно стерильная технология, с плодоношением грибов из открываемых отверстий небольших сосудов (керамических, стеклянных, полипропиленовых) или пластиковых термостойких пакетиков с обогащённым питательными добавками (отруби, крупа, труха, мука и т.д.) стерильным опилочным субстратом, которая в России для товарного производства грибов практически не используется [3,4].

Совершенно очевидно, что отечественное производство вешенки будет и далее базироваться на устоявшейся европейской технологии, которая характеризуется меньшими затратами ручного труда и потенциальными резервами по её дальнейшей модернизации, механизации и автоматизации, эффективным применением на крупных индустриальных грибных производствах.

После разработки и внедрения евротехнологии (40 лет назад) для подготовки субстратов использовалась тщательная термическая обработка (автоклавирование, длительное пропаривание или кипячение)[5]. Подготавливаемый для инокуляции субстрат (как правило, это солома) являлся фактически стерильным, но не обладал избирательностью (селективностью). Поэтому после инокуляции его посевным мицелием, особенно в отсутствии так называемой «чистой» зоны (т.е. при несоблюдении строгих правил асепции), наблюдалось бурное развитие контаминирующих спор конкурирующих микроорганизмов, что зачастую приводило к значительному снижению, а в некоторых случаях и к полной потере урожая. Это было подтверждено и в наших ранних исследованиях (табл. 1) при разработке научно-технологических основ интенсивного культивирования вешенок в условиях Приамурья.

Таблица 1

Негативное влияние очагов конкурентов на уровень продуктивности и темпы плодоотдачи вешенки обыкновенной (штамм А-77) на мешках (по 5 кг) с автоклавированной

Вариант субстратных мешков, инокулированных вне «чистой» зоны	Номер волны плодоношения	Период от инокуляции до уборки первой волны и между уборками, дн.	Урожай грибов с мешка, г (M ± m)	Плодоотдача, %	Количество сростков на мешке, шт.	Количество грибов на мешке, шт.	Средняя масса технически зрелого гриба, г	Средняя продолжительность грибооборота, дн.
1. Мешки, хорошо заросшие мицелием	1	22-26	649±12	13,0	4,1	79,5	8,2	
	2	16-20	265±25	5,3	5,2	20,3	13,1	
	Σ		914	18,3				42
2. Мешки, с мелкими очагами конкурентов (10-15% поверхности)	1	28-30	546±16	10,9	3,3	39,3	13,9	
	2	22-24	145±10	2,9	3,0	17,1	8,5	
	Σ		691	13,8				52
3. Мешки, со средними	1	32-36	340±20	6,8	2,5	18,0	19,0	
	2	26-30	98±15	2,0	1,8	12,4	7,9	

очагами конкурентов (20-35% поверхности)	Σ		438	8,8				62

Примечание. Доза стерильного зернового посадочного мицелия составляла 7%

К числу наиболее вредных [6] относятся так называемые «сорные» плесени (виды микромицетов из родов Trichoderma, Aspergillus, Penicillium, Rhizomukor и др.). В процессе метаболизма большинство из них выделяют сильные токсины (антимикотики), к которым у ещё не развитого мицелия вешенки отсутствует устойчивость, он останавливается в росте и гибнет. Так из грибов рода Trichoderma был выделен ряд биологически активных соединений антрациклиновой природы [7], а некоторые представители рода Penicillium одновременно с бактерицидным пенициллином образуют соединения, отнесённые к калбистринам [8].

Сильное негативное влияние на развитие мицелия вешенки токсинов микромицетов, которые не разрушаются даже при многочасовом воздействии высокими температурами, нами было обнаружено в процессе производства зерновой посадочной грибницы в ДальНИИСХ. Однажды при инокуляции крупной баночной партии хорошо автоклавированного зерна (как оказалось некачественной исходной культурой) через неделю в верхней части трёхлитровых банок появились плесени. В этом случае нами снова была проавтоклавирована вся партия банок (т.е. и проблемные, и без признаков плесеней) и снова проведена поверхностная инокуляция, но уже стерильным маточным инокулюмом вешенки. После этого было обнаружено, что в проблемных банках мицелий вешенки или вообще не прижился, или же его рост существенно отставал от развития гиф макромицета в банках, которые были пущены на повторное автоклавирование без признаков плесеней.

Для получения качественного питательного субстрата для выращивания вешенок по евротехнологии, при любом способе его подготовки, важен тщательный выбор партий качественной злаковой соломы, которая должна быть сухая, золотистого цвета, не иметь очагов прелости и серости. При этом качественная солома злаковых, как известно, не стерильна и содержит определённую композицию покоящихся форм микроорганизмов, представленную бактериями, актиномицетами и микроскопическими грибами [9]. При увлажнении такого соломистого сырья активность микрофлоры начинает быстро возрастать. Искусство приготовления качественного селективного субстрата состоит в сохранении полезной (термофильной) микрофлоры и в достаточном наращивании её численности, одновременно в инактивации или уничтожении вредных конкурентных организмов.

В начале третьего тысячелетия всё большее внимание грибоводов привлекает метод аэробной ферментации, который позволяет создавать селективный субстрат с хорошей плодоотдачей вешенок [5,6,9,10]. Ферментация субстрата отличается от простой термообработки тем, что при подъёме температуры до 60-62 ºС (более 10 часов) происходит только частичная пастеризация субстрата (уничтожаются мезофильные формы широкого спектра, но сохраняются термофильные спорообразующие бактерии), а постоянная подача свежего воздуха создаёт благоприятные условия для развития полезной аэробной микрофлоры, что позволяет получать соломистую питательную среду наивысшего качества для мицелия P. ostreatus. Для проведения такой аэробной ферментации необходимы сложные и дорогие специальные капитальные сооружения, так называемые тоннели, число которых в стране ограничено и построены они только в Европейской России (как наследие от шампиньонных хозяйств). Процесс классической аэробной ферментации соломы с предварительным длительным увлажнением в кучах (фаза 1 + фаза 2) длительный (до 10 дней) и проблемный для регионов с суровой зимой, поэтому серьёзно критикуется некоторыми отечественными специалистами, с предложением вообще отказаться от гонок за селективностью и вернуться к стерилизации субстратов и соблюдению элементарных правил ассепции и обустройства «чистой» зоны [11].

На наш взгляд отказываться отечественному товарному грибоводству от субстрата с хорошей избирательностью и продуктивностью не стоит, но назрела необходимость модернизировать процесс, упростить его и удешевить. В этом случае в условиях большинства регионов РФ было бы очень желательным совмещение технологических операций по замачиванию в крупных чанах фрагментированной соломы и проведения предварительной анаэробной низкотемпературной ферментации, но с

возросшей результативностью и сокращенной до 2,5 суток продолжительностью, за счёт использования для заливки водной суспензии специально подобранных и культивируемых эффективных бациллярных микроорганизмов − факультативных анаэробов. Упрощению процесса получения избирательных субстратов будет способствовать дальнейший разогрев (до 60 ºС) субстрата непосредственно в закрытых чанах, с последующим медленным (1,5−2-суточным) остыванием до 28-30 ºС или расфасованного в мешки и расположенного в термокомнатах для классического трёхсуточного ферментирования. Нами рассматривались возможности обоих путей подготовки избирательных субстратов с повышенным качеством. Была поставлена задача, разработки способа использования эффективной чистой бациллярной культуры при анаэробной подготовке качественных соломистых субстратов для выращивания вешенки, с упрощением процесса предварительной ферментации и сокращением времени на подготовку субстрата, экономически достаточной селективности и плодоотдачи.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

В наших исследованиях использованы общеизвестные методы микологии, биотехнологии, лабораторно-вегетационного опыта и вариационной статистики. В качестве субстрата выбрана единая крупная партия овсяной половы, полученная от сортировки семенного зерна в ДальНИИСХ, которая состояла из пустых колосков овса и 15-процентной примеси семян сорного куриного проса и соломистых фрагментов. Замочка субстратов проводилась в одинаковых баках (по 50 литров) с крышками. Эксперименты были спланированы так, что закладка мешочков (точно по 2 кг на весах) осуществлялась в один день, в обыкновенной комнате (без специальной «чистой» зоны), но соблюдались, принятые в грибоводстве, меры санитарии и асепции. Повторность вариантов опытов – от пяти до восьмикратной.

Для инокуляций в разных опытах использованы единые партии стерильного зернового (на овсе) посевного мицелия вешенки обыкновенной (штамм НК-35) собственного производства, высокое качество которого доказано многолетними испытаниями [2]. Посевная норма во всех вариантах составляла 4,5%. В связи с отсутствием в Приамурье сложных и дорогих тоннелей для проведения аэробной ферментации, нами рассматривались только приёмы повышения селективности субстрата для культуры вешенок с помощью анаэробной ферментации (т.е. полной заливкой субстрата водой или расположением наполненных влажным субстратом завязанных полиэтиленовых мешков в термокамерах). В качестве термокамер использовали вполне герметичные лабораторные термостаты. Заращивание мешочков и плодоношение осуществлялось в одном и том же помещении.

Важный показатель при интенсивном культивировании вешенки – продуктивность (П%) или плодоотдача сырого (влажность 70-72%) уплотнённого субстрата, рассчитывается как отношение массы технически зрелых грибов, получаемых с мешка (или сосуда) в первых «волнах», к изначальной массе фасовки, выраженное в процентах, то есть П% = М плод. тел : М влажн.субстр.× 100%. Этот показатель (для отдельных «волн» или суммарный) приводится в наших таблицах.

Чистые культуры бацилл и актиномицетов были получены от известного дальневосточного микробиолога, доктора биол. наук Тен Хак Муна (ИВЭП ДВО РАН, г. Хабаровск), которые сейчас депонируются нами круглогодично в ДальНИИСХ на питательной среде КГА. Изоляты стрептомицетов предоставлены доктором биол. наук А.В. Крыловым (Ботанич. сад − институт ДВО РАН, г. Благовещенск).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Наряду с отзывами об аэробной ферментации (в тоннелях), как лучшем способе повышения селективности субстратов для выращивания вешенки, встречаются утверждения [5], что определённого уровня избирательности субстрата можно достичь в результате анаэробного ферментирования, но селективность и качество такого субстрата будет намного ниже, чем у аэробно ферментированных субстратов. На наш взгляд с этим можно согласиться, но только в случаях использования злаковой соломы, имеющую после комбайновой уборки и молотьбы вполне определённую композицию естественной микрофлоры, поскольку было неизвестно с какой эффективностью будет проходить анаэробная ферментация субстратов (особенно при дефиците нужных микроорганизмов в выбранном сырье −

дроблённые кукурузные стержни, тростник, опилки, осоково-вейниковое сено) при использовании разводок отборных микроорганизмов − факультативных анаэробов, у которых репродуктивные и биохимические процессы проходят одинаково хорошо как в присутствии, так и в отсутствии кислорода воздуха. Больше того, до последнего времени окончательно не было ясно, какие именно виды термофильных микроорганизмов способствуют повышению селективности субстрата для выращивания вешенки обыкновенной. Предполагалось (по аналогии с культурой шампиньона двуспорового), что это актиномицеты и бациллы [5,9], обладающие высокой антагонистической активностью по отношению ко многим видам микроорганизмов [12].

Таблица 2

Результаты зарастания и плодоотдачи первой волны вешенок на автоклавированной полове овса, перед инокуляцией замоченной в водных разводках различных микроорганизмов (начало 2006 г.)

Вариант разводки микроорганизмов	Визуальная оценка зарастания субстрата грибницей	Период от инокуляции до уборки, дн.	Урожай с мешочка (по 2 кг), г, (M ± m)	Плодо отдача, в %	Кол-во сростков на мешочке, шт.	Кол-во грибов на мешочке, шт.	Средняя масса одного гриба, г
1. Контроль (чистая вода)	С крупными и средними очагами плесеней	60-62	71 ± 14	3,6	1.2	5	14,2
2. Стрептомицеты (2 формы)	С очагами плесеней	56-58	117 ± 12	5,9	1,7	10	11,7
3. Актиномицеты (Act. viridis + Act. ruber)	Единичные (мелкие) очаги	43-46	148 ± 9	8,9	2,0	15	11,9
4. Бациллы (Bac. subtilis + Bac. cereus)	Без очагов	30-32	273 ± 38	13,7	3,3	32	8,5
5. Смесь бацилл и актиномицетов	Без очагов	33-35	229 ± 11	11,5	3,0	29	7,9
6. Японский концентрированный ЭМ-препарат (Кюсей), в разведении 1:1500	Без очагов	38-40	219 ± 8	11,0	3,0	26	8,4
7. Американское жидкое бактериальное удобрение, в разведении 1:1500	С очагами плесеней	54-56	104 ± 9	5,2	2,5	11	9,5

В 2006 году нами проведён анализ (табл. 2) влияния различных комплексов микроорганизмов: стрептомицетов, актиномицетов, бацилл и двух иностранных коммерческих микробных препаратов на конкурирующие плесени и на развитие вешенки на полове овса, которая после тщательного автоклавирования (2 атм., 3 часа) и охлаждения была замочена в микробных водных разводках (биомасса с молодого агарового косячка или 2 мл концентрата разведённых в трех литрах стерилизованной холодной воды). Термо-ферментации как таковой при этом не происходило, а было «оживление» стерильных субстратов различными группами микроорганизмов, которые далее сосуществовали на субстрате вместе с растущим мицелием культурного макромицета и с контаминирующими микромицетами − конкурентами вешенок.

Было обнаружено (табл. 2), что наибольшая эффективность в защите от конкурентов и в стимуляции продуктивности вешенок, растущих на «живых» субстратах, была присуща взятым для опыта видам из рода Bacillus. Этим определено, что для повышения качества субстрата и продуктивности у вешенок наиболее подходят бациллярные микроорганизмы.

Патентный поиск показал, что основная масса спорообразующих бактерий рода Bacillus является мезофиллами с оптимумом роста до 40-45 ºС, и лишь отдельные

представители термофильные, то есть растут при температуре до 65 ºС [13]. Термофильные виды бацилл делятся на группы. В первую группу объединены бактерии с бациллярным (палочковидным) типом спороношения, в которой выделяются две подгруппы: B. subtilis (аэробы) и B. cereus (факультативные анаэробы).

B. subtilis − ранее называемая «сенная» палочка, типичный представитель подгруппы − обнаруживается повсюду в осевшей пыли. Другой известный представитель B. mesentericus (Bac. subtilis var. mesentericus) или «картофельная» палочка. Она использует углеводы только в аэробных условиях. Бактерии подгруппы B. subtilis известны как продуценты антибиотиков биофунгицидного действия субтилина и бацитрацина. Это почвенные бактерии южного типа, наиболее распространены на пашнях основных зернопроизводящих регионов [14]. В России и за рубежом [15] запатентован ряд штаммов B. subtilis, ингибирующих рост фитопатогенных грибов и на основе которых в РФ налажено производство биофунгицидных препаратов (бактофит, бисолбисан, интеграл, фитоспорин-М) [16].

Для бактерий подгруппы B. cereus отличительным признаком является способность использовать сахара как аэробно так и при отсутствии кислорода воздуха [13], в том числе и второй представитель Bac. cereus var. mucoides (по современной классификации). Это северные виды, которые выступают доминантой в экосистемах, где слабо протекают процессы трансформации органического вещества, то есть на влажных сенокосах и полях с тяжёлыми, периодически переувлажнёнными почвами, поэтому на злаковой соломе, прошедшей комбайновую уборку и молотьбу, их присутствие мизерное. Очень важно, что Bac. cereus является продуцентом термостабильного антибиотика широкого спектра действия цвиттермицина [17].

Бациллы первой группы самые термофильные, их вегетативные формы способны сохранять жизнедеятельность при многочасовом воздействии температурой в 60 – 62ºС. Их созревшие покоящиеся споры, имеющие многослойную оболочку, приобретают сверхвысокую термоустойчивость, что обусловлено накоплением в них ионов кальция, связанных с пиколиновой кислотой [18]. Они выдерживают сухой жар в 100 ºС в течение трех часов (или кипячение в течение 30 минут). Эту терморезистентность спор используют для получения накопительных культур [13]. На устойчивость спор к температуре заметное влияние оказывает кислотность среды. С понижением pH устойчивость спор обычно снижается [18].

B. macerans и B. polymyxa, которые также используются для придания селективности субстратам при культивировании вешенки [10], относятся к типичным представителям второй группы. Они образуют овальные споры шире материнской клетки, которые вызывают её раздувание. Подобно бактериям первой группы они способны сбраживать углеводы, но при росте в анаэробных условиях эти культуры обладают способностью фиксировать азот, что очень важно при подготовке качественного субстрата. Однако они менее термостойки и поэтому способны расти и развиваться только при температурах ниже 58ºС [6]. Кроме этого, у них пока не обнаружены активные метаболиты, которые могли бы не только тормозить рост, но радикально угнетать конкурентные микроскопические грибы, как это делают бациллы первой группы.

Весной 2007 года мы заложили масштабный опыт (табл. 3) для экспериментальной проверки наших теоретических посылок о перспективности использования чистых культур B. cereus для создания качественных избирательных субстратов по хорошо известным в стране и за рубежом [5] схемам аэробной ферментации (в тоннелях, которые ранее были разработаны под производство компостов для выращивания шампиньонов), но с переводом на анаэробный путь, то есть предварительной ферментации путём 2,5-суточного замачивания субстрата в ёмкостях и использованием для проведения пастеризации и основной термо-ферментации термокомнаты (термостатов), что соответствует существующему технологическому уровню товарного производства вешенок в большинстве субъектов РФ, удалённых от центра.

Обнаружено (табл. 3), что при использовании для замачивания и приготовления соломистого субстрата (как в фазе 2, так и в фазе 1 + фаза 2) слабой водной разводки «молодых» (свежих) культур B. subtilis или B. cereus, продуктивность культивируемого гриба существенно возрастает относительно контроля. Максимально высокая продуктивность вешенки в опыте на анаэробно ферментированной овсяной полове отмечена

в вариантах с B. cereus. Случайно обнаружено (вариант 4), что нельзя использовать смесь этих важнейших бациллярных микроорганизмов для замачивания субстратов, поскольку в питательной среде они конкурируют и сдерживают развитие друг друга, а качество готового субстрата при этом понижается. Конкуренция искусственно культивируемых микробов происходит, конечно, и с дикими формами, которые присутствуют на соломистом сырье и участвуют в процессе ферментации, однако их исходный титр, по-видимому, существенно ниже, чем у дополнительно внесённых суспензий B. subtilis или B. cereus. А может быть в условиях Приамурья «дикари» принадлежат к представителям второй бациллярной группы [6,10,13] и не могут оказать достаточного сопротивления отборным культурам бацилл первой группы.

Наблюдения показали, что избирательность анаэробно ферментированных субстратов во всех вариантах опыта высокая. Это позволяет проводить инокуляцию (особенно при использовании B. cereus) без особых предосторожностей образования очагов конкурентов (то есть вне «чистой» зоны) и снизить расход дорогого зернового посевного мицелия до 3-4 %.

Таблица 3

Продуктивность вешенки обыкновенной (НК-35) в «двухволновом» весеннем (2007 г.) грибообороте на полове овса, залитой в ёмкостях водой или бациллярными суспензиями и помещённой в термокамеру для ферментации сразу (фаза 2) или после трёхсуточного замачивания (фаза 1+ фаза 2)

Вариант замачивания овсяной половы	Номер волны плодо-ноше-ния	Ферментация по схеме − фаза 2					Ферментация по схеме − фаза 1 + фаза 2				
		Период от инокуляции до уборки и между уборками, дн.	Урожай грибов с мешочка (по2 кг), г (M ± m)	Плод оот-дача, %	Кол-во грибов на мешочке, шт.	Средняя масса одного гриба, г	Период от инокуляции до уборки и между уборками, дн.	Урожай грибов с мешочка (по2 кг), г (M ± m)	Плодоо тдача, %	Кол-во грибов на мешочке, шт.	Средняя масса одного гриба, г
1. Заливка водой (контроль)	1	20-22	476 ± 10	23,8	72	6,6	24-26	511 ± 14	25,6	60	8,5
	2	14-16	86 ± 1	4,3	13	6,6	9-12	221 ± 2	11,0	31	7,1
	∑		562	28,1				732	36,6		
2. Суспензия Bac.subtilis	1	20-22	509 ± 13	25,4	83	6,1	25-27	550 ± 18	27,5	84	6,5
	2	15-17	109 ± 7	5,5	15	7,3	9-10	234 ± 4	11,7	33	7,1
	∑		618	30,9				784	39,2		
3. Суспензия Bac.cereus	1	21-23	542 ± 4	27,1	68	8,0	25-26	583 ± 12	29,2	51	11,4
	2	14-16	137 ± 12	6,9	27	5,1	10-11	246 ± 8	12,3	35	7,0
	∑		679	34,0				829	41,5		
4. Смесь суспензий B. subtilis + B.cereus (1:1)	1	22-24	482 ± 6	24,1	89	5,4					
	2	16-17	123 ± 5	6,1	21	5,9					
	∑		605	30,2							

Следовательно, экспериментально установлено, что для получения качественных субстратов при тщательной анаэробной ферментации, из известных и применяемых термофильных видов, наиболее подходит для использования культура B. cereus.

Важнейшими условиями разработанного способа анаэробной ферментации (с использованием культуры B.cereus и термокомнат), гарантирующими получение селективного субстрата высокого качества являются:

− применение качественных соломистых с.-х. отходов (солома, полова, труха), прошедших комбайновый обмолот;

− использование чистых культур B. cereus молодого возраста (до 15 дней), выросших на питательной среде КГА;

− умеренность внесения в подготавливаемый субстрат бацилл (из расчёта одного пробирочного косячка на 50 – 75-литровый бак или одного газона обычной чашки Петри на 1,5 – 2-тонную ёмкость).

Эти условия и параметры проверялись нами позднее в зимний сезон (табл. 4) применительно к способу так называемой упрощённой ферментации субстратов, путём заливки их горячей водой (фактически кипятком) в баках с крышками, с последующим медленным (1,5-суточным) остыванием. Именно для этого способа отмечены в литературе и нами малопонятные факты получения субстрата «невысокого» качества.

Нами определено, что при заливке измельчённого сырья кипятком, можно заметно (пусть и ненадолго) превысить температуру в 60ºС. Это будет зависеть от количества кипятка, от вида сырья, его объёма и его исходной температуры. Сам период пребывания замоченного горячей водой (но не кипятком) субстрата при температуре около 60 ºС очень короткий и недостаточный для тщательной пастеризации всех мезофиллов (должен составлять не менее 10 часов).

Технологически целесообразной была бы заливка субстрата (в том числе с внесённой бациллярной культурой) достаточно горячей (около 75 ºС) водой, но не кипятком, с последующим поднятием (встроенными в нижнюю часть чанов электротенами) температуры залитого субстрата до 60ºС и выдерживания этого уровня температуры в течение 12 часов, дальнейшим отключением и медленным 1,5-суточным остыванием под крышкой, а в конце тщательным сливом влаги.

В литературе [9] отмечается, что бациллы при приготовлении субстрата иногда могут выделять антимикотики в количествах сильно ограничивающих развитие конкурентных плесневых грибов, но иногда и мицелия вешенки.

Такой факт был установлен нами при обработке субстрата кипятком, когда в отсутствии свежевысеянных бациллярных культур, нами использовались старые, длительно хранившиеся в холодильнике, уже подсохшие культуры, когда превысили норму и внесли на бак две пробирки B. cereus с огромным количеством накопившихся зрелых (покоящихся) спор. В качестве субстрата, наоборот, применялась не чистая солома, а дроблённые высушенные стержни селекционной кукурузы с низким исходным титром природной (в том числе термофильной) микрофлоры, поскольку уборка початков была ручная и проводилась в обвёртках с превентивной их сушкой.

Для понимания механизмов замеченных явлений и для апрбации модифицированного ускоренного (упрощённого) способа анаэробной ферментации (с использованием культуры B.cereus) нами проведены испытания (табл. 4), включающие два варианта. Причём в каждом варианте имелся (для контроля) мешочек незасеянный мицелием вешенки.

На контрольном мешочке первого варианта вообще ничего не росло в течение 15 дней, что почти в два раза превышало период (8 дней) до начала накопления биомассы сорных микромицетов в контрольном мешочке второго варианта.

Таблица 4

Зависимость скорости заращивания и уровня плодоотдачи вешенки от концентрации и зрелости культуры B.cereus, внесеной в смесовый субстрат (полова овса + дроблённые кукур. стержни, 1:2), анаэробно ферментированный по упрощённым схемам (конец 2007 г.)

Вариант культуры Bac.cereus, внесённой в субстрат (на 50-литровый бак)	Номер «волны» плодоношения	Период от инокуляции до уборки и между уборками, дн.	Урожай грибов с мешочка (по 2 кг), г		Плодоотдача, %	Кол-во сростков на мешочке, шт.	Кол-во грибов на мешочке, шт.	Средняя масса одного гриба,
			Пределы	Среднее				
Субстрат залитый кипятком, с последующим 1,5-суточным остыванием								
1. Зрелая (трёхмесячная) подсыхающая культура с двух пробирок	1	31-33	198-265	227	11,3	3,0	51	4,5
	2	18-22	75-106	89	4,5	2,8	12	7,4
	∑	52		316	15,8			
Субстрат залитый горячей водой (до 75 ºС) и помещённый в термостат на 12 часов для пастеризации (при 60 ºС), с последующим 1,5-суточным остыванием								
2. Молодая (недельная) культура с одного пробирочного косячка	1	23-25	355-402	382	18,1	4,0	73	5,2
	2	15-17	138-150	144	6,8	3,3	32	4,5
	∑	40		526	25,9			

На инокулированных двухкилограммовых мешочках в варианте №1 наблюдалась задержка роста не только конкурентов, но и задержка до 10 дней развития мицелия вешенки, что негативно сказалось на формировании первой волны грибов, но и продуктивость второй волны была ниже, чем в варианте 2. При второй «волне» имело место большее иссыхание субстратрата, поскольку продолжительность грибооборота существенно возросла в первом варинте, а выращивание вешенки в осенне-зимний период велось по так называемой «сухой» евротехнологии (без дополнительного опрыскивания).

При заливке субстрата кипятком гибнут или получают сильный стресс вегетирующие формы широкого спектра вредных и полезных микроорганизмов, в том числе термотолерантных и термофильных бактерий, но при этом активируется прорастание и бурное развитие их покоящихся спор, наблюдается прогрессирующая чрезмерная продукция активных метаболитов, чему нет фактически никакого противодействия в варианте 1. Поэтому для повышения качества субстратов получаемых по упрощённой схеме анаэробной ферментации, также как и при классических схемах (фаза 2 и фаза 1 + фаза 2), будет иметь значение тип и качество исходного сырья, его исходное микробиологическое состояние, и объём вносимой культуры B. cereus. Важным для работопригодности способа будет являться также предлагаемая нами модернизация схемы (вариант 2), которая достигалась замачиванием субстрата со слабой разводкой B. cereus горячей водой в эмалированных вёдрах с крышками, помещением их в термостаты для 12-часового прогревания (пастеризации) при 60 ºС и последующего 1,5 – 2-суточного остывания до температуры 30 ºС.

Таким образом, при анаэробных способах ферментации субстратов (в термокамерах и чанах), когда наблюдаются изменения условий от аэробных к анаэробным, более эффективной для качественной подготовки соломы (на фоне её исходной микрофлоры) является использование «молодой» культуры факультативно анаэробной B. cereus, в отличии от рекомендуемого раннее в литературе аэроба B. subtillis.

Использование модифицированных и адаптированных для условий Приамурья способов анаэробного повышения избирательности и качества питательных субстратов, несомненно, будет способствовать стабилизации товарного производства вешенки обыкновенной, ведущегося по индустриальной нестерильной евротехнологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чайка, А.К. Научное обеспечение развития грибоводства в Дальневосточном Федеральном округе / А.К.Чайка, Б.Г.Анненков, В.А.Азарова // Инновационное развитие как приоритет экономической политики в регионах Востока России. (Мат. Второго дальнев. межд. эконом. форума, Хабаровск, 18-19 сент. 2007 г., том 7). − Хабаровск: Правит. Хаб. края, ТОГУ, 2007.− С. 214-222.

2. Анненков, Б.Г. Хабаровский центр научного обеспечения дальневосточного грибоводства / Б.Г. Анненков, В.А. Азарова // Школа грибоводства, 2008, №1. − С. 46-53.

3. Анненков, Б.Г. Научные основы грибоводства и интенсивного культивирования вешенок в Приамурье // Б.Г. Анненков, В.А. Азарова // Научные основы повышения эффективности с.-х. производства на Дальнем Востоке России (Мат. IV Казьминских чтений, 29.11.2005). − Хабаровск: ДВНИИСХ РАСХН, 2006.− С.130-140.

4. Тишенков, А.Д. Грибоводство в Китае / А.Д. Тишенков // Школа грибоводства, 2006, №1 (− С. 29-35), №2 (− С. 29-36), №3 (− С. 25-31).

5. Тишенков, А.Д. Европа голосует за селективный субстрат вешенки / А.Д. Тишенков // Школа грибоводства, 2007, №2. − С. 23-25.

6. Капич, А.Н. Аэробная ферментация субстрата для выращивания вешенки обыкновенной… с участием бактерий рода Bacillus / А.Н. Капич, Л.Т. Мишин // Микология и фитопатология, 1998, том 32, вып. 5. − С. 61-66.

7. Новикова, И.И. Биологические особенности и компонентный состав активного комлекса штамма Streptomyces chrisomallus P-21 антагониста фитопатогенных грибов / И.И. Новикова, И.В. Бойкова, Ю.Д. Шенин // Вестник защиты растений, 2006, №3. − С. 13-21.

8. Jackson, M. Calbistrins, novel antifungal agents produced by Penicillium restrictum / M. Jackson, J. Karwowski, P. Humphrey // J. Antibiotics, 1993, 46, 1.− H. 34-38.

9. Тишенков, А.Д. Повышение селективности субстрата для выращивания вешенки с помощью аэробной ферментации / А.Д. Тишенков // Школа грибоводства, 2000, №5. − С. 14-17.

10. Бисько, Н.А. Термофильные бактерии и элективность субстрата для выращивания съедобных грибов рода Вешенка / Н.А. Бисько, В.Т. Билай // Школа грибоводства, 2006, №5. − С. 49-53.

11. Матершев, В.Г. Сколько стоит… селективность?/ В.Г. Матершев // Школа грибоводства, 2007, №1. − С. 25-26.

12. Тен Хак Мун. Микробиологический метод агротехники. − Хабаровск: Крайгосстат, 2004. − 97 с.

13. Прудникова, С.В. Микробиология: руководство для работ по малому практикуму / С.В. Прудникова, Ц.М. Гусян, Н.И. Сарматова. − Красноярск: Краснояр.гос. ун-т, 2004.− 105 с.

14. Черников В.А. Агроэкология: методология, технология, экономика / В.А. Черников [и др.]. − М.: Колос, 2004. − 400 с. (−С. 49)

15. Kubo K. Fungal inhibiting composition coprising Bacillus subtilis FERM BP-3418 (Патент США №5667779,1999)

16. Список пестицидов и агрохимикатов разрешенных к применению на территории Российской Федерации в 2006 году (Приложение к журналу «Защита и карантин растений, 2006, №6).− М., 2006.

17. Handelsman, J. Method of identifying Bacillus cereus having biocontrol activity / J.Handelsman, L.Halverson, E. Stabb (Патент США, №5543301, 1996).

18. Шапиро, Я.С. Микроорганизмы: вирусы, бактерии, грибы / Я.С. Шапиро. − СПб.: Изд-во «ЭЛБИ–СПб, 2003. − 323 с. (С. 104).