



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Fakulta zdravotně sociální  
Ústav laboratorní diagnostiky a veřejného zdraví

Bakalářská práce

# Enzymové aktivity a molekulární charakterizace hub v tlejícím dřevu

Vypracovala: Kristýna Konarovská, Dis.  
Vedoucí práce: RNDr. Petr Baldrian, Ph.D

České Budějovice 2016

## Abstrakt

Tlející dřevo je nezbytnou součástí lesního ekosystému. Hraje důležitou roli z hlediska koloběhu uhlíku a živin, obnovy lesa a uchování jeho biodiverzity. Dřevní hmota představuje dobře odolný a obtížně rozložitelný materiál. Některé houby mají díky produkci extracelulárních enzymů výborné možnosti lignocelulózu degradovat. Právě těmto enzymům a charakterizaci jejich houbových producentů v tlejícím dřevu se zabývá předkládaná bakalářská práce.

Cílem je popsat faktory, které ovlivňují složení a funkci společenstva hub v mrtvém dřevu. U vzorků odebraných z větví a kmenů dvou rozdílných druhů stromů, jedlí a buků, bylo s využitím chemického markeru ergosterolu popsáno množství biomasy hub a zastoupení jednotlivých druhů hub bylo popsáno na základě jejich molekulární charakteristiky. Dále byly analyzovány aktivity enzymů, které dřevo rozkládají.

Hlavní zkoumanou proměnnou byl původ vzorku, tj. že vzorky byly odebrány z jiných druhů dřevin (jedle stříbrná a buk evropský) a že pocházeli buď z větví, nebo z kmenů. Díky tomu bylo možné vzorky seřadit do čtyř skupin a porovnávat rozdíly mezi nimi. Zkoumaným objektem se tedy staly vzorky z jedlových větví (FWD-T), vzorky z bukových jedlí (FWD-B) vzorky z jedlových kmenů (CWD-T) a vzorky z bukových kmenů (CWD-B).

Analýzy potvrdily vyšší potenciální aktivitu enzymů u vzorků odebraných z větví a to zejména u endocelulázy, exocelulázy, endoxylanázy, N-acetylglukosaminidázy a  $\beta$ -glukosidázy. Vzorky větví měly také signifikantně vyšší pH. Analýza specifického markeru ergosterolu potvrdila více houbové biomasy u vzorků větví nežli u vzorků kmenů. Dále na úrovni houbových kmenů nebyla prokázána preference *Ascomycet* či *Basidiomycet* pro druh stromu či pro kmeny, nebo větve.

Vyšší hodnoty aktivity enzymů společně s houbovou biomasou a nižším pH dokládají více produkovaných houbových enzymů ve větvích v porovnání s kmeny. Houby zde silně ovlivňují substrát díky svému aktivnímu metabolismu. Vyšší hodnoty biomasy souvisí s rychlejší kolonizací větví houbami, která je zapříčiněna větším rozdílem průměru povrchu vůči objemu. Kolonizace větví je na rozdíl od kmenů pro houby rychlejší a snadnější. Větve ve výsledku podléhají rychlejšímu rozkladu.

## Abstract

Decomposing wood is necessary part of forest ecosystem. Wood is robust and hardly decomposable material. Some fungi can use enzymes to degrade lignocellulose. This bachelor thesis is concerned with these fungi and enzymes.

Goal of this work was to describe factors affecting composition of fungal community in deadwood. Two different kinds of trees - beech and fir had been sampled from trunks and branches and ergosterol content, fungal biomass, activity of extracellular enzymes and fungal community composition were determined.

Main watched property has been different source of samples coming from tree trunks (T) or branches (B) and from Silver fir (FWD) or European beech (CWD) thus forming 4 categories FWD-T, FWD-B, CWD-T and CWD-B.

Analysis confirmed higher potential activity of enzymes and higher pH in samples taken from branches specifically endocellulose, exocellulose, endoxylanase, N-acetylglucosaminidase and  $\beta$ -glucosidase. Ergosterol marker confirmed higher biomass content in branches. *Ascomycet* or *Basidiomycet* fungi content was not dependent on type of wood or its size.

Enzyme activity and fungi biomass with lower pH confirms higher fungi enzymes content in branches in comparison to trunks. Presence of fungi influences substrate thanks to active metabolism. Higher biomass values were linked to faster branches colonization and their decomposition.

## **Klíčová slova**

- dřevorozkladné houby
- tlející dřevo
- extracelulární enzymy
- ergosterol

## **Keywords**

- wood-decay fungi
- deadwood
- extracellular enzymes
- ergosterol

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a publikací uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne (datum)

.....

Kristýna Konarovská

## **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala především vedoucímu této bakalářské práce RNDr. Pertu Baldrianovi za umožnění a poskytnutí podmínek pro vznik této práce a také za trpělivost a cenné rady při konzultacích. Dále bych chtěla poděkovat všem kolegům z Laboratoře environmentální mikrobiologie za přátelský přístup. Jmenovitě bych ráda poděkovala Ing. Věře Merhautové a Romaně Míkové za rady při analýze aktivit enzymů a ergosterolu. Msc. Martině Štursové za mnohé konzultace výsledků a Bc. Vojtěchovi Tláskalovi za pomoc s molekulárními metodami.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>Teoretická část</b>	<b>11</b>
2.1	Struktura a složení dřeva	11
2.1.1	Struktura dřeva	11
2.1.2	Složení dřeva	12
2.2	Význam a funkce mrtvého dřeva v lesním ekosystému	13
2.3	Degradace lignocelulózy	13
2.4	Faktory ovlivňující degradaci dřeva	14
2.5	Organismy schopné degradace dřevní hmoty	15
2.5.1	Actinomycety a bakterie	15
2.5.2	Dřevokazné houby	15
2.5.3	Další organismy	16
2.6	Dřevorozkladné houby	16
2.7	Rozdělení dřevních hub podle typu hniloby	16
2.7.1	Houby bílé hniloby	17
2.7.2	Houby hnědé hniloby	17
2.7.3	Houby měkké hniloby	17
2.8	Enzymy hub degradující dřevní hmotu	18
2.8.1	Degradace celulózy	18
2.8.2	Degradace hemicelulózy	18
2.8.3	Degradace ligninu	19
2.9	Vývoj společenstva hub v mrtvém dřevu	20
2.9.1	Abiotické faktory	21
2.9.2	Biotické faktory	22
2.10	Tlející dřevo jako specifický ekosystém	23
<b>3</b>	<b>Cíle práce a hypotézy</b>	<b>24</b>
3.1	Cíle práce	24
3.2	Hypotézy	24
<b>4</b>	<b>Materiál a metody</b>	<b>25</b>
4.1	Zkoumaná lokalita	25
4.2	Materiál a jeho odběr	25
4.3	Použité metody	26
4.4	Stanovení vlhkosti a suché hmotnosti vzorků	26
4.5	Homogenizace vzorků	27
4.6	Stanovení chemického složení vzorků	27
4.7	Spektrofotometrické a fluorometrické stanovení aktivity enzymů	27
4.7.1	Stanovení aktivity extracelulárních enzymů	27
4.7.2	Stanovení aktivity endocelulózy a endoxylanázy	29
4.7.3	Stanovení aktivity manganové peroxidázy	29
4.7.4	Stanovení aktivity lakázy	30

4.8	Kvantifikace biomasy hub pomocí extrakce a HPLC analýzy ergosterolu	30
4.9	Izolace, purifikace a sekvenace DNA metodami next-generation sekvenování	30
4.9.1	Izolace a purifikace DNA	30
4.9.2	Sekvenace DNA metodami next-generation sekvenování	31
4.10	Ředění použitých roztoků	32
<b>5</b>	<b>Výsledky</b>	<b>34</b>
5.1	Výsledky stanovení chemického složení vzorků	34
5.1.1	Výsledky stanovení uhlíku a dusíku ve vzorcích	34
5.1.2	Výsledky stanovení pH ve vzorcích	35
5.2	Výsledky spektrofotometrického a fluorometrického stanovení aktivity enzymů ve vzorcích	36
5.3	Výsledky analýzy ergosterolu	42
5.4	Popis společenstva hub	43
<b>6</b>	<b>Diskuze</b>	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>Závěr</b>	<b>47</b>
<b>8</b>	<b>Seznam informačních zdrojů</b>	<b>48</b>
<b>9</b>	<b>Přílohy</b>	<b>56</b>



## Seznam použitých zkratek

ABTS	2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-s lfonová kyselina
AMC	7-amidomethyl-4-kumarin
ANOVA	Analysis of variance (analýza rozptylu)
CWD	Coarse woody debris (označení pro kmeny)
DMSO	dimethylsulfoxide
ECM	ektomykorhizní
EDTA	2, 2, 2, 2-(ethan-1,2-diyldinitrylo)tetraoctová kyselina
FWD	Fine woody debris (označení pro větve)
MBTH	3-metyl-2-benzotiazolinon
MnP	manganová peroxidáza
MUF	methylumbellyferol
MUFaG	4-methylumbellyferyl- $\alpha$ -D-glukopyranosid
MUFC	4-methylumbellyferyl-N-celobiosid
MUFG	4-methylumbellyferyl- $\beta$ -D-glukopyranosid
MUFL	4-methylumbellyferyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid
MUFN	4-methylumbellyferyl-N-acetylglukozaminid
MUFP	4-methylumbellyferyl-fosfát
MUFX	4-methylumbellyferyl- $\beta$ -D-xylopyranosid
MUFCy	4-methylumbellyferyl-kaprylát
pH	vodíkový exponent

# 1 Úvod

Studium dřevorozkladných hub a jejich enzymů je důležité nejen z hlediska biodiverzity lesa, ale také z pohledu dynamiky degradace dřeva. Dřevokazné houby jsou nejvýznamnějším rozkladači lignocelulózy. Metabolické procesy ve všech živých organismech jsou řízeny enzymy. Právě ligninolytické a celulolytické enzymy jsou základním pilířem pro degradaci dřevní hmoty.

Cílem této bakalářské práce je popsat faktory, které ovlivňují složení a funkci společenstva hub v mrtvém dřevu a ověření hypotéz o rozdílném zastoupení enzymů hub mezi vzorky z buků a jedlí v závislosti na velikosti materiálu z kterého byl vzorek odebrán.

V rámci této bakalářské práce jsem mohla provést analýzu vzorků z projektu zaměřeného na výzkum mrtvého dřeva a jeho biodiverzity, na kterém spolupracuje Národní park Bavorský les a Laboratořích environmentální mikrobiologie Akademie věd ČR.

Zkoumaným materiálem byly vzorky z větví a kmenů jedle stříbrné a buku evropského. Větve a kmeny obou dřevin byly na předem určených stanovištích rozmístěny pracovníky správy Národního parku Bavorský les. V říjnu roku 2012 byl uskutečněn první odběr vzorků těchto větví a kmenů, který byl zpracován v Laboratoři environmentální mikrobiologie v sektoru ekologie Mikrobiologického ústavu, v.v.i. Akademie věd České republiky. Větve a kmeny byl ponechán na svých stanovištích pro další zkoumání.

V roce 2013 byl proveden druhý odběr vzorku ze stejného materiálu. Vzorky z tohoto druhého odběru se staly zkoumaným subjektem v rámci výzkumné část této bakalářské práce.

## 2 Teoretická část

Cílem teoretické části bakalářské práce je vytvořit literární přehled a vhled do problematiky. V následujících kapitolách se budu podrobněji zabývat strukturou a složením dřeva, významem a funkcí mrtvého dřeva v lesním ekosystému, faktory ovlivňujícími degradaci dřeva, degradací lignocelulózy. Dále organismy schopnými degradace dřevní biomasy, dřevními houbami a jejich rozdělením, enzymy hub a jejich funkci v degradaci dřeva, tlejícím dřevem jako ekosystémem a faktory, které mohou ovlivnit tlení dřeva.

### 2.1 Struktura a složení dřeva

Za dřevo považujeme odkorněnou část kmene, větví a kořenů, tedy vlastní kostru rostliny. Dřevní biomasa je výsledkem cyklických růstových procesů dřevin, kdy část asimilátů je ukládána v druhotně tloušťnoucím stonku ve formě letokruhů (Jankovský, 1999).

#### 2.1.1 Struktura dřeva

Dřevní hmota je tvořena především stěnami rostlinných buněk, které jsou složeny v zásadě ze tří vrstev. Jedná se o střední lamelu, primární buněčnou stěnu a sekundární vnitřní buněčnou stěnu.

Střední lamela se nachází na povrchu primární buněčné stěny. Jedná se o tenkou vrstvu tvořenou pektinem, která spojuje jednotlivé okolní buňky.

Primární buněčná stěna se stává z vláken celulózy, hemicelulózy, pektinu a proteinů. Je tvořena hlavně mikrofibrilami celulózy, ty jsou ukotveny do hemicelulózy a pektinu, společně pak tvoří amorfni hmotu (Stern, 1997).

Sekundární buněčná stěna se nachází pod primární stěnou. Jedná se o širší vrstvu slouženou z několika podvrstev S1, S2 a S3. Obsahuje celulózu, hemicelulózu, lignin a pektin. V primární buněčné stěně je však pektinu více než v sekundární stěně. Orientace mikro fibril se v různých podvrstvách liší, což zajišťuje pevnost oproti primární stěně, která je spíše flexibilní. Lignin zvyšuje tvrdost sekundární stěny (Evans a Hedger, 2001).

### 2.1.2 Složení dřeva

Chemicky představují buněčné stěny dřeva směs celulózy, hemicelulózy, ligninu pektinu a proteinů. Složení dřeva se liší podle jednotlivých druhů dřevin.

Celulóza je polymer  $\beta$ -glukózy a je považována za základní stavební jednotku buněčné stěny rostlin. Jedná se o nejzastoupenější biopolymer na zemském povrchu a je ve vodě nerozpustná. Její dlouhé, nerozvětvené řetězce jsou tvořeny jednotlivými glukózovými jednotkami, které jsou spojené 1,4- $\beta$  glykosidickou vazbou. Molekuly glukózy navzájem propojují vodíkové můstky. Tyto dlouhé nevětvené polymery celulózy tvoří v buněčných stěnách rostlin vyšší struktury vláken nazývané mikrofibrily. Tato vlákna jsou velmi pevná v tahu a jsou dobře odolná vůči chemické a biologické degradaci. Funkce celulózy je tedy mechanická a stavební (Pazourek a Votrubová, 1997).

Hemicelulóza je chemicky rozmanitější než celulóza. Jedná se o lineární a větvené řetězce polysacharidů obsahující D-glukózu, D-mannózu, D-galaktózu nebo D-xylózu a L-arabinózu. Zastoupení jednotlivých sacharidů se liší v závislosti na druhu rostliny. Hemicelulózy obsažené ve dřevě většinou obsahují dvě až šest různých sacharidových jednotek nejčastěji spojených 1,4- $\beta$  glykosidickou vazbou (Berg, 2003). Hemicelulóza se podílí se na stavbě buněčné stěny jako pojivo mezi celulózou a ligninem. Dále může sloužit jako rezervní látka metabolismu rostliny.

Lignin je látka polymerní povahy, obsahující fenolická jádra. Obklopuje mikrofibrily celulózy a je kovalentně navázán na hemicelulózu. Je druhou nejčastější organickou sloučeninou na Zemi. Zastoupení ligninu je vyšší u jehličnatých než u listnatých stromů. Slouží jako impregnující složka buněčné stěny a je vždy vázán na celulózu (Jankovský, 1999).

Pektiny jsou lineární polymery  $\alpha$ -1,4-D-galakturonové kyseliny obsahující úseky bohaté na L-ramnózu. Obsahují postranní řetězce zejména arabinózy, galaktózy a xyulózy. Pektinové sloučeniny představují hlavní složku střední lamely a primární stěny (Alkorta *et al.*, 1998).

Bílkoviny buněčné stěny jsou typické glykoproteiny. Jedná se o tzv. extensiny, které jsou bohaté na aminokyseliny, jako jsou hydroxyprolin, glycin a prolin. Extensiny jsou

nedílnou součástí buněčné stěny s důležitou strukturální rolí. Jejich funkcí je ochrana rostliny před patogeny.

## **2.2 Význam a funkce mrtvého dřeva v lesním ekosystému**

Mrtvé dřevo má příznivý vliv na uchování stability a kontinuity lesního ekosystému a pro jeho obnovu. Doba dekompozice dřeva může trvat až 180 let (Jankovský, 2005).

Z tohoto pohledu tlející dřevní biomasa podporuje množství organismů, například hub, bakterií, lišejníků nebo drobných obratlovců a zprostředkovává tím biodiverzitu celého ekosystému. Dřevní hmota padlých stromů ovlivňuje půdní vlhkost a v suchých periodách může mrtvé dřevo sloužit jako útočiště pro půdní organismy, z nichž některé jsou na něm zcela závislé. Právě závislost některých organismů na tlejícím dřevu a jejich ekologická návaznost je považována za jeden z nejdůležitějších významů mrtvého dřeva.

Dekompozice dřeva je součástí biochemických cyklů zejména uhlíku, dusíku a fosforu. Mrtvé dřevo představuje velkou a dynamickou zásobárnu uhlíku, která lépe odolává rozpadu než jiný rostlinný odpad (Freschet *et al.*, 2012).

Dále mrtvé dřevo tvoří substrát a významný zdroj živin pro lesní dřeviny. Přispívá ke stabilizaci půdního povrchu a slouží jako prevence půdní eroze, čímž se podílí na celkové geomorfologii ekosystému (Svoboda, 2007).

Tlející dřevo je důležitým ukazatelem přirozených lesů. I přes jeho velký ekologický význam, je množství tohoto dřeva v hospodářských lesích velmi nízké (Ovaskainen *et al.*, 2013).

## **2.3 Degradace lignocelulózy**

Dřevo je jedním z nejdokonalejších přírodních polymerů, jedná se o velmi pevný a odolný materiál s rozvinutou obranou proti degradaci mikroorganismy (Stokland *et al.*, 2012).

Tlení dřeva lze obecně rozdělit do několika tříd, podle množství ztraceného objemu suché váhy stromu.

Jako nultou třídu označujeme oslabený strom. Strom je žijící, olistěný, i když například zraněný, nebo oslabený suchem či stářím. Přibližné množství biomasy je zachovalé.

Za první třídu tlení lze označit strom, který je nedávno uhynulý. Dřevo je stále pevné, strom je pokryt kůrou. Přibližné množství zbývající biomasy je 100-95 %.

Slabě zetlelý strom je typickým pro druhou třídu tlení. Kůra je uvolněná, na některých místech začíná odpadávat. Pod kůrou lze pozorovat počáteční mycelium. Došlo ke ztrátě větviček menší než 4 cm. Přibližné množství zbývající biomasy je 95-75 %.

Za třetí třídu tlení považujeme středně zetlelý strom. Dřevo je měkké, kůra a větve jsou částečně ztraceny. Původní kmen zůstává nedotknutý. Přibližné množství zbývající dřevní biomasy je 75-50 %.

Čtvrtou třídou jsou velmi zetlelé stromy. Kůra je ztracená na většině plochy. Kmen se fermentuje a dřevo nemá pevnou strukturu. Přibližné množství zbývající biomasy je 50-25 %.

Poslední, pátou třídou označujeme téměř rozložené stromy. Jejich dřevo je velmi silně zetlelé. Je velmi drolivé a křehké. Původní kmen již není rozpoznatelný. Přibližné množství dřevní biomasy je 25-0 % (Stokland *et. al.*, 2005).

## **2.4 Faktory ovlivňující degradaci dřeva**

Samotný proces tlení dřeva, je ovlivněn mnoha faktory, jako jsou typ dřeviny, délka a průměr kmene, třída rozkladu a forma tlení, klimatické podmínky a množství biologické aktivity v místě, kde se dřevo nachází, nebo příčiny odumření dřeva (Svoboda, 2007).

Tlení mrtvého dřeva ovlivňuje řada procesů, jakými jsou respirace, biologická transformace, vyplavování, zvětrávání a fragmentaci.

Podobně jako u respirace i u biologické transformace dochází k přeměně organických látek vázaných ve dřevě, které pro svůj metabolismus upotřebují nejen mikroorganismy a bezobratlí živočichové.

Za procesem vyplavování stojí voda, která ve formě vodních srážek dopadá na dřevo, prostupuje jím a vyplavuje ve vodě rozpustné látky. V důsledku působení atmosféry na povrch mrtvého dřeva dochází k jeho zvětrávání.

K fyzikální fragmentace může docházet při pádu dřeva na povrch nebo například za pomoci střídání teplot, kdy dřevní masa zmrzne a rozmrzá, čímž dochází ke vzniku trhlin.

O biologické fermentaci mluvíme v souvislosti s činností mikroorganismů, hub hmyzu nebo jiných organismů (Svoboda, 2007).

## **2.5 Organismy schopné degradace dřevní hmoty**

Zatím co celulóza může být rozkládána a zpracovávána řadou organismů, lignin je toxický prakticky pro většinu organismů těžko rozložitelný. Dřevorozkladné houby, jako jediné organismy, produkují komplex enzymů peroxidáz, polyfenoloxidáz a lakáz, díky kterému jsou schopné degradovat všechny složky dřeva, včetně ligninu (Jankovský, 2005).

Výhodou degradace ligninu je přístup k lépe energeticky využitelným substrátům, jako je celulóza a hemicelulóza. Samotný lignin tedy nepřestavuje pro rozkladače energeticky využitelný zdroj. Kromě dřevorozkladných hub se degradace dřeva účastní také bakterie a bezobratlí živočichové (Stokland *et. al.*, 2012).

### **2.5.1 Actinomycety a bakterie**

Degradace lignocelulózy prokaryoty je pomalý proces ovlivněný nepřítomností silných ligninolytických enzymů jakým je např. ligninová peroxidasa. Důležitá role *Actinomycet* a ostatních bakterií je zejména v humifikačních procesech spojených s půdou. Dalším přínosem mnohých bakterií je schopnost odbourávat oligomerní a monomerní aromatické sloučeniny, které se uvolňují v průběhu rozkladu ligninu houbami (Malherbe a Cloete, 2002).

### **2.5.2 Dřevokazné houby**

Za nejvýznamnější rozkladače lignocelulózy jsou považované houby, zvláště pak houby bílé hniloby. Lignin degradující enzymy, kterými tyto houby disponují, jim pomáhají k překonání ligninové bariéry. Tím mohou překonat limitující krok v uhlíkovém cyklu. (Malherbe a Cloete, 2002).

Dřevokazné houby můžeme dělit podle dřeva, které napadají. Saprotrofní houby kolonizují odumřelou dřevní hmotu. Houby parazitické napadají dřevo živých stromů

a houby saproparazitické atakují dřevo živý stromů, jejich činnost může vést až k úmrtí takto napadeného stromu.

### **2.5.3 Další organismy**

Mezi organismy, které jsou schopné degradovat lignocelulózu také patří někteří prvoci a kvasinky. Bezobratlí živočichové svou činností zvyšují aeraci dřeva a rozšiřují tím plochu, která může být osídlena houbami. Dále přispívají k mechanickému rozkladu dřeva a tím ke snazší enzymatické degradaci. U některých druhů termitů byly objeveny symbiotické bakterie napomáhající trávení dřeva (Breznak, 2000; Dillon a Dillon, 2004).

## **2.6 Dřevorozkladné houby**

Dřevní houby jsou specifickou fyziologicko - ekologickou skupinou heterotrofních organismů. Jak již bylo zmíněno jejich základní vlastností je rozklad lignocelulózní dřevní hmoty. Vlákňité houby, které dokáží degradovat komplexní strukturu dřevin a mohou jí využít jako zdroj energie většinou řadíme do oddělení stopkovýtrusných (*Basidiomycota*) třídy *Agaricomycetes* a vřeckovýtrusných (*Ascomycota*). *Basidiomycota* a *Ascomycota* dohromady tvoří podříši *Dikarya* – vyšší houby (Arantes *et al.*, 2012; Ohm *et al.*, 2014). Dřevorozkladné houby uskutečňují sukcesní pochody vedoucí k huminifikaci až mineralizaci dřeva, které je pro ně přirozeným prostředím. Dokáží však kolonizovat i jiné organické substráty. Další vlastností dřevorozkladných hub je dekompozice dřevní biomasy, která se nachází pod povrchem, objem dřeva uložený v zemi je dle odhadů 1/3 až 1/2 celkové dřevní hmoty stromu (Jankovský, 1999).

Studium dřevokazných hub je důležité nejen z hlediska biodiversity lesa, ale také z pohledu dynamiky dřeva. Dřevorozkladné houby jsou hlavním faktorem v rozkladu tlejícího dřeva a jejich druhová skladba značně ovlivňuje tento proces (Černý, 1989).

## **2.7 Rozdělení dřevních hub podle typu hniloby**

Dle morfologie rozkladu dřeva můžeme rozlišit tzv. houby bílé, hnědé a měkké hniloby (Errikson *et al.*, 1990). Toto dělení vychází z rozdílného využití složek dřeva jak na makroskopické tak i mikroskopické úrovni (Liers *et al.*, 2011).



### 2.7.1 Houby bílé hniloby

Houby bílého tlení mají ojedinělou vlastnost degradace ligninu. Svůj název získaly podle vzhledu jimi napadeného dřeva, kdy rozklad ligninu vede u napadeného dřeva k jeho vybělení (Šula, Svobodová, 2006). Tito velmi efektivními rozkladači, kteří dokáží kromě ligninu degradovat i celulózu a hemicelulózu. U hub bílé hniloby můžeme rozdělit dva druhy napadení. Při prvním typu, tzv. selektivní degradaci, je nejdříve atakován lignin a hemicelulóza a celulóza je napadena později. Zatím co u druhého typu napadení, tzv. současné delignifikaci dochází k degradaci všech tří biopolymerů zároveň (Otjen a Blanchette, 1986).

Houby bílé hniloby se systematicky řadí převážně mezi *Basidiomycotina*. Typickým příkladem houby bílé hniloby je *Phanerochaete chrysosporium*.

### 2.7.2 Houby hnědé hniloby

Houby hnědého tlení reprezentují houby schopné rozkládat celulózu a hemicelulózu aniž by odstranily sousední lignin. Díky neúplnému rozkladu ligninu není zcela zřejmé, jak k celulóze získávají přístup (Martínez *et al.*, 2005). Napadené dřevo rychle ztrácí hmotnost i objem díky úbytku celulózy. Dřevo křehne, láme se a často kostkovitě praská (Jankovský, 2005).

Houby hnědé hniloby se řadí mezi *Basidiomycotina* a zástupcem je například *Fomitopsis pinicola*.

### 2.7.3 Houby měkké hniloby

Rychlost dekompozice houbami měkkého tlení je v porovnání s houbami bílé a hnědé hniloby nízká. Tento fakt je zřejmě zapříčiněn zhoršenou prostupností celuláz hub měkké hniloby do dřeva. (Schwarze *et al.*, 2000). Společně s bakteriemi ale dokáží dobře rozkládat dřevo ve vlhkém a vodním prostředí, které je pro houby bílé a hnědé hniloby nepříznivé. Důsledek napadení těmito houbami je kašovitá konzistence dřeva.

Toxonomicky řadíme houby měkké hniloby do pododdělení *Ascomycotina* a *Deuteromycotina*.

## 2.8 Enzymy hub degradující dřevní hmotu

Za biodegradaci dřeva považujeme proces přeměny jednotlivých složek dřeva na jednodušší a menší molekuly. Tyto molekuly jsou pak schopny projít buněčnou stěnou hyf a být dále využity metabolismem hub. Metabolické procesy ve všech živých organismech jsou řízeny enzymy. Široká škála celulolytických a ligninolytických hub využívá mnoha extracelulárních enzymů (Baldrian, 2008). Těmito enzymy jsou zejména hydrolázy štěpící všechny polysacharidové složky ve dřevě na monosacharidy. Polysacharidové složky se ale v kombinaci s ligninem stávají odolnými proti hydrolytickému štěpení. (Leonowicz *et al.*, 1999).

### 2.8.1 Degradace celulózy

Celulózní složky dřeva degradují celulózy. Ty můžeme u hub dělit do tří typů enzymů, které se navzájem funkčně liší. Tyto enzymy jsou produkovány jako multikomponentní enzymatický systém a jejich působení se navzájem doplňuje. Mohou se vyskytovat jednotlivě nebo jako agregáty.

Prvním typem celuláz jsou endoglukanázy štěpící náhodným způsobem glykosidické vazby v celulózovém vláknu. Tímto způsobem vznikají oligosacharidové řetězce o různé délce. Ty ale mohou být stále připojené k mikrofibrilární struktuře. Příkladem tohoto typu enzymů je  $\beta$ -1,4-endoglukanáza. Endoglukanázy jsou produkovány *Basidiomycetami* a jejich pH optimum je ve většině případů v rozmezí 4,0 – 5,0 (Edwards *et al.*, 2008).

Dalším typem enzymů jsou celobiohydrolázy odštěpující celobiózu nebo glukózu z redukujícího, nebo neredukujícího konce celulózového řetězce (Edwards *et al.*, 2008). Na rozdíl od hub bílého tlení, ze kterých byly celobiohydrolázy opakovaně izolovány, u hub hnědé hniloby prokazatelně chybí (Baldrian a Voříšková, 2008).

Posledním typem celuláz je 1,4- $\beta$ -glukosidáza. Jejím úkolem je hydrolýza celobiózy a jiných oligosacharidů rozpustných ve vodě na glukózu.

### 2.8.2 Degradace hemicelulózy

Degradace hemicelulózy vyžaduje celý soubor různých enzymů, který odráží složení a složitost této struktury. Enzymový soubor se může lišit podle toho, zda se jedná

o degradaci xylanu, který obsahuje hemicelulózový typ nacházející se v krytosemenných dřevinách, nebo glukomanan, který se naopak vyskytuje v nahosemenných dřevinách.

Samotný proces degradace hemicelulózy se skládá z pěti kroků. První část degradace xylanu je zajištěna enzymem  $\beta$ -1,4-endoxylanázou, která atakuje vazby uprostřed molekuly a vytváří tím kratší oligomery. Pomocí dalších třech enzymů dochází ke štěpení specifických chemických vazeb, které spojují postranní řetězce a hlavní molekulu. Na závěr enzym  $\beta$ -1,4-xylozidáza hydrolyzuje xylooligosacharidy a vytváří xylózu. Xylóza je stavební jednotkou xylanu. Jedná se o monosacharid, který odpovídá molekule glukózy v celulóze. Rozklad glukomananu je podobný degradaci xylanu. Iniciální enzym rozštěpí molekulu na menší fragmenty, další rozštěpí specifické vazby s postranními řetězci. Závěrem dochází k odštěpení glukózové a manózové molekuly dvěma různými enzymy (Van Den Brink a De Vries, 2011).

### 2.8.3 Degradace ligninu

Degradace ligninu umožňuje přístup k celulóze, hemicelulóze a nízkomolekulárním látkám, které jsou obsaženy v dřevní hmotě. Další výhodou degradace ligninu přináší kolonizace velkého objemu dřevní hmoty. Mezi enzymy ligninolytického systému patří peroxidázy, lakázy a enzymy produkující peroxid vodíku.

Degradaci ligninu katalyzují ligninolytické peroxidázy, jakou je v první řadě manganová peroxidáza. Manganová peroxidáza je hemový protein s molekulovou hmotností okolo 46 kDa. Její pH optimum se nachází v kyselé oblasti (Hofrichter, 2002).

Manganová peroxidáza oxiduje  $Mn^{2+}$  na vysoce reaktivní  $Mn^{3+}$ , který je stabilizován organickými kyselinami, jakými jsou např. malát, oxalát, laktát nebo malonát. Dále je také schopná oxidace fenolických substrátů (Martínez, 2002).

Dalšími typy peroxidáz jsou například ligninová peroxidáza nebo versalitiní peroxidáza. Lignin peroxidáza degraduje jak fenolické, ale především nefenolické podjednotky ligninu, které tvoří až 90% polymeru. (Kirk a Cullen, 1998). Verzatilní peroxidáza má katalytické vlastnosti ligninové i manganové peroxidázy. Je schopná degradace nefenolických i fenolických podjednotek ligninu, zároveň může oxidovat  $Mn^{2+}$  na  $Mn^{3+}$  (Martínez, 2002).

Pro činnost peroxidáz je nezbytný peroxid vodíku, který je potřebný pro tvorbu kyslíkových radikálů, které štěpí kovalentní vazby mezi podjednotkami ligninu (Ruiz-Dueñas & Martínez 2009).

Peroxidy vznikají činností další rodiny enzymů - oxidáz. Za nejvýznamější oxidázu považujeme glyoxyl oxidázu. Glyoxyl oxidáza je glykoprotein prodující  $H_2O_2$  a oxalát. Pro tvorbu peroxidu vodíku používá produktů degradace ligninu (Kersten a Cullen, 2007). Jak vyplývá z výše uvedeného textu peroxidázy a enzymy produkující peroxid vodíku pracují součinně.

Lakázy jsou poslední rodinou enzymů, která se podílí na rozkladu ligninu u hub bílé hniloby. Lakázy jsou glykoproteiny s velikostí okolo 60 kDa a kyselým pH optimem. Obsahující čtyři atomy mědi v jedné molekule enzymu. Jejich nízký redoxní potenciál jim umožňuje pouze degradaci fenolické složky ligninu, která tvoří jen 10% z celku molekuly (Kirk a Cullen 1998). Lakázy využívají ke své funkci molekulární kyslík, což jim umožňuje nezávislost na jiném enzymatickém systému. Lakáza je produkována většinou ligninolytických *Basidiomycet*. (Baldrian 2006; Sharma *et al.* 2007).

## 2.9 Vývoj společenstva hub v mrtvém dřevu

Sukcese společenstva hub na tlejícím dřevu je velmi nepředvídatelným a komplexním procesem.

Houby mohou kolonizovat substrát dvěma různými způsoby. Prvním z nich je rozšíření za pomoci spor, druhým pak kolonizace myceliem. Výhoda kolonizací pomocí mycelií spočívá v možnosti použití svazků hyf k transportu živin do osídlovaného substrátu v případě potřeby (Lindahl *et al.* 1999). V případě, že se mycelium dostane do kontaktu s novým, energeticky bohatým substrátem, může pak živiny přemístit do chudších míst (Boddy, 2001).

Prvními kolonizátory mrtvého dřeva, které nebylo dříve napadeno jinými patogeny, jsou obvykle bakterie a houby měkké hniloby. Dosud nekolonizované prostředí je pro ně výhodné dostatkem živin a umožňuje jim rychlejší růst a reprodukci (Renvall, 1995).

První kolonizátoři svým působením modifikují chemicko-fyzikální vlastnosti stromu. Ovlivňují stupeň rozkladu, obsah vlhkosti a přítomnost sekundárních metabolitů,

tím usnadňují, nebo zamezují další kolonizaci substrátu jinými druhy hub (Fukami *et al.*, 2010). Postupně, po spotřebování jednoduchých látek ze substrátu, jsou primární saprotrofové vytlačováni sekundárními. S další degradací dřeva začínají být více zastoupené houby hnědé a bílé hniloby, které jsou lepšími kompetitory. Ve druhém a třetím stádiu tlení ve společenstvu dominují právě houby bílé a hnědé hniloby a rychlost tlení kulminuje. V kmenech, které jsou již silně rozložené, jsou četné ektomykorhizní (ECM) houby. V posledním stádiu rozkladu kmene lze nalézt největší druhovou variabilitu hub. Počet druhů úměrně stoupá s klesající hmotou dřeva. (Renvall, 1995; Rajala *et al.*, 2012). S postupným rozkladem klesá výskyt plodnic na kmenech. Tento fakt je zapříčiněn velkými energetickými nároky na tvorbu plodnic a snižujícím se množstvím živin v téměř zetlelém dřevu (Stenlid *et al.*, 2008).

Diverzita houbového společenstva se během dekompozice dřeva zvyšuje a dosahuje vrcholu ve středně rozložených stromech. Nedávno padlé stromy tvoří kvůli své nedostatečné vlhkosti a vysokému obsahu terpenů a fenolických látek nepříliš pohostinné prostředí pro houby. To může být důvodem zvyšování houbové diverzity v průběhu tlení. V pozdních stádiích degradace začínají dřevo kolonizovat půdní houby a rozdíl mezi tlejícím dřevem a půdou se postupně vytrácí (Rajala *et al.*, 2012).

Houby můžeme charakterizovat podle míry odolnosti na stres, který jim přináší osídlení nehostinného substrátu. Stresové podmínky mohou být způsobeny například vysokou, nebo naopak nízkou vlhkostí, velkými teplotními rozdíly, přítomností antimikrobiálních látek nebo malým množstvím živin. Houby, které jsou schopny kolonizovat a žít na substrátu, který je pro ostatní druhy neobyvatelný se dají označit za stres-tolerantní (Boddy, 2001).

Kolonizace mrtvého dřeva společenstvem hub je závislá na mnohých faktorech. Tuto složitou dynamiku ovlivňují jak abiotické tak biotické faktory.

### **2.9.1 Abiotické faktory**

Mezi abiotické faktory řadíme především stupeň rozkladu dřeva, objem, délku a hustotu dřevní biomasy, teplotu, vlhkost a další klimatické podmínky.

Za významné považujeme především abiotické faktory, které mají přímý vliv na substrát a na společenstvo hub.

Pro prvotní kolonizaci je důležitý způsob, jakým strom odumřel a relativní plocha, která je v kontaktu s půdou. Rozdíl je patrný například u stromů stojících, kde je rozklad pomalejší, nežli u padlého ležícího dřeva, které má vyšší vlhkost a je lépe přístupné pro rozkladače (Cornelissen *et al.*, 2012).

Strukturu houbového společenstva ovlivňují i vlastnosti stromů. Listnaté a jehličnaté stromy se od sebe značně liší svými chemickými, fyzikálními i anatomickými vlastnostmi (Kulhánková *et al.*, 2006). To má za následek rozdílné zastoupení společenstva hub u jehličnatých a listnatých stromů.

Pro dřevorozkladné houby je důležitá i velikost dostupného povrchu substrátu. Rychlost kolonizace je patrná na rozdílu kmenů a větví. Větve mají vyšší průměr povrchu vůči objemu a jejich osídlení houbami je tedy rychlejší.

Důležitým abiotickým faktorem je i teplota. V laboratorních podmínkách vykazují mycelia hub odolnost k nízkým teplotám. Ve svém přirozeném prostředí ale přestávají růst při teplotě okolo bodu mrazu (Stenlid *et al.*, 2008). Teplota ovlivňuje i rychlost samotného tlení. Dřevo je díky teplotním optimům degradujících enzymů, které je kolem 40-60 °C, rychleji rozkládáno v prostředí s teplejším klimatem (Baldrian a Valášková 2008).

Vlhkost dřeva je určena vnějšími klimatickými podmínkami ale i samotným tlením, jelikož voda je jedním z finálních produktů mineralizace složek dřevní biomasy. Enzymy degradující dřevo jsou rozpustné ve vodě, proto by bez počátečního alespoň malého množství vody by nedošlo k rozvoji hniloby (Magan, 2008). Příliš vysoká vlhkost má naopak inhibiční vliv na společenstvo hub, který je zapříčiněn utlumením přísunu kyslíku.

### **2.9.2 Biotické faktory**

Mezi významné biotické faktory patří druhová selektivita hub k substrátu, vliv ostatních organismů, antagonistické interakce nebo vztah mezi předchozím a následujícím kolonizátorem substrátu (Boddy, 2001; Heilmann-Clausen *et al.*, 2014). Vlivem ostatních organismů na vývoj společenstva hub a naopak se bude zabývat následující kapitola.

## 2.10 Tlející dřevo jako specifický ekosystém

Jestliže mají organismy stejné prostředí a zdroj živin, nevyhnutelně mezi sebou interagují. Prostedí dřevních hub a půdních bakterií nemusí být vždy stejné, přesto mohou bakterie těžit z přítomnosti hub v tlejícím dřevu, aniž by spolu přímo interagovali. Dřevokazné houby na rozdíl od bakterií dokáží degradovat i složitější materiál jako je lignin a polysacharidy buněčné stěny. Přítomnost hub je tak pro bakterie přínosná díky zvyšování podílu živin v prostředí, které produkuje houba v průběhu degradace dřevní hmoty (Boer *et al.*, 2005; Baldrian, 2008).

Houby mohou záměrně ovlivňovat organismy ve svém okolí přímými interakcemi. Například typickou reakcí ligninolytických hub při detekování přítomnosti půdních bakterií je zvýšená produkce lakázy, která u některých hub katalizuje tvorbu antibiotických látek. Ovšem přímý účinek lakáz nebyl prokázán (Eggert, 1997; Baldrian 2006). Další možností hub jak omezit jiné organismy může být tvorba toxinů.

Bakterie pak mohou tvořit fungistika nebo těkavé látky, kterými mohou ovlivnit růst huba a produkci jejich enzymů.

Jak bylo zmíněno v předchozí kapitole složení mikrobiálního společenstva však také záleží na řadě abiotických faktorů jakými jsou například pH, vlhkost nebo teplota.

## **3 Cíle práce a hypotézy**

### **3.1 Cíle práce**

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo vytvořit literární přehled a vhléd do problematiky mrtvého dřeva, dřevorozkladných hub a jejich enzymů.

Cílem metodické části je popsat společenství hub v mrtvém dřevu a faktory, které ovlivňují jeho složení.

### **3.2 Hypotézy**

H1: Předpokládám rozdílné zastoupení společenstva hub ve vzorcích jedlí a buků.

H2: Domnívám se, že vyšší potenciální aktivity enzymů hub budou ve vzorcích z větví nežli z kmenů.

H3: Předpokládám vyšší potenciální aktivitu enzymů hub ve vzorcích z jedlových kmenů, než ve vzorcích z bukových kmenů.



## **4 Materiál a metody**

Zkoumaný subjektem pro tuto bakalářskou práci se stal soubor 127 vzorků. Vzorky byly odebrány z kmenů a větví stromů, které se nachází na území Národního parku Bavorský les v rámci studie zaměřené na výzkum mrtvého dřeva a jeho biodiverzity. Dřevinami ze kterých byly vzorky odebrány, byly buk evropský a jedle stříbrná.

V následujících kapitolách se budu zabývat zkoumanou lokalitou, materiálem a jednotlivými metodami použitými pro výzkum.

### **4.1 Zkoumaná lokalita**

Národní park Bavorský les se nachází na jihovýchodě Německa. Je prvním vyhlášeným národním parkem v Německu a jeho rozloha činí 24 222 ha (Národní park Bavorský les, 2015).

S Národním parkem Šumava sousedí severní a východní stranou a společně tvoří jeden z největších bilaterálních národních parků Střední Evropy. Národní park Bavorský les pokrývá z 90 % horský smíšený les smrků, buků a jedlí.

Dle Plánu péče Národního parku z roku 2010 je cílem přednostně zajistit působení přírodních živlů a nenarušenou dynamiku žijících společenstev na tomto území. Lesy Národního parku se tak budou vyvíjet bez zásahu člověka směrem zpět k lesům přírodním. Přírodní události jako napadení houbami, hmyzem nebo škody sněhem jsou podstatným faktorem vývoje takového lesa (Linner a Wanninger, 2010).

### **4.2 Materiál a jeho odběr**

V rámci projektu zaměřeného na výzkumu mrtvého dřeva a jeho biodiverzity byly pracovníky Národního parku Bavorský les rozmístěny kmeny a větve jedle stříbrné a buku evropského na vybraná stanoviště. Jednotlivá stanoviště byla volena tak, aby odpovídala gradientu variability environmentálních faktorů

Samotný odběr uskutečnili pracovníci správy Národního parku v roce 2013 jako druhý v pořadí v rámci výše zmíněného projektu. V době odběru, byly kmeny a větve ponechány na svých stanovištích po dobu dvou let. Získání vzorků bylo provedeno za

pomocí elektrického vrtáku, který byl mezi jednotlivými odběry otírán etanolem. Z každé větve byl odebrán jeden vzorek, z kmenů pak čtyři vzorky v průběhu jeho délky. Následně byly vzorky uloženy do plastových uzavíratelných sáčků s označením místa ze kterého byl vzorek odebrán a zdali se jedná o jedli (T) nebo buk (B). Dále byly označeny podle toho, jestli byly odebrány z větví (FWD) nebo z kmenů (CWD). Po zamrazení byly vzorky odeslány do Laboratoře environmentální mikrobiologie Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i. k analýze.

### **4.3 Použité metody**

V rámci této práce byly použity následující komplementární metody:

- Homogenizace vzorku
- Stanovení chemického složení vzorku
- Spektrofotometrické a fluorometrické stanovení aktivity enzymů ve vzorku
- Kvantifikace biomasy hub pomocí extrakce a HPLC analýzy specifického markeru ergosterolu
- Izolace, purifikace a sekvence DNA metodami next-generation sequencing

### **4.4 Stanovení vlhkosti a suché hmotnosti vzorků**

Aby mohly být výsledky později správně interpretovány, bylo nezbytné vědět poměr sušiny v jednotlivých vzorcích. Sušina byla stanovena vážením vzorku před a po lyofilizaci, s přesností na tři desetinná místa. Vážení probíhalo za dodržení nízkých teplot. Nejdříve byla zvážena falkonka do které byl vzorek vložen, následně pak falkonka se vzorkem a po lyofilizaci proběhlo vážení znovu, tentokrát jen dohromady se vzorkem. Po odečtení hmotnosti vzorku po lyofilizaci od hmotnosti nevy-sušeného vzorku se získala hmotnost vody, kterou materiál ztratil sušením. Samotná hmotnost vzorku (sušina) byla získána odečtením hmotnosti falkonky.

## 4.5 Homogenizace vzorků

Vzorky byly dodány ve formě pilin z návrtů kmenů a větví. Pro další analýzu byly jednotlivé částičky příliš veliké. Aby byl vzorek stejnorodý a vhodný pro další analýzy, byl materiál upraven centrifugálním mlýnem. Homogenizace probíhala jednotlivě. Po každé úpravě vzorku byl mlýn rozebrán vyčištěn a ořen etanolem. U vzorků kmenů byly všechny čtyři vzorky vždy z jednoho kmene smíchány dohromady ve stejném poměru a tyto smíšené vzorky byly dále použity v jednotlivých měřeních. Mezi mletím byl materiál skladován v mrazícím boxu při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 4.6 Stanovení chemického složení vzorků

Pro účel pozorování vztahů mezi složením houbového společenstva a kvalitativními vlastnostmi dřeva, bylo nutné vzorky podrobit fyzikálně chemické analýze.

Pro stanovení pH byl vzorek smísen s destilovanou vodou (1:10 w/vol) a po 24 hodinách při laboratorní teplotě byl vzorek měřen pHmetrem.

Z technických důvodů byl obsah uhlíku a dusíku ve vzorku měřen v externí laboratoři ve Výzkumném ústavu meliorací a ochrany půdy, v.v.i.

## 4.7 Spektrofotometrické a fluorometrické stanovení aktivity enzymů

### 4.7.1 Stanovení aktivity extracelulárních enzymů

Aktivita enzymů  $\beta$ -glukosidázy, fosfatázy,  $\beta$ -xylosidázy, N-acetylglukosaminidázy, celobiohydrolázy,  $\beta$ -galaktosidázy,  $\alpha$ -glukosidázy a lipázy byla stanovena spektrofluorometricky s využitím fluorescenčně značených substrátů. Jako fluorescenční molekula byl použit 4-methylumbellyferol (MUF). Jednotlivé substráty MUF, které byly použity pro stanovení aktivit konkrétních enzymů, jsou znázorněny v tabulce 1 níže.

enzym	substrát
$\beta$ -glukosidáza	2,75 mM 4-methylumbellyferyl- $\beta$ -D- glukopyranosid (MUG)
fosfatáza	2,75 mM 4-methylumbellyferyl-fosfát (MUFP)

<b>β-xylosidáza</b>	2,50 mM 4-methylumbellyferyl-β-D-xylopyranosid (MUFX)
<b>N-acetylglukosaminidáza</b>	1,00 mM 4-methylumbellyferyl-N-acetylglukosaminid (MUFN)
<b>celobiohydroláza</b>	2,50 mM 4-methylumbellyferyl-N-cellobiopyranosid (MUFC)
<b>β-galaktosidáza</b>	2,50 mM 4-methylumbellyferyl-β-D-galaktopyranosid (MUFL)
<b>α-glukosidáza</b>	2,50 mM 4-methylumbellyferyl-α-D-glykosopyranosid (MUFaG)
<b>lipáza</b>	2,50 mM 4-methylumbellyferyl-kaprylát (MUFY)

Tabulka 1 Přehled enzymů a příslušných substrátů použitých ke stanovení jejich aktivit.

Pro stanovení potenciálních aktivity enzymů byly použity suspenze tvořené 0,25 g lyofilizovaného vzorku v 50 ml 50 mM octanového pufru s pH 5. Takto připravené vzorky byly po nezbytnou dobu uchovávány při teplotě do 4 °C. Do mikrotitrační destičky byly napipetovány jednotlivé MUF substráty a kalibrační roztoky MUF standardu v předem daném ředění (viz tabulka 2). K substrátům bylo do jamek napipetovaláno 200 μl homogenizované suspenze vzorku. Do pravé části destičky byly umístěny kalibrační řady, ve kterých postupně vzrůstala koncentrace MUF.

vzorek 1			vzorek 2			vzorek 3			kalibrace		
MUF G	MUF G	MUF G	MUF G	MUF G	MUF G	MUF G	MUF G	MUF G	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3
MUF P	MUF P	MUF P	MUF P	MUF P	MUF P	MUF P	MUF P	MUF P	1+10μl MUF1/ 00	2+10μl MUF1/ 100	3+10μl MUF1/ 100
MUF X	MUF X	MUF X	MUF X	MUF X	MUF X	MUF X	MUF X	MUF X	1+20μl MUF1/ 00	2+20μl MUF1/ 100	3+20μl MUF1/ 100
MUF N	MUF N	MUF N	MUF N	MUF N	MUF N	MUF N	MUF N	MUF N	1+50μl MUF1/ 00	2+50μl MUF1/ 100	3+50μl MUF1/ 100
MUF C	MUF C	MUF C	MUF C	MUF C	MUF C	MUF C	MUF C	MUF C	1+20μl MUF1/ 0	2+20μl MUF1/ 10	3+20μl MUF1/ 10
MUF L	MUF L	MUF L	MUF L	MUF L	MUF L	MUF L	MUF L	MUF L	1+50μl MUF1/ 0	2+50μl MUF1/ 10	3+50μl MUF1/ 10
MUF aG	MUF aG	MUF aG	MUF aG	MUF aG	MUF aG	MUF aG	MUF aG	MUF aG	1+10μl MUF	2+10μl pMUF	3+10μl MUF
MUF Y	MUF Y	MUF Y	MUF Y	MUF Y	MUF Y	MUF Y	MUF Y	MUF Y	1+20μl MUF	2+20μl MUF	3+20μl MUF

Tabulka 2 Tabulka graficky popisuje jednotlivé umístění substrátů na mikrotitrační destičce

Takto připravené destičky byly vloženy k temperování do inkubátoru vyhřátého na 40 °C. Aby nedocházelo ke zkreslení výsledků vlivem odpařování roztoku, byly mikrotitrační destičky zakryty.

Fluorescence vzorku na destičce byla měřena po 5, 65 a 125 minutách za pomoci spektrofluorimetru TESCAN Infinite m200 a softwaru Magellan při excitační vlnové délce 355 nm a emisní vlnové délce 460 nm. Mezi jednotlivým měřením byly destičky se vzorky vkládány zpět do inkubátoru. Fluorescence, respektive aktivita vzorku byla stanovena pomocí kalibračních křivek standardů MUF na základě jejich koncentrace a naměřené fluorescence a aktivita vyjádřena v  $\mu\text{M min}^{-1} \text{g}^{-1}$  sušiny

#### **4.7.2 Stanovení aktivity endocelulázy a endoxylanázy**

Pro stanovení endocelulázy a endoxylanázy bylo nutné před samotným měřením provést extrakci a filtraci vzorků. Filtrace byla provedena přes kolonky Sephadex TM G-25 M.

Dále bylo v mikrozkuhavce smícháno 150  $\mu\text{l}$  extrahovaného vzorku a 150  $\mu\text{l}$  substrátu (azo-CM cellulase pro endoglukanázu a azo-xylan pro endoxylanázu).

Následovaly 2 hodiny inkubace při 40 °C. Inkubace byla ukončena přidáním 750  $\mu\text{l}$  precipitantu. Následovalo vortexování vzorku po dobu 10 sekund a poté centrifugace 10 minut při 10 000 otáčkách. Absorbance uvolněného barviva bylo měřeno spektrofotometricky při 595 nm.

#### **4.7.3 Stanovení aktivity manganové peroxidázy**

Aktivita manganové peroxidázy byla měřena v sukcinát-laktátovém pufru (100 mM, pH 4,5). Do mikrotitračních destiček bylo napipetováno 50  $\mu\text{l}$  filtrovaného vzorku a 200  $\mu\text{l}$  odpovídajícího roztoku substrátů (složení v tabulce 4). Stanovení aktivity enzymů bylo prováděno v programu Magellan MnP (DMAB) v 7 cyklech 30 sekundách po sobě a hned následovně v 7 cyklech po 2 minutách.

Enzymatickou reakcí vzorek získá fialovou barvu, která je spektrofotometricky detekována.

#### **4.7.4 Stanovení aktivity lakázy**

Na mikrotitrační destičku bylo postupně napipetováno 50  $\mu$ l filtrovaného vzorku, 150  $\mu$ l citrátového pufru a 50  $\mu$ l substrátu ABTS. Absorbance vzorků byla měřena v programu Magellan Lac (ABTS) při 420 nm. A to v 7 cyklech po 30 sekundách a v 7 cyklech po 2 minutách. Enzymatická reakce se projevovала zelenou barvou.

### **4.8 Kvantifikace biomasy hub pomocí extrakce a HPLC analýzy ergosterolu**

Ergosterol se nachází pouze v plasmatické membráně hub a tak kvantifikací tohoto specifického markeru můžeme stanovit množství houbové biomasy ve vzorku.

Pro extrakci a analýzu bylo použito 0,5 g lyofilizovaného vzorku, který byl suspenzován v 3 ml 10% KHO v metanolu a v 1ml cyklohexanu a poté sonikován při teplotě 70°C po dobu 90 minut. Následně byl přidán 1ml destilované vody a 2 ml cyklohexanu. Vzorky byly dále vortexovány 30 s a centrifugovány 5 minut při 3 500 otáček. Odstředěný vzorek nad sedlinou byl odpipetován a postup se 2x opakoval jen s cyklohexanem (již bez použití destilované vody). Následovalo odpaření cyklohexanu dusíkem do sucha. Vzorek byl rozpuštěn v 1 ml metanolu a vortexován 30 s následnou 15 min inkubací v lázni při 40 °C 15 minut. Po uplynutí času byl vzorek opět vortexován 30 s a centrifugován 3 minuty při 6000 otáčkách. 800  $\mu$ l takto připraveného vzorku bylo podrobena analýze na kapalinovém chromatografu Waters Alliance HPLC system. Rychlost průtoku metanolu jako mobilní fáze byla 1 ml.min<sup>-1</sup>. Ergosterol byl analyzován spektrofotometricky při 282 nm a kvantifikován pomocí standardu o známé koncentraci.

### **4.9 Izolace, purifikace a sekvenace DNA metodami next-generation sekvenování**

#### **4.9.1 Izolace a purifikace DNA**

Genomová DNA byla izolována komerčně dostupným kitem NucleoSpin Soil (Macherey-Nagel) podle protokolu dodavatele z 150 – 200 mg lyofilizovaného vzorku. Během izolace byly vzorky homogenizovány 2 x 30s na FastPrepu24. Za pomoci 50  $\mu$ l

elučního pufru došlo k uvolnění DNA z kolonky na konci izolace. Koncentrace izolované DNA byla změřena spektrofotometricky na přístroji NanoDrop 1000.

#### **4.9.2 Sekvence DNA metodami next-generation sekvenování**

K identifikaci organismů hub sloužila sekvence mezerníku ITS2 rDNA. K selektivní amplifikaci ITS2 oblastí byly použity primery gITS7 a ITS4. Úspěšnost proběhlé amplifikace byla ověřena za pomoci gelové elektroforézy v 1,5% agarózovém gelu. Z každého vzorku byly nezávisle připraveny dvě PCR reakce. Ty pak byly následně sloučeny dohromady, pročištěny a zkoncentrovány pomocí kolonky MinElute Purification Kit. DNA byla eluována 20 µl ddH<sub>2</sub>O. Koncentrace takto připravené DNA byla změřena za pomoci spektrofotometru NanoDrop 1000.

K sekvenování byla využita technologie sekvenování syntézou na sekvenátoru MiSeq firmy Illumina. Na počátku jsou na oba konce amplikonů nalogovány dva rozdílné adaptory. Po následné denaturaci jsou fragmenty DNA imobilizovány jedním koncem na destičku pokrytou oligonukleotidy komplementárními k oběma těmto typům adaptorů.

Jednovláknové fragmenty hybridizují svým volným koncem s komplementárním oligonukleotidem připojeným na destičku čímž dochází k vytvoření můstku. Oligonukleotidy navázané na povrchu destičky se chovají v další fázi jako primery pro PCR amplifikaci, která je také nazývána můstkovou amplifikací. Amplifikace je nezbytně důležitá pro získání dostatečně silného světelného signálu pro spolehlivou detekci inkorporovaných nukleotidů.

Po dokončení PCR vzniknou na destičce shluky obsahující až 1 000 kopií původní ssDNA. Ke konci můstkové amplifikace dochází k navázání sekvenačního primeru na DNA fragmenty.

Při samotném sekvenování syntézou je využito fluorescenčně značených nukleotidů s navázaným reverzibilním terminátorem. Blokace nukleotidů reverzibilním terminátorem umožňuje v každém cyklu navázání pokaždé pouze jedné báze na rostoucí řetězec. Po inkorporaci nukleotidu je fluorescenční barvivo i reverzibilní blokátor na jeho 3' konci odstraněn a syntéza může nadále pokračovat. Po každém cyklu syntézy je inkorporace fluorescenčně značeného nukleotidu detekována laserem. Díky přirozené

kompetici nukleotidů je zajištěna vysoká přesnost. Analýza dat byla následně provedena bioinformatikem.

#### 4.10 Ředění použitých roztoků

Substrát	g/10ml DMSO
MUF	0,00176
MUFC	0,01251
MUFG	0,00930
MUFaG	0,00846
MUFL	0,00846
MUFN	0,00379
MUFP	0,00704
MUFX	0,00846
MUFY	0,00846

Tabulka 3 znázorňuje jednotlivé ředění substrátů pro stanovení enzymové aktivity extracelulárních enzymů

##### **Octanový pufr, 50 mM, pH=5**

2,78 g octanu sodného

938 µl kyseliny octové

1 l destilované vody

##### **Sukcinát-lakátátový pufr**

100 ml destilované vody

1,64 g DL-kyseliny mléčné, NaCl 60%

0,146 g kyseliny jantarové

##### **Azo-Xylan**

25 ml koncentráту Azo-Xylanu bylo smícháno s 22,5 ml deionizované vody a 2,5 ml 2M octanového pufru s pH 5,0. Takto připravený roztok musel být uchováván v teplotě 4 °C.



### **Azo-CM- celulóza**

Do 1,00 g Azo-CM-Cellulase bylo přidáno 40 ml vody o teplotě 85-90 °C, po úplném rozpuštění substrátu bylo přidáno 5ml 2M octanového pufru s pH 5,0. Roztok byl doplněn deionizovanou vodou do 50ml. Jako prevence mikrobiální degradace bylo přidáno 0,02 g azidu sodného. Roztok musel být uchováván při teplotě okolo 4 °C.

### **Precipitant**

Ve 150 ml deionizované vody bylo rozpuštěno 40 g octanu sodného a přidáno 4 g octanu zinečnatého. Za pomoci kyseliny chlorovodíkové bylo pH upraveno na 5,0. Objem roztoku byl doplněn na 200 ml deionizovanou vodou a následně bylo přidáno 800 ml 95% ethanolu.

### **Citrát-fosfátový pufr (0,1M – citrát, 0,2M – fosfát), pH=5,0**

2,24 g kyseliny citronové

7,37g dodekahydrátu hydrognofosforečnananu disodného

### **10% roztok hydroxidu draselného v methanolu, 3M**

10 g hydroxidu draselného

100 ml methanolu

	<b>roztok AB</b>	<b>roztok AP</b>	<b>roztok AR</b>
<b>Sukcinát-laktátový pufr</b>	21 ml	21 ml	21 ml
<b>DMAB (25 mM)</b>	2,8 ml	2,8 ml	2,8 ml
<b>MBTH (1 mM)</b>	1,4 ml	1,4 ml	1,4 ml
<b>MnSO<sub>4</sub> (2 mM)</b>	-	-	1,4 ml
<b>EDTA (2 mM)</b>	1,4 ml	1,4 ml	-
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1,4 ml	-	-
<b>Roztok 25 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 44 ml H<sub>2</sub>O</b>	-	1,4 ml	1,4 ml

*Tabulka 4 znázorňuje ředění substrakčních roztoků substrátů pro stanovení aktivit oxidázy (AB) peroxidázy (AP) a manganové peroxidázy (AR)*

## 5 Výsledky

### 5.1 Výsledky stanovení chemického složení vzorků

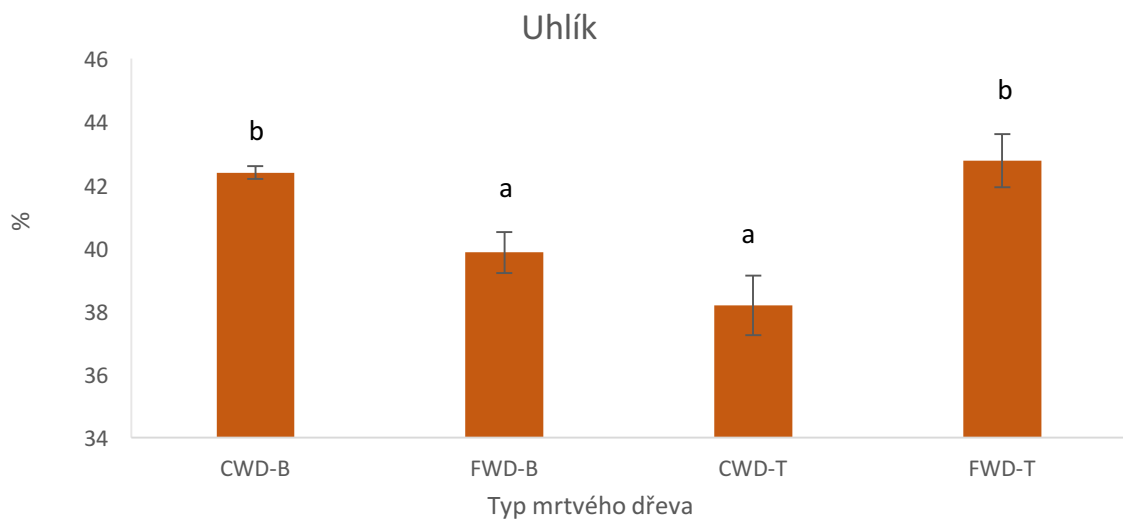
Následující grafy popisují stanovení chemických vlastností všech vzorků bukových kmenů (CWD-B), bukových větví (FWD-B), jedlových kmenů (CWD-T) a jedlových větví (FWD-T). Data znázorňují průměrné naměřené hodnoty pro jednotlivé zkoumané skupiny a střední chyby průměru. Průměrné naměřené hodnoty uhlíku, dusíku a pH u jednotlivých zkoumaných skupin jsou znázorněny v Příloze 1.

Písmena nad jednotlivými sloupci označují statistickou odlišnost jednotlivých skupin ověřenou ANOVA a Fisherovým LSD post-hoc testem při hladině  $\alpha = 0,05$ .

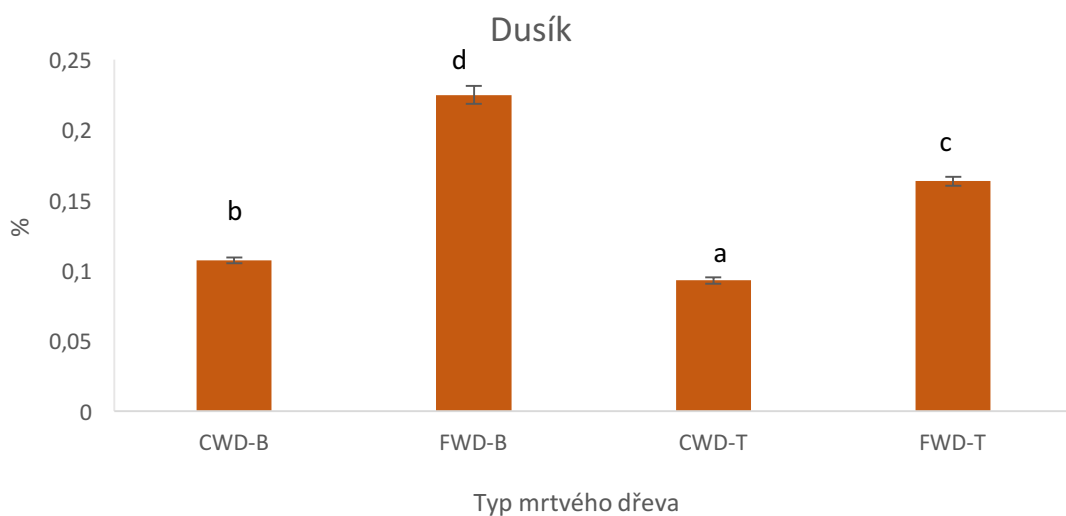
#### 5.1.1 Výsledky stanovení uhlíku a dusíku ve vzorcích

U jednotlivých skupin vzorků byla zaznamenána vyšší koncentrace uhlíku u bukových kmenů a jedlových větví a současně byla koncentrace uhlíku u buku vyšší v kmenech oproti větvím, ale u jedlí byla koncentrace uhlíku naopak vyšší ve vzorcích z větví než kmenů (Graf 1). Statisticky významný rozdíl mezi druhy stromů nebo velikostí materiálu nebyl potvrzen.

Nejvyšší koncentrace dusíku byla zachycena u vzorků z bukových větví a poté u jedlových větví (Graf 2). Jednotlivé skupiny vzorků se od sebe obsahem dusíku navzájem statisticky významně odlišovaly.



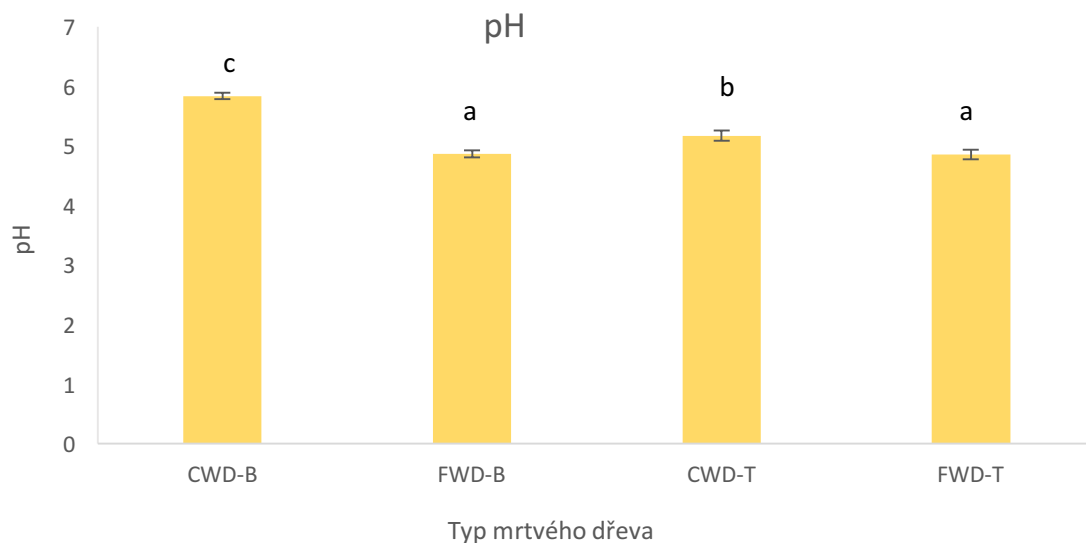
Graf 1 Koncentrace uhlíku ve vzorcích.



Graf 2 Koncentrace dusíku ve vzorcích.

### 5.1.2 Výsledky stanovení pH ve vzorcích

Vyšší pH bylo stanoveno u vzorků kmenů nežli u vzorků větví u obou druhů stromů (Graf 3). Nejzásaditější pH bylo naměřeno u vzorků kmenů buků, nejnižší pak téměř shodně u vzorků větví, mezi kterými nebyl rozdíl statisticky významný.



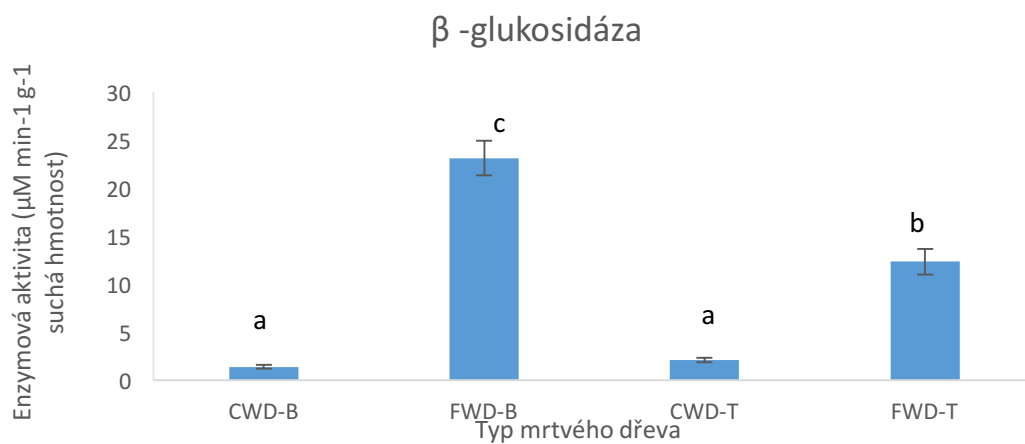
Graf 3 Znázornění pH vzorků.

## 5.2 Výsledky spektrofotometrického a fluorometrického stanovení aktivity enzymů ve vzorcích

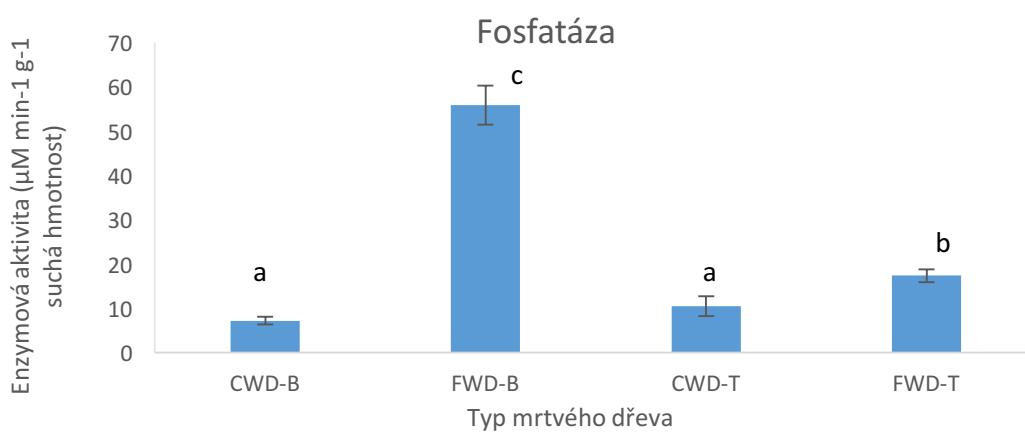
Potenciální aktivity jednotlivých enzymů hub ve zkoumaných skupinách bukových kmenů (CWD-B), bukových větví (FWD-B), jedlových kmenů (CWD-T) a jedlových větví (FWD-T) zachycují grafy číslo 4 až 15. Statistickou významnost znázorňují písmena nad jednotlivými sloupci. Pro určení statistické významnosti byl použit Fisherovův LSD post-hoc test a ANOVA.

Většina stanovených hodnot jednotlivých enzymů byla statisticky výrazně ovlivněna průměrem dřeva a druhem stromu, ze kterého byl vzorek odebrán.

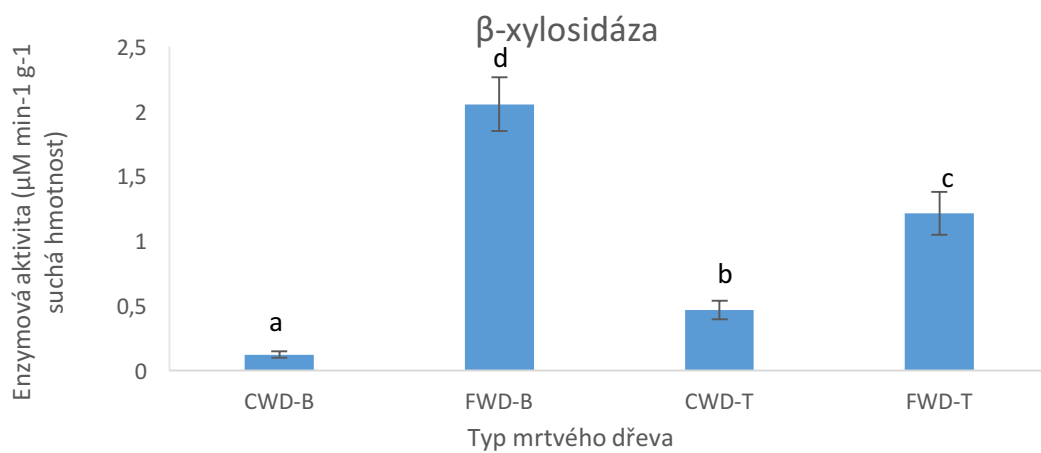
Nejvyšší aktivity byly detekovány u lipázy, fosfatázy, endoxylázy a  $\beta$ -glukosidázy a to zejména u bukových větví. Průměrné naměřené hodnoty aktivity enzymů u jednotlivých zkoumaných skupin jsou znázorněny v Příloze 2, 3 a 4.



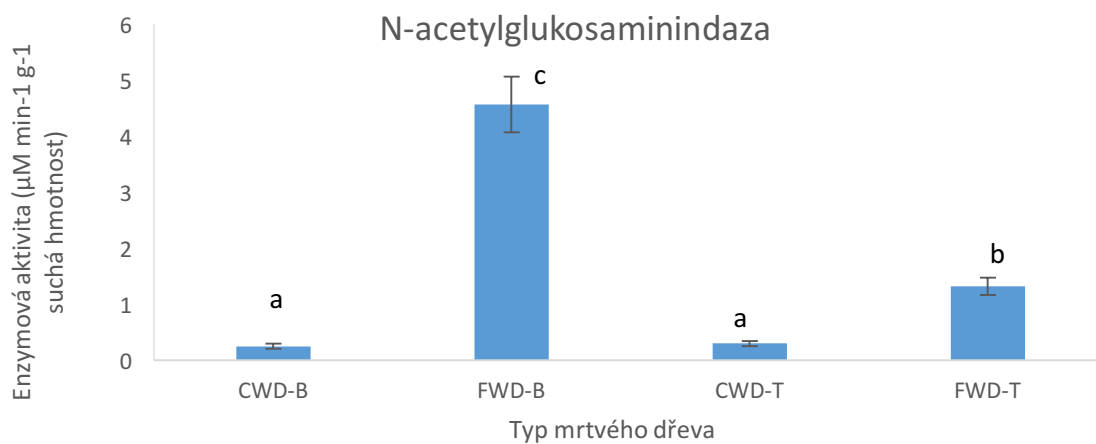
Graf 4 Potenciální aktivita β-glukosidázy ve vzorcích.



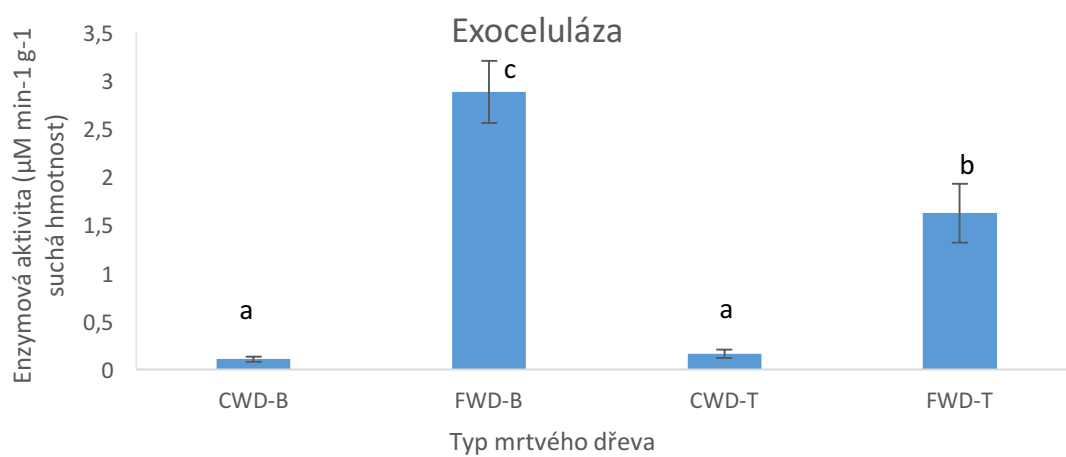
Graf 5 Potenciální aktivita fosfatázy ve vzorcích.



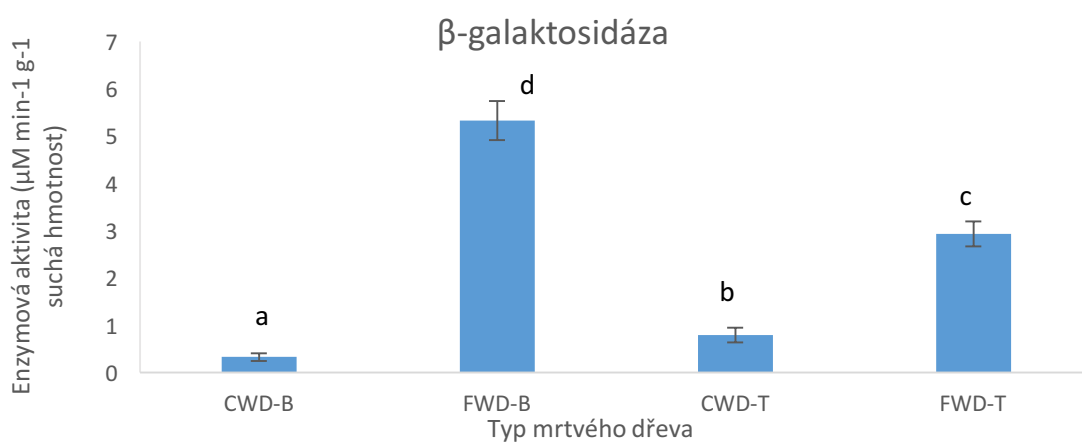
Graf 6 Potenciální aktivita β-xylosidázy ve vzorcích.



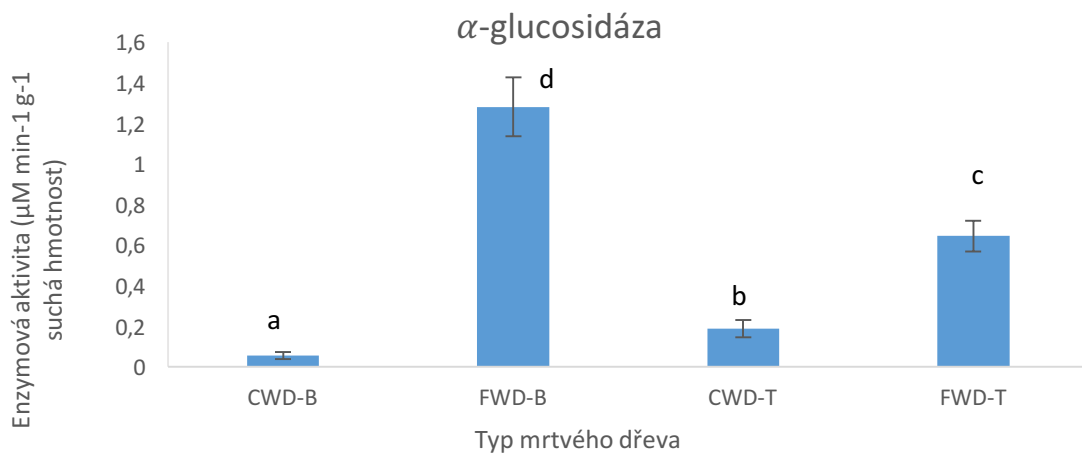
Graf 7 Potenciální aktivita N-acetylglukosaminidazy ve vzorcích.



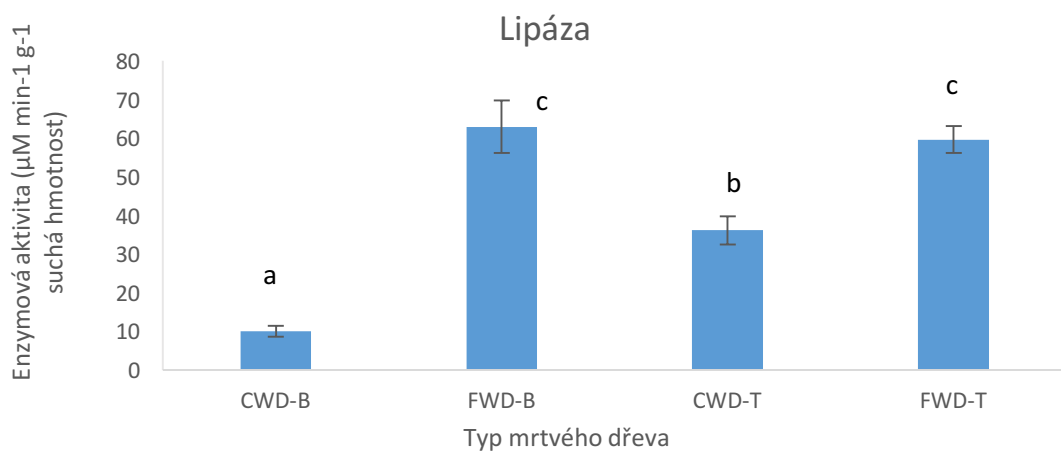
Graf 8 Potenciální aktivita exocelulázy ve vzorcích



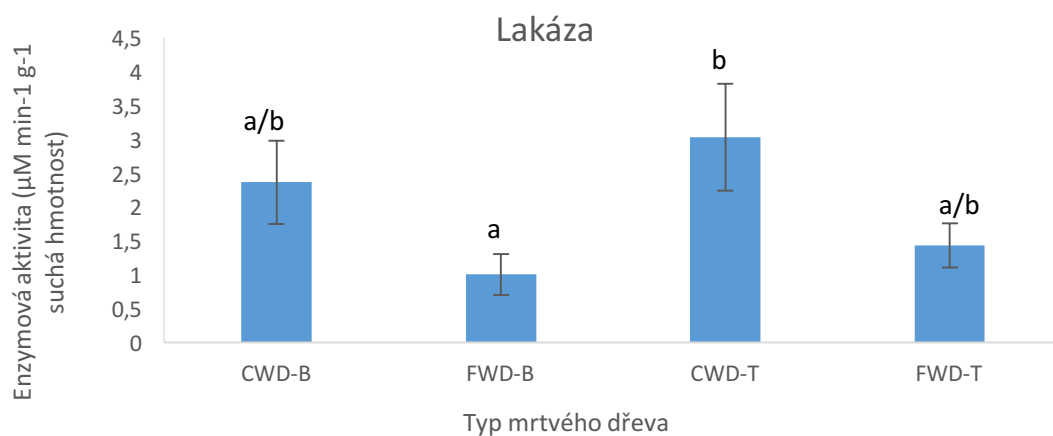
Graf 9 Potenciální aktivita  $\beta$ -galaktosidázy ve vzorcích



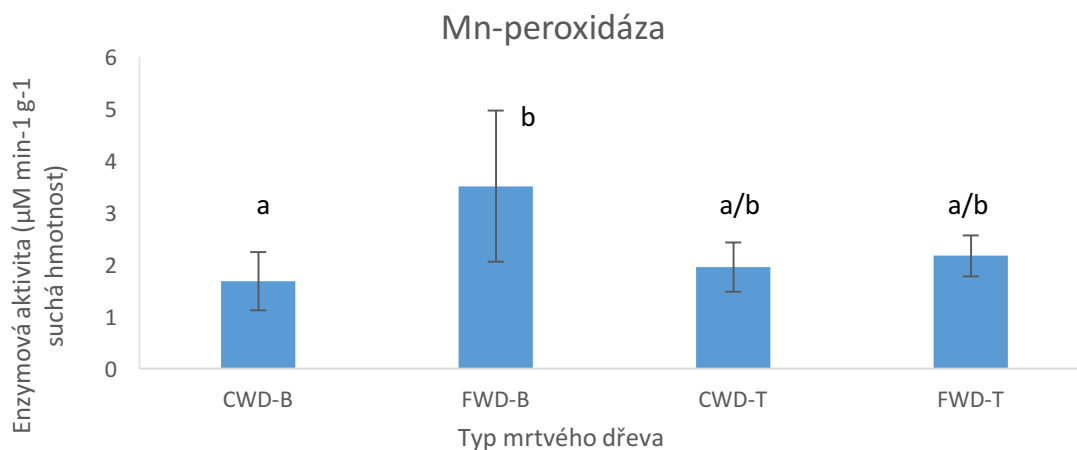
Graf 10 Potenciální aktivita  $\alpha$ -glucosidázy ve vzorcích



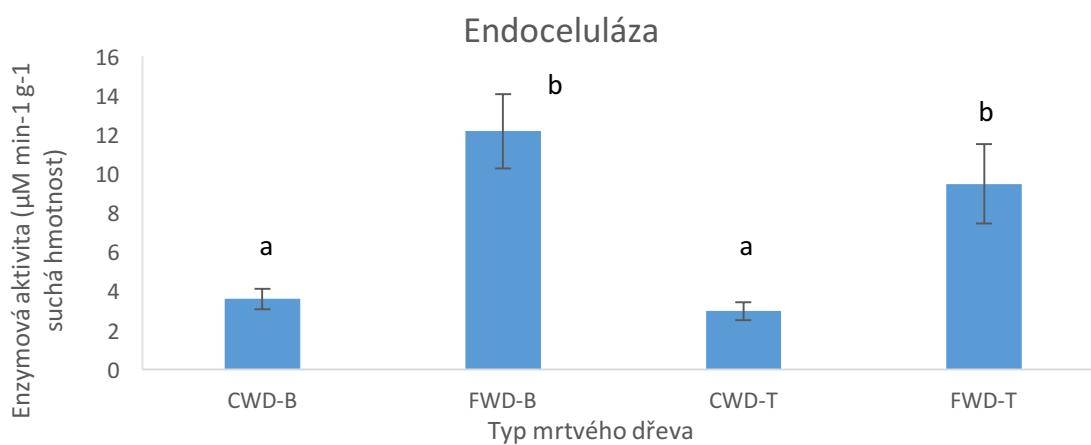
Graf 11 Potenciální aktivita lipázy ve vzorcích



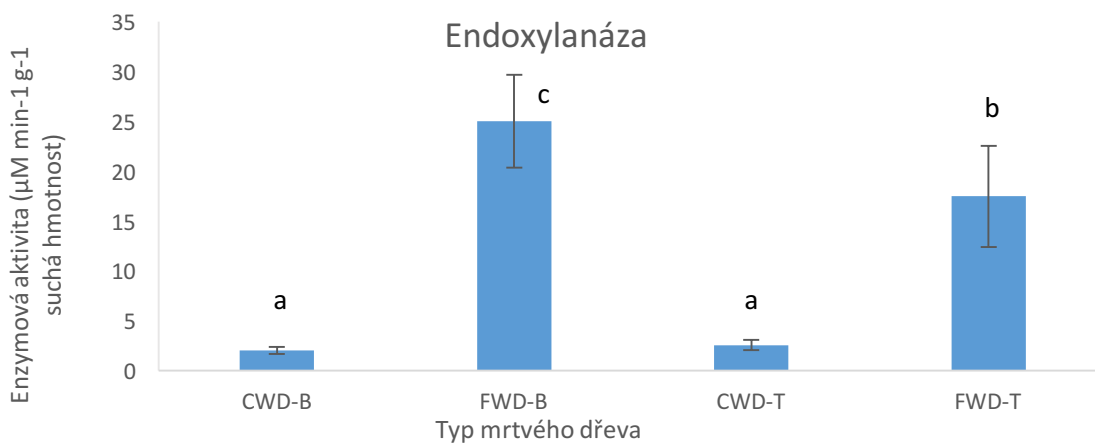
Graf 12 Potenciální aktivita lakázy ve vzorcích



Graf 13 Potenciální aktivita manganové peroxidázy ve vzorcích



Graf 14 Potenciální aktivita endocelulázy ve vzorcích

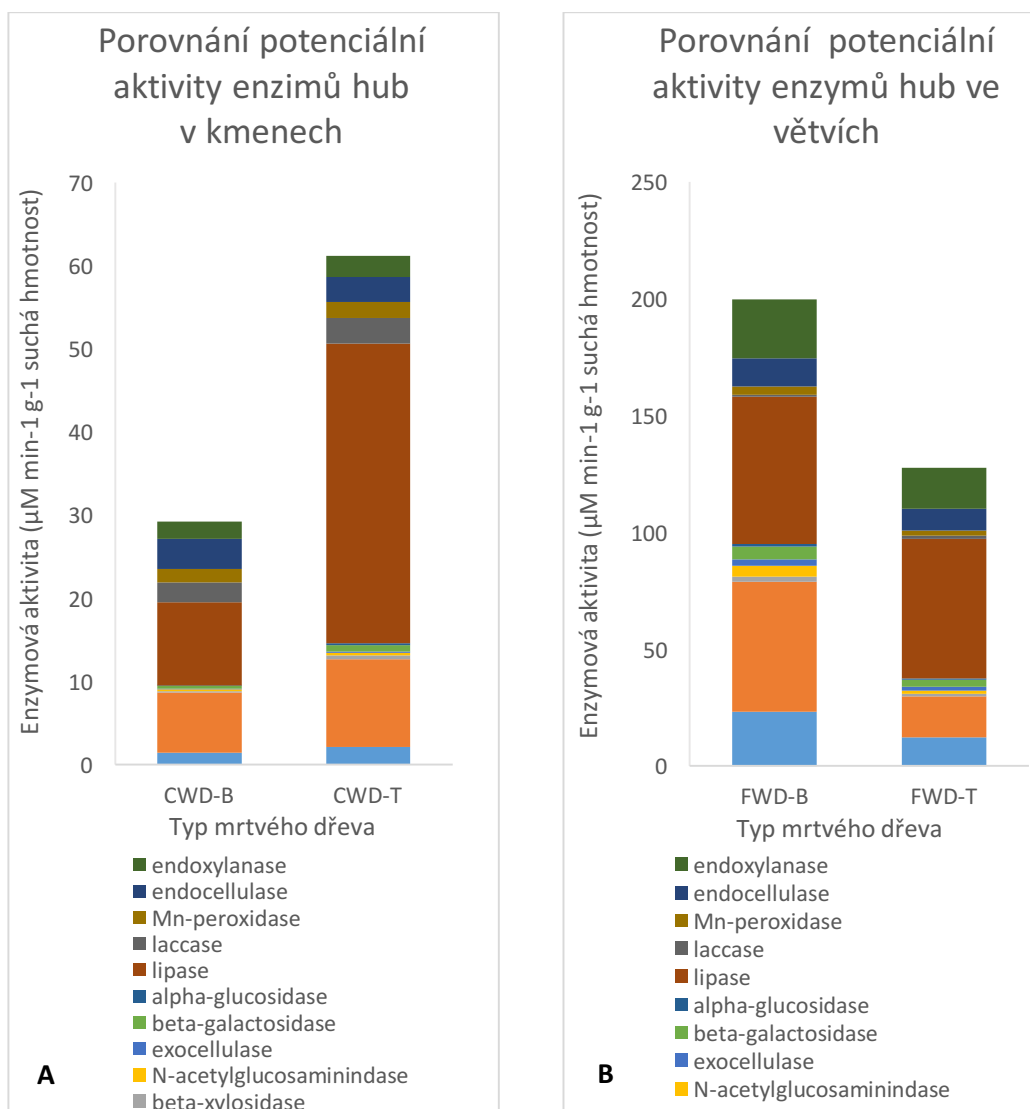


Graf 15 Potenciální aktivita edoxylanázy ve vzorcích



Následující kumulativní grafy číslo 16 A a 16 B znázorňují celkové potenciální aktivity všech enzymů podle velikostí průměrů materiálu, ze kterého byly vzorky odebrány.

U vzorků pořízených z bukových kmenů (CWD-B) byly stanoveny nižší aktivity enzymů, než u vzorků jedlových kmenů (CWD-T). Naopak u materiálu s menším průměrem byla zachycena vyšší aktivita enzymů hub ve bukových větvích (FWD-B) než u jedlových větví (FWD-T). Celkově byly detekovány nejvyšší aktivity u vzorků větví buků.

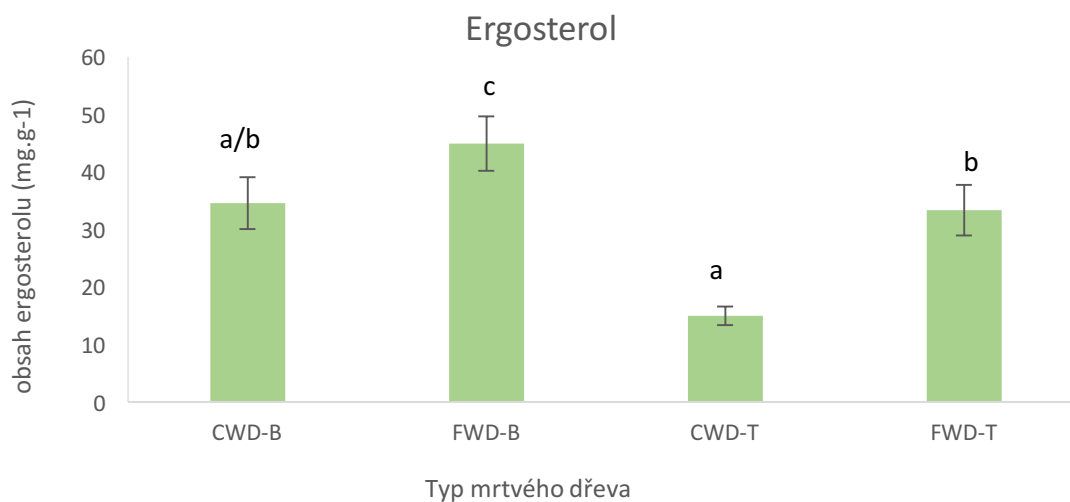


Graf 16 Aktivita enzymů ve vzorcích kmenů (A) a větví (B).

### 5.3 Výsledky analýzy ergosterolu

Následující graf znázorňuje obsah specifického markeru ergosterolu u jednotlivých skupin vzorků. Písmena nad sloupci znázorňují statistickou odlišnost ověřenou Fisherovým LSD post-hoc testem.

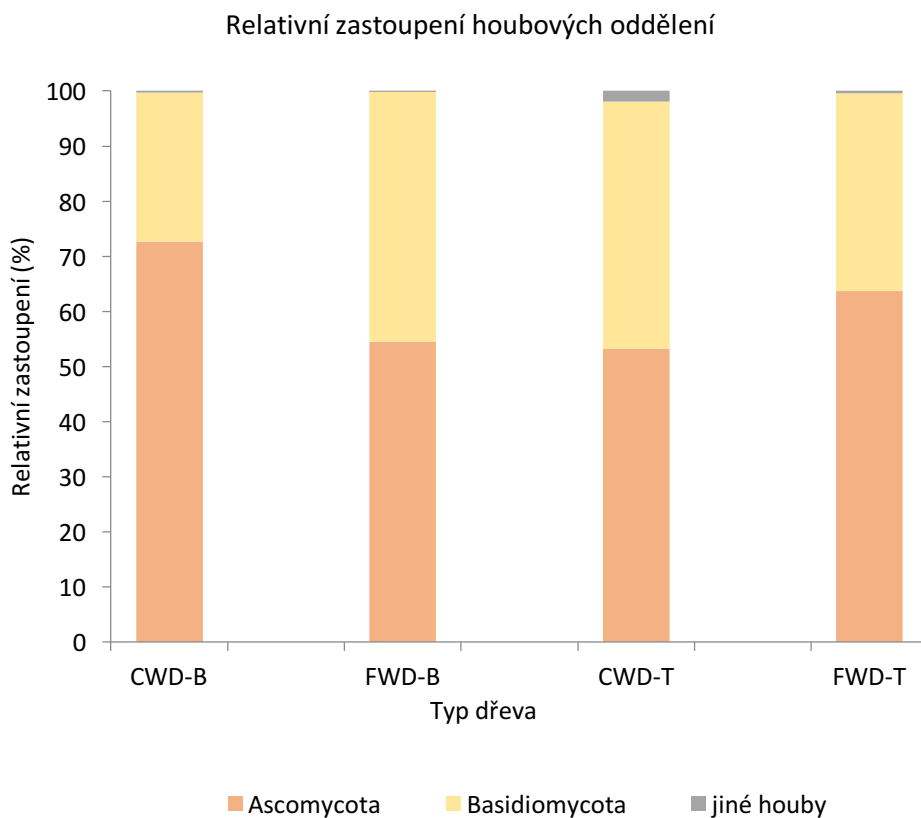
Největší obsah ergosterolu byl detekován u bukových větví (FWD–B). Naopak nejnižší hodnoty vykazují jedlových kmenů (FWD-T). Z výsledků analýzy vyplývá, že vyšší množství houbové biomasy se nacházelo ve vzorcích odebraných z větví. Průměrné naměřené hodnoty ergosterolu u jednotlivých zkoumaných skupin jsou znázorněny v Příloze 4.



Graf 17 Obsah ergosterolu ve vzorcích

## 5.4 Popis společenstva hub

Na úrovni houbových kmenů nebyla zjištěna významná preference *Ascomycet* či *Basidiomycet* pro druh stromů či pro větve nebo kmeny.



Graf 18 Relativní zastoupení houbových oddělení

## 6 Diskuze

V rámci bakalářské práce bylo analyzováno 127 vzorků tlejícího dřeva větví a kmenů z jedlí stříbrných a buku evropského. Zkoumanou lokalitou byl Národní park Bavorský les. Výsledky výzkumné části bakalářské práce jsou součástí rozsáhlého projektu zaměřeného na výzkum mrtvého dřeva a jeho biodiverzitu. Vzorky, které jsem analyzovala, byly odebrány v roce 2013 a byly již v pořadí druhou zkoumanou skupinou vzorků tohoto projektu.

Hlavním cílem bylo zjištění společenstva hub ve vzorcích a faktorů, které jej ovlivňují.

Pro svou bakalářskou práci jsem si stanovila tři hypotézy:

H1: Předpokládám rozdílné zastoupení společenstva hub ve vzorcích jedlí a buku.

H2: Domnívám se, že vyšší potenciální aktivity enzymů hub budou ve vzorcích z větví nežli z kmenů.

H3: Předpokládám vyšší potenciální aktivitu enzymů hub ve vzorcích z jedlových kmenů, než ve vzorcích z bukových kmenů.

Komplex vzorků odebraný pracovníky Národního parku Bavorský les byl zamrazen a odeslán k analýze do Laboratoří environmentální mikrobiologie Mikrobiologického ústavu v.v.i.

Prvním úkolem byla homogenizace jednotlivých vzorků, aby mohly být použity pro další analýzy. Protože dodaný materiál měl pro další použití příliš velké částice, byly jednotlivé vzorky semlety centrifugálním mlýnem na menší částičky. Mezi každým vzorkem byl mlýn čištěn a dezinfikován aby nedošlo ke kontaminaci jednotlivých vzorků. Vzorky odebrané z kmenů byly rozděleny vždy do čtyřech sáčků označených 1, 2, 3, 4 podle místa na kmeni, kde byly odebrány. Pro účel analýzy byly vzorky 1 a 2 a vzorky 3 a 4 smíchány v poměru 1:1 a řádně promíchány.

Následovalo stanovení chemického složení vzorků. Měření pH detekovalo signifikantní rozdíl, mezi vzorky odebranými z větví a vzorky pocházející z kmenů. U materiálu z větví bylo prokazatelně nižší pH než u materiálu z kmenů. Kyselejší pH

u větví koreluje s vyšší potenciální aktivitou enzymů hub v těchto vzorcích. Z technických důvodů byl obsah uhlíku a dusíku měřen ve spolupracující laboratoři.

U jednotlivých skupin vzorků byla zaznamenána vyšší koncentrace uhlíku a to u kmenů buků a větví jedlí. Statisticky významný rozdíl mezi druhy stromů nebo průměrem materiálu nebyl potvrzen. Nejvyšší koncentrace dusíku byla detekována u vzorků z bukových větví. Vyšší koncentrace dusíku byla stanovena i u větví jedlí. Rozdíl v zastoupení dusíku u kmenů a větví je statisticky významný.

Dalším krokem bylo spektrofotometrické a fluorometrické stanovení aktivity enzymů ve vzorcích. Potenciální aktivita byla zkoumána u 12 enzymů:  $\beta$ -glukosidázy, fosfatázy,  $\beta$ -xylosidázy, N-acetylglukosaminidázy, exocelulázy,  $\beta$ -galaktosidázy,  $\alpha$ -glukosidázy, lipázy, lakázy, manganové peroxidázy, endocelulázy a endoxylanázy. Nejvyšší potenciální aktivita byla zaznamenána u lipázy, fosfatázy, endoxylázy a  $\beta$ -glukosidázy a to zejména u bukových větví. Celkově byly zachyceny signifikantně vyšší potenciální aktivity enzymů hub u materiálu z větví, nežli u vzorků odebraných z kmenů, čímž byla potvrzena druhá vyslovená hypotéza. U vzorků odebraných z kmenů buků byla zachycena nižší potenciální aktivita nežli u vzorků z kmenů jedlí. Tento fakt potvrzuje třetí hypotézu.

Kvantifikace houbové biomasy pomocí ergosterolu potvrdila statisticky významné rozdíly v obsahu biomasy hub mezi vzorky z větví a vzorky z kmenů. Největší obsah ergosterolu byl detekován u větví buků. Naopak nejnižší hodnoty vykazují kmeny jedlí.

Poslední použitou metodou byla izolace, purifikace a sekvenace DNA metodami next-generation-sekvenování. Na úrovni houbových kmenů nebyla zjištěna preference Ascomycet či Basidomycet pro druh stromů či rozdílně velký materiál. Tím nebyla potvrzena první hypotéza, která předpokládala rozdílné zastoupení společenstva hub mezi vzorky z jedlí a buků.

Celkové shrnutí ukazuje, že hodnoty potenciálních aktivit enzymů společně s houbovou biomasou a nižším pH dokládají více produkovaných houbových enzymů ve větvích v porovnání s kmeny. Houby zde silně ovlivňují substrát díky svému aktivnímu metabolismu, například vylučováním kyseliny oxalové.

Jejich vyšší biomasa souvisí s rychlejší kolonizací větví houbami. Větve ve výsledku podléhají rychlejšímu rozkladu.

## 7 Závěr

Předkládaná bakalářská práce se zabývá enzymovými aktivitami a molekulární charakterizací hub v tlejícím dřevu. Pro studium bylo využito řady komplementární metod, jakými jsou stanovení chemického složení vzorku, spektrofotometrické a fluorometrické stanovení aktivity enzymů, kvantifikace biomasy hub pomocí extrakce a HPLC analýzy specifického markeru ergosterolu, izolace nebo purifikace a sekvenace DNA.

Cílem práce bylo popsat faktory, které ovlivňují složení a funkci společenstva hub v mrtvém dřevu. Vzorky byly rozděleny do jednotlivých čtyř souborů, podle druhu dřeviny (jedle a buk) a podle průměru materiálu (kmeny a větve).

Na začátku výzkumu jsem si stanovila tři základní hypotézy.

První hypotéza, která předpokládala rozdílné zastoupení společenstva hub ve vzorcích jedlí a buků nebyla potvrzena. Provedenou analýzou nebyly zjištěny signifikantní rozdíly v preferencích *Ascomycet* či *Basidiomycet* pro jedli či buk, ani pro to, jestli materiál pochází z kmenů či větví.

Druhá hypotéza, která předpokládala vyšší potenciální aktivity enzymů hub ve vzorcích z větví, nežli z kmenů byla potvrzena několika metodami. Ve vzorcích větví byla detekována vyšší potenciální aktivita enzymů, větší zastoupení houbové biomasy a kyselější pH, což dokazuje zvýšenou potenciální aktivitu hub v tomto materiálu. Za vysvětlení vyšší potenciální aktivity enzymů ve vzorcích větví pokládám větší rozdíl průměru povrchu vůči objemu. Kolonizace větví je na rozdíl od kmenů pro houby rychlejší a snadnější.

Za potvrzenou lze považovat i třetí hypotézu, která předpokládala vyšší potenciální aktivitu enzymů hub ve vzorcích jedlových kmenů. Celkově byly u vzorků bukových kmenů stanoveny nižší potenciální aktivity enzymů než u vzorků pocházející z jedlových kmenů. Rozdíl však nebyl tak výrazný jako ve srovnání vzorků větví a kmenů pro druhou hypotézu.

Závěrem může být konstatováno, že cíle bakalářské práce byly splněny, a že mnou provedené analýzy vzorků byly přínosné jako součást projektu Mrtvé dřevo a biodiverzita Národního parku Bavorský les.

## 8 Seznam informačních zdrojů

ALKORTA, I., C. GARBISU, M. J. LLAMA a J. L. SERRA. Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry* [online]. 1998, 33(1), 21-28 [cit. 2016-04-03]. DOI: 10.1016/S0032-9592(97)00046-0. ISSN 13595113. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032959297000460>

ARANTES, V., J. JELLISON, a B. GOODELL. Peculiarities of brown-rot fungi and biochemical Fenton reaction with regard to their potential as a model for bioprocessing biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online] 2012 94, 323–338 [cit. 2016-01-14]. ISSN 14320614. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22391968>

BALDRIAN, P. Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 2006, 30, 215–242 [cit. 2016-03-10]. ISSN 15746976. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16472305>

BALDRIAN, P., J. TRÖGL, J. FROUZ, J. ŠNAJDR, V. VALÁŠKOVÁ, V. MERHAUTOVÁ, T. CAJTHAML a J. HERINKOVÁ. Enzyme activities and microbial biomass in topsoil layer during spontaneous succession in spoil heaps after brown coal mining. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 2008, 40(9), 2107-2115 [cit. 2016-04-26]. DOI: 10.1016/j.soilbio.2008.02.019. ISSN 00380717. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071708000977>

BALDRIAN, P. a V. VALÁŠKOVÁ. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiological Review* [online]. 2008, 32(3), 501-21 [cit. 2016-03-10]. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2008.00106.x. ISSN 15746976. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18371173>

BERG, C. M. *Plant Litter: Decomposition, Humus Formation, Carbon Sequestration*. New York: Springer, 2003. ISBN 978-3-662-05349-2.



BODDY, L. Fungal community ecology and wood decomposition processes in angiosperms: from standing tree to complete decay of coarse woody debris. *Ecological Bulletins* [online] 2001 49(49). 43–56. [cit. 2015-12-01] Dostupné z: <http://www.jstor.org/stable/20113263>

BODDY, L., Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. *FEMS Microbiology Ecology* [online]. 2000, 31, 185–194. [cit. 2016-03-10] ISSN 15746976 Dostupné z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10719199>

BOER, W. de, L. B. FOLMAN, R. C. SUMMERBELL a L. BODDY. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 2005, 29 (4), 795-811 [cit. 2016-04-01]. DOI: 10.1016/j.femsre.2004.11.005. ISSN 15746976. Dostupné z: <http://femsre.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1016/j.femsre.2004.11.005>

BREZNAK, J. A. Ecology of Prokaryotic Microbes in the Guts of Wood- and Litter-Feeding Termites. Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, *Ecology* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2000, s. 209 [cit. 2016-03-27]. DOI: 10.1007/978-94-017-3223-9\_10. ISBN 978-90-481-5476-0. Dostupné z: [http://link.springer.com/10.1007/978-94-017-3223-9\\_10](http://link.springer.com/10.1007/978-94-017-3223-9_10)

CORNELISSEN, JH., U. SASS-KIAASEN, L. POOTER, L. et. al. Controls on coarse wood decay in temperate tree species: Birth of the LOGLIFE Experiment. *Ambio*. 2012, 41, 231-245. ISSN 00447447.

ČERNÝ, A. *Parazitické dřevokazné houby*. 1. vyd. Praha: SZN, 1989. Lesnictví, myslivost a vodní hospodářství. ISBN 80-209-0090-X.

DILLON, R.J. a V.M. DILLON. The gut bacteria of insects: nonpathogenic Interactions. *Annual Review of Entomology* [online]. 2004, 49(1), 71-92 [cit. 2016-03-15]. DOI: 10.1146/annurev.ento.49.061802.123416. ISSN 00664170. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.ento.49.061802.123416>

EDWARDS, I. P., R. A. UPCHURCH a D. R. ZAK. Isolation of fungal cellobiohydrolase I genes from sporocarps and forest soils by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008, 74, 3481-3489. ISSN 00992240.

EGGERT, C. Laccase-catalyzed formation of cinnabarinic acid is responsible for antibacterial activity of *Pycnoporus cinnabarinus*. *Microbiological Research* [online]. 1997, 152(3), 315-318 [cit. 2016-03-10]. DOI: 10.1016/S0944-5013(97)80046-8. ISSN 09445013. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944501397800468>

ERIKSSON K.L., R. A. BLANCHETTE a P. ANDER. *Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1990. ISBN 978-3-642-46687-8.

EVANS, CH. S. a J.N. HERDER. Degradation of planet cell wall polymers. **In:** GADD, G. M. *Fungi in bioremediation*. New York: Published for the British Mycological Society [by] Cambridge University Press, 2001. British Mycological Society symposium series, 23. ISBN 0521781191.

FRESCHET, G. T., R. AERTS a J. H. C. CORNELISSEN. A plant economics spectrum of litter decomposability. *Functional Ecology* [online]. 2012, 26(1), 56-65 [cit. 2016-04-13]. DOI: 10.1111/j.1365-2435.2011.01913.x. ISSN 02698463. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2435.2011.01913.x>

FUKSMI T., I. A. DICKEI, J. P. WILKIE, B. C. PAULUS, D. PARK, A. ROBERTS, P. K. BUCHANAN a R. B. ALLEN. Assembly history dictates ecosystem functioning: evidence from wood decomposer communities. *Ecology Letters* [online]. 2010, 13, 675-684 [cit. 2016-03-06]. ISSN 14610248. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20412280>

HEILMANN-CLAUSEN, J., E. AUDE, K. VAN DORT, et al. Communities of wood-inhabiting bryophytes and fungi on dead beech logs in Europe - reflecting substrate quality or shaped by climate and forest conditions? *Journal of Biogeography* [online].

2014, 41(12), 2269-2282 [cit. 2016-03-20]. DOI: 10.1111/jbi.12388. ISSN 03050270.  
Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jbi.12388>

HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP).  
*Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2002, 30(4), 454-466 [cit. 2016-04-02].  
DOI: 10.1016/S0141-0229(01)00528-2. ISSN 01410229. Dostupné z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022901005282>

JANKOVSKÝ, L. Některé aspekty dekompozice dřeva v lese houbami. **In:** VRŠKA, T.  
*Význam a funkce odumřelého dřeva v lesních porostech*. Sborník příspěvků ze semináře  
s exkurzí 8.-9. října 1999. 1. vyd. Vranov nad Dyjí Znojmo: Správa Národního parku  
Podyjí, 1999. 19 – 32. ISBN 80-238-4739-2.

JANKOVSKÝ, L. *Dřevní houby, tlející dřevo a les* [online]. 2005 [cit. 2016-02-15].  
Dostupné z <http://www.npsumava.cz/storage/5jstr12.pdf>

KERSTEN, P. a D. CULLEN. Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading  
Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Fungal Genetics and Biology*. 2007, 44,  
77- 87. ISSN 10871845.

KIRK, T. K. a D, CULLEN. Enzymology and Molecular Genetics of Wood  
Degradation by White-Rot Fungi. **In:** YOUNG, R. A. a M. AKHTAR. *Environmentally  
Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry*, John Wiley & Sons, Inc, 1998.  
273-307. ISBN 0471157708.

KULHÁNKOVÁ, A., T. BÉGUIRISTAIN, J. MOUKOUMI, J. BERTHELIN, a J.  
RANGER. Spatial and temporal diversity of wood decomposer communities in different  
forest stands, determined by ITS rDNA targeted TGGE. *Annals of Forest Science*  
[online]. 2006, 63, 547– 556 [cit. 2016-04-03]. DOI: ISSN: 10.1051/forest:2006037  
ISSN 1297966X. Dostupné z [http://www.afs-  
journal.org/articles/forest/abs/2006/05/f6059/f6059.html](http://www.afs-journal.org/articles/forest/abs/2006/05/f6059/f6059.html)

LEONOWICZ, A., A. MATUSZEWSKA, J. LUTEREK, D. ZIEGENHAGEN, M. WOJTAŚ-WASILEWSKA, N.S. CHO, M. HOFRICHTER a J. ROGALSKI. Biodegradation of Lignin by White Rot Fungi. *Fungal Genetics and Biology* 1999, 27(2-3), 175-185. ISSN 1469-8137.

LIERS, CH., T. ARNSTADT, R. ULLRICH a M. HOFRICHTER. Patterns of lignin degradation and oxidative enzyme secretion by different wood- and litter-colonizing basidiomycetes and ascomycetes grown on beech-wood. *FEMS Microbiology Ecology* [online]. 2011, 78(1), 91-102 [cit. 2016-04-07]. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2011.01144.x. ISSN 01686496. Dostupné z: <http://femsec.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1111/j.1574-6941.2011.01144.x>

LINDAHL, B., J. STENLID, O. STEFAN a F. ROGER. Translocation of 32 P between interacting mycelia of a wood-decomposing fungus and ectomycorrhizal fungi in microcosm systems. *New Phytologist* [online]. 1999, 144(1), 183-193 [cit. 2016-03-12]. DOI: 10.1046/j.1469-8137.1999.00502.x. ISSN 0028646x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1469-8137.1999.00502.x>

LINNER, J. a J. WANNINGER. *Plán péče Národního parku Bavorský les: Vize a cíle*. Německo: Grafenau: Nationalparkverwaltung Bayerischer Wald, 2010. ISBN 978-3-930977-35-2.

MAGAN, N. *Ecophysiology: Impact of environment on growth, synthesis of compatible solutes and enzyme production* [online]. 2008, 63 [cit. 2016-02-17]. DOI: 10.1016/S0275-0287(08)80006-9. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0275028708800069>

MALHERBE, S. a T. E. CLOETE. Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 2002, 1, 105-114. ISSN 15691705.

MARTÍNEZ, . T. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2002, 30(4), 425-444 [cit. 2016-04-17]. DOI: 10.1016/S0141-0229(01)00521-X. ISSN 01410229. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014102290100521X>

MARTÍNEZ, A.T., M. SPERANZA, F.J. RUIZ-DUENAS, P. FERREIRA, S. CAMARERO, F. GULILLÉN, M. J. MARTÍNEZ, A. GUTIÉRREZ, a J.C. del RÍO. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology* [online] 2005,8, 195-204 [cit. 2016-04-10] ISSN 16181905. Dostupné z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16200498>

*Národní park Bavorský les* [online]. 2015 [cit. 2016-04-03]. Dostupné z: <http://www.nationalpark-bayerischer-wald.de/cesky/narodnipark/index.htm>

OHM, R. A., R. RILEY, A. SALAMOV, B. MIN, I.G. CHOI a I. V. GRIGORIEV. Genomics of wood-degrading fungi. *Fungal Genetics and Biology* [online]. 2014, 72, 82-90 [cit. 2016-04-16]. DOI: 10.1016/j.fgb.2014.05.001. ISSN 10871845. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1087184514000796>

OVASKAINEN, O., D. SCHIGEL, H. ALI-KOVERO, P. AUVINEN, L. PAULIN, B. NORDEN, J. NORDEN. Combining high-throughput sequencing with fruit body surveys reveals contrasting life-history strategies in fungi. *The ISME Journal*. 2013, 7, 1696-1709. ISSN 17517362

OTJEN, L. a R. A. BLANCHETTE. A discussion of microstructural changes in wood during decomposition by white rot basidiomycetes. *Canadian Journal of Botany* [online]. 1986, 64(5), 905-911 [cit. 2016-04-02]. DOI: 10.1139/b86-121. ISSN 00084026. Dostupné z: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/b86-121>

PAZOUREK, J. a O. VOTRUBOVÁ. *Atlas of plant anatomy*. Praha: Peres, 1997. ISBN 80-901-691-20.

RAJALA, T., M. PELTONIEMI, T. PENNANEN a R. MAKIPAA. Fungal community dynamics in relation to substrate quality of decaying Norway spruce (*Picea abies*) logs in boreal forests. *FEMS Microbiology Ecology* [online]. 2012, 81(2), 494-505 [cit. 2016-03-26]. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2012.01376.x. ISSN 01686496. Dostupné z: <http://femsec.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1111/j.1574-6941.2012.01376.x>

RENVALL, P. Community structure and dynamics of wood-rotting basidiomycetes on decomposing conifer trunks in northern Finland. *Karstenia*. 1995, 35: 1- 51 ISSN 0453-3402.

RUIZ-DUEÑAS, F. J. a Á. T. MARTÍNEZ. Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microbial Biotechnology* [online]. 2009, 2(2), 164-177 [cit. 2016-01-25]. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2008.00078.x. ISSN 17517907. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-7915.2008.00078.x>

SHARMA, P., R. Goel, a N. Capalash. Bacterial laccases. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, 23, 823–832, ISSN 09593993

SCHWARZE, F. W. M., J. ENGELS a C. MATTHECK. *Fungal strategies of wood decay in trees*. 1. vyd. New York: Springer, 2000. ISBN 978-3-642-57302-6.

STENLID, J., R. PENTTILA a A. DAHLBERG. *Wood-decay basidiomycetes in boreal forests: Distribution and community development* [online]. s. 239 [cit. 2016-04-27]. DOI: 10.1016/S0275-0287(08)80015-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S027502870880015X>

STERN, K. R. *Introductory plant biology*. Dubuque: Wm. C. Brown Publishers, c1997. ISBN 0-697-25772-X.

STOKLAND, J. N., J. SIITONEN a B. G. JONSSON. *Biodiversity in dead wood*. Cambridge: Cambridge University Press, 2012. ISBN 978-0-521-88873-8.

STOKLAND, J.N., S. M. TOMTER, a U. SÖDERBERG. Development of Dead Wood Indicators for Biodiversity Monitoring: Experiences from Scandinavia. **In:**

MARCHETTI, M. *Monitoring and indicators of forest biodiversity in Europe: from ideas to operationality*. European Forest Institute, 2005. 207–226. ISBN 952-5453-04-9.

SVOBODA, M. *Mrtvé dřevo – přehled dosavadních poznatků* [online]. 2007 [cit. 2016-04-03] Dostupné z: <http://www.infodatasys.cz/biodivkrsu/reserseDeadWood.pdf>

ŠUŠLA, M. a K. SVOBODOVÁ. *Lignolytické enzymy jako účinné nástroje pro biodegradaci obtížně rozložitelných organopolutantů* [online]. 2006 [cit. 2016-04-02]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2006\\_10\\_889-895.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2006_10_889-895.pdf)

VAN DEN BRINK, J. a R. P. DE VRIES. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2011, 91(6), 1477-1492 [cit. 2016-04-20]. DOI: 10.1007/s00253-011-3473-2. ISSN 01757598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-011-3473-2>

## 9 Přílohy

Kmeny/větve	Buk/jedle	Suchá hmotnost	C	N	pH
		%	%	%	
CWD	B	66,5975	42,3958	0,1073	5,8335
FWD	B	69,9854	39,8658	0,2248	4,8665
CWD	T	55,3183	38,1897	0,0930	5,1677
FWD	T	74,7347	42,7703	0,1635	4,8539

Příloha 1 znázorňuje průměrné hodnoty suché hmotnosti, uhlíku, dusíku a pH

Kmeny/větve	Buk/jedle	$\beta$ -glucosidáza	fosfatáza	$\beta$ -xylosidáza	N-acetylglucosidáza
		$\mu\text{M min}^{-1} \text{g}^{-1}$ suchá hmotnost			
CWD	B	1,4190	7,2474	0,1214	0,2481
FWD	B	23,1254	55,8801	2,0552	4,5656
CWD	T	2,1184	10,5427	0,4640	0,2963
FWD	T	12,3519	17,4644	1,2123	1,3151

Příloha 2 znázorňuje průměrné naměřené aktivity  $\beta$ -glucosidázy, fosfatázy,  $\beta$ -xylosidázy, N-acetylglucosidázy

Kmeny/větve	Buk/jedle	exoceluláza	$\beta$ -galaktosidáza	$\alpha$ -glucosidáza	lipáza
		$\mu\text{M min}^{-1} \text{g}^{-1}$ suchá hmotnost			
CWD	B	0,1076	0,3277	0,0544	9,9756
FWD	B	2,8857	5,3299	1,2795	62,8790
CWD	T	0,1632	0,7895	0,1876	36,0975
FWD	T	1,6229	2,9302	0,6439	59,5901

Příloha 3 znázorňuje naměřené průměrné aktivity exocelulázy,  $\beta$ -galaktosidázy,  $\alpha$ -glucosidázy a lipázy

Kmeny/větve	Buk/jedle	Ergosterol	lakáza	Mn-peroxidáza	endoceluláza	endoxylanáza
		mg.g <sup>-1</sup>	$\mu\text{M min}^{-1} \text{g}^{-1}$ suchá hmotnost			
CWD	B	34,5899	2,3643	1,6867	3,5901	2,0497
FWD	B	44,9707	1,0075	3,5104	12,1627	25,0182
CWD	T	14,9737	3,0313	1,9521	2,9715	2,5869
FWD	T	33,3752	1,4325	2,1699	9,4711	17,4839

Příloha 4 popisuje průměrné naměřené aktivity lakázy, manganové peroxidázy, endocelulázy a endoxylanázy a naměřené množství ergosterolu