

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



Diplomová práce

Vliv manganu na kolonizaci substrátu *Pleurotus ostreatus* s přihlédnutím na aktivitu mangan peroxidázy.

Influence of mangan on substrate colonization *Pleurotus ostreatus* considering of mangan peroxidase activity

Autor práce: Bc. Irena Kohoutová

Vedoucí diplomové práce: Ing. Ivan Jablonský, CSc.

2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Vliv manganu na kolonizaci substrátu *Pleurotus ostreatus* s přihlédnutím na aktivitu mangan peroxidázy“, vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v přiložené bibliografii.

V Táboře dne 10. 4. 2014

.....

Bc. Irena Kohoutová – autor práce

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu své diplomové práce panu Ing. Ivanu Jablonskému, CSc. za odborné vedení práce na téma Vliv manganu na kolonizaci substrátu *Pleurotus ostreatus* přihlédnutím na aktivitu mangan peroxidázy a za poskytnutí potřebné literatury k tomuto tématu. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Evě Jablonské za pomoc v mikrobiologické laboratoři a panu Ing. Martinu Koudelovi za pomoc při zpracování grafů v programu statistika.

Souhrn

Tato práce byla zaměřena na prorůstání mycelia dřevokazné houby na substrátech ošetřenými různými koncentracemi hypermanganu a síranu manganatého. Tyto látky by mohly zajistit rychlejší a lepší kolonizaci substrátu. Pro tuto práci byla použita nejoblíbenější dřevokazná houba hlíva ústříčná – *Pleurotus ostreatus*.

Cílem této práce bylo založit několik pokusů a porovnat aktivitu růstu mycelia na různě ošetřených substrátech. Hlavní složkou substrátu byly lisované pelety z pšeničné slámy, které byly ošetřeny destilovanou vodou a 2, 6, 10, 14, 18 a 20moly hypermanganu a síranu manganatého. Práci tvoří 5pokusů, u všech 5- ti pokusech byla měřena a porovnána aktivita růstu mycelia hlívy ústříčné na substrátech ošetřených výše uvedenými koncentracemi síranu manganatého a hypermanganu.

Dalším cílem bylo stanovení aktivity ligninolytických enzymů, lakázy a dependentní Mn – peroxidázy v substrátech prorostlý myceliem hlívy a určit jestli aktivita lakázy a Mn – peroxidázy byla ovlivněna přidáním daných koncentrací hypermanganu a síranu manganatého.

Při výsledném zpracování dat bylo prokázáno, že koncentrace hypermanganu a síranu manganatého výrazně ovlivňuje aktivitu růstu mycelia *Pleurotus ostreatus*. Mycelium hlívy prokázalo velmi rychlý růst na substrátech ošetřených 6moly hypermanganu a 6moly síranu manganatého. Velmi podobných výsledků vykazovalo mycelium na substrátech ošetřených 2moly hypermanganu. Substrát ošetřený 2moly síranu manganatého mělo slabší vliv na aktivitu mycelia. Na substrátech ošetřených pouze destilovanou vodou se myceliu hlívy nijak výrazně nedařilo. Pomalý růst mycelia hlívy by zaznamenána na substrátech s koncentrací 18 a 20moly. Z grafů měření aktivity ligninolytických enzymů nebyly zjištěny významné rozdíly u aktivity lakázy a Mn – peroxidázy. Aktivita lakázy se snižovala se stářím a délkou prorůstání mycelia. Nejvyšší aktivita lakázy byla na začátku prorůstání, při odebrání vzorků po 22dnech.

Nižší aktivitu vykazovalo mycelium na konci prorůstání, u vzorků odebraných po 36 dnech. Podobných výsledků bylo zjištěno i u Mn – peroxidázy, rozdílem bylo, že Mn peroxidáza dosahovala vyšší aktivity než lakáza.

Klíčová slova: Hlíva ústřičná, *Pleurotus ostreatus*, léčivé houby, růst mycelia mangan, enzymatická aktivita, lakáza, mangan peroxidáza, organická hmota,

Summary

This work was focused on the penetration of mycelia decaying fungi on substrates treated with various concentrations of permanganate and manganese sulfate. These substances could provide faster and better colonization of the substrate. For this work were used the most popular decaying fungi Oyster mushroom - *Pleurotus ostreatus*.

The aim of this study was to establish a number of experiments and compare the activity of mycelial growth on different substrates treated . The main component of the substrate were extruded pellets of wheat straw, which have been treated with distilled water and 2, 6, 10, 14, 18 and 20 moles of permanganate and manganese sulfate . The work consists of 5 trials , with all 5 - experiments was measured and compared to the activity of oyster mushroom mycelium growth on substrates treated with the above mentioned concentrations of manganese sulfate and permanganate.

Another objective was to determine the activity of ligninolytic enzymes , laccase and Mn -dependent - peroxidase substrates streaky oyster mycelium and determine whether the activity of laccase and Mn - peroxidase was affected by the addition of the concentrations of permanganate and manganese sulfate.

When the final processing has been shown that concentrations of permanganate and manganese sulfate significantly affects the activity of mycelia growth of *Pleurotus ostreatus*. Mycelium Oyster showed very rapid growth on substrates treated with 6 moles 6 moles permanganate and manganese sulfate . Very similar results showed mycelium on substrates treated with 2 mol permanganate. A substrate treated with 2 moles of manganese sulfate was weaker effect on the activity of the mycelia. The substrates treated with only distilled water mycelium oyster not significantly failed. Slow growth of mycelium would oyster recorded on substrates with a concentration of 8 to 20 moles. The graphs measuring the activity of ligninolytic enzymes were no significant differences in the activity of laccase and Mn - peroxidase. Laccase activity decreased with age and length of penetration of mycelia. The highest laccase activity was at the beginning of penetration , with sampling after 22 days. Low activity exhibited mycelium at the end of penetration , on samples taken after 36 days .

Similar results were found also in Mn - peroxidase difference was that Mn peroxidase reaching higher activity than the laccase

Keywords: Oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, medicinal mushrooms , manganese, mycelium, enzymatic activity , organic matter

Obsah

1	ÚVOD	1
2	CÍL PRÁCE A HYPOTÉZA.....	2
3	LITERÁRNÍ REŠERŠE.....	3
3.1	CHARAKTERISTIKA RODU <i>PLEUROTUS</i>	4
3.1.1	<i>Obsahové látky a léčivé účinky hub</i>	6
3.1.2	<i>Druh Pleurotus ostreatus</i>	10
3.1.3	<i>Historie pěstování hlívy</i>	11
3.1.3.1	Historie pěstování hlívy ve světě	11
3.1.3.2	Historie pěstování hlívy u nás.....	12
3.1.4	<i>Fyziologické požadavky hlívy</i>	13
3.1.4.1	Teplota.....	13
3.1.4.2	pH.....	14
3.1.4.3	Světlo.....	14
3.1.4.4	Oxid uhličitý	14
3.1.5	<i>Substráty pro hlívu</i>	15
3.1.5.1	Příprava substrátu	16
3.1.5.2	Pěstební jednotky.....	17
3.1.5.3	Pelety.....	17
3.1.5.4	Slaměné pelety.....	17
3.2	CHARAKTERISTIKA MANGANU	18
3.2.1	<i>Účinky manganu ve výživě lidí</i>	19
3.2.2	<i>Působení manganu na rostliny</i>	20
3.2.3	<i>Manganu ve výživě hospodářských zvířat</i>	21
3.3	ENZYMY	21
3.3.1	<i>Forma a výskyt enzymů</i>	22
3.3.2	<i>Lignin</i>	23
3.3.3	<i>Lignolytické enzymy</i>	25
3.3.3.1	Lakáza	25
3.3.3.2	Mangan – dependentní peroxidáza	25
3.3.3.3	Lignin peroxidáza.....	27
3.4	HOUBY BÍLÉ A HNĚDÉ HNILOBY	28
3.4.1	<i>Charakteristika hub bílé hniloby</i>	28
3.4.2	<i>Charakteristika hub hnědé hniloby</i>	29
4	MATERIÁL A METODIKA.....	30
4.1	VARIANTA Č. 1: POSTUP PŘÍPRAVY – RŮSTOVÉ ZKOUŠKY	30
4.2	VARIANTA Č. 2: POSTUP PŘÍPRAVY – STANOVENÍ AKTIVITY ENZYMŮ	33

4.3 MĚŘENÍ A STANOVENÍ AKTIVITY LIGNOLYTICKÝCH ENZYMŮ.....	35
4.4 POKUS Č. 1: VLIV PŘÍDAVKU MANGANISTANU DRASELNÉHO NA RŮST MYCELIA A ROZKLAD ORGANICKÉ HMOTY HOUBOU <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i>	41
4.5 POKUS Č.2 A Č. 3: VLIV PŘÍDAVKU MANGANISTANU DRASELNÉHO A SÍRANU MANGANATÉHO NA RŮST MYCELIA A ROZKLAD ORGANICKÉ HMOTY HOUBOU <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i>	42
4.6 POKUS Č. 4 A Č. 5: VLIV PŘÍDAVKU MANGANISTANU DRASELNÉHO A SÍRANU MANGANATÉHO NA RŮST MYCELIA A ROZKLAD ORGANICKÉ HMOTY HOUBOU <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> , POUŽITÍ SADBY NA MM MEDIU „KIRK“	44
5 VÝSLEDKY	45
5.1 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ.....	45
5.2 RŮSTOVÉ ZKOUŠKY MYCELIA	48
5.2.1 Pokus č. 1: Vliv koncentrací hypermanganu na růst mycelia <i>Pleurotus ostreatus</i>	48
5.2.2 Pokus č. 2 a č. 3: Vliv koncentrací manganistanu draselného a síranu manganatého na růst mycelia a rozklad organické hmoty houbou <i>Pleurotus ostreatus</i>	51
5.2.3 Pokus č. 4 a č. 5 : Vliv přídatku manganistanu draselného a síranu manganatého na růst mycelia a rozklad organické hmoty houbou <i>Pleurotus ostreatus</i> , použití sadby na MM médiu „Kirk“	56
5.3 MĚŘENÍ A STANOVENÍ AKTIVITY LIGNOLYTICKÝCH ENZYMŮ.....	59
6 DISKUZE	62
7 ZÁVĚR	67
8 SEZNAM LITERATURY.....	68
9 PŘÍLOHY	1
9.1 PŘÍLOHA Č. 1: FOTODOKUMENTACE	1
9.2 PŘÍLOHA Č. 2: TABULKY.....	5
9.3 PŘÍLOHA Č. 3: GRAFY	17
9.3.1 Grafy měření růstu	17
9.3.2 Grafy statistického vyhodnocení	18

1 Úvod

Houby tvoří asi čtvrtinu biomasy Země. Pěstování a produkce jedlých a léčivých hub neustále stoupá po celém světě, Pěstované houby jsou součástí potravinářského trhu, tak i nemalou součástí trhu s doplňky stravy, kde je uplatnění hub stále větší. Jsou přírodním léčivem už po dobu 5000let. Patří mezi ně dřevokazné, saprotrofní houby rostoucí v přírodě většinou na odumřelém dřevě, lesních, hoblinách a rozložené biomase. Díky jejich rozkladu získávají tyto houby živiny pro svůj vývoj.

Většina druhů hub obsahují biologicky aktivní polysacharidy a některé druhy obsahují i protinádorové a stimulační látky pro léčbu nádorových onemocnění, zvýšení aktivity imunitního systému a dalších nemocí. Hlavním nejrozšířenějším pěstovaným druhem je hlíva ústříčná (*Pleurotus ostreatus*), houževnatec jedlý (*shiitake - Lentinula edodes*) a žampion dvouvýtrusý (*Agaricus bisporus*).

Hlíva ústříčná je stále oblíbenějším pěstovaným druhem a to zejména pro vysoký obsah léčivých látek v plodnicích, které se využívají jako doplněk stravy a pro její jednoduché pěstování v domácích podmínkách. Hlíva ústříčná nachází uplatnění jak v potravinářském, tak i ve zdravé výživě a je cenným zdrojem bílkovin pro vegetariány.

2 Cíl práce a hypotéza

Cílem práce je zjistit, do jaké míry ovlivňuje mangan v různé formě intenzitu růstu a enzymatickou aktivitu mycelia hub *Pleurotus ostreatus* a rozklad organické hmoty substrátu.

Hypotéza: Různé koncentrace hypermanganu a síranu manganatého průkazně ovlivní schopnost mycelia houby *Pleurotus ostreatus* kolonizovat pěstební substrát.

3 Literární rešerše

Houby tvoří asi čtvrtinu biomasy země. Jsou přírodním léčivem už po dobu 5000let. Mohou zlepšit zdraví lidí, posílit imunitu člověka a používají se pro léčení a prevenci nemocí v moderním světě.

Houby jsou jednou z nejpočetnějších, nejvýznamnějších skupin eukaryotických heterotrofních organismů (Kalina a Váňa, 2005).

Tvoří nedílnou součást naší živé přírody a jejich pěstování v posledních desetiletích je také důležitým odvětvím zemědělské výroby. Lidé řadu z nich využívali nejen jako potravinu, ale i pro léčivé účinky již v dávnověku, a to v mnoha oblastech světa (Valíček, 2011).

V přírodě jsou houby skvělou recyklací. Živí se, ale také pomáhají rostlinám získat živiny, které potřebují. Houba rozkládá organickou hmotu do podstatných prvků. Podle nedávných odhadů Hawkswortha (2001), existuje více než 1,5milionu druhů hub na Zemi. Houby tvoří 14,000, možná až 22,000 známých druhů, ale to může být méně než 10% z celkového počtu za předpokladu, že podíl užitečných hub mezi neobjevenými druhy bude 5%. Mohou být i tisíce dosud neobjevených druhů, které budou možným přínosem pro lidstvo. Odhaduje se asi, že je 700 jedlých druhů a 50 jedovatých druhů.

3.1 Charakteristika rodu *Pleurotus*

Taxonomické zařazení:

Říše:	Fungi (Houby)
Oddělení:	Basidiomycota (Houby stopkovýtrusné)
Podkmen:	Agaricomycotina
Třída:	Basidiomycetes (Stopkovýtrusné)
Podtřída:	Agaricomycetidae (Houby rouškaté)
Řád:	Agaricales (Pečárkotvaré)
Čeleď:	Pleurotaceae (Lupenotvaré)
Rod:	<i>Pleurotus</i> (Hlíva)

Oddělení: *Basidiomycota* – Stopkovýtrusné houby

Toto oddělení je charakterizováno způsobem pohlavního rozmnožování. Karyogamie i meióza probíhají v buňce zvané bazidie (odpovídající meiosporangiu); haploidní bazidiospory (meiospory) se tvoří exogenně na sterigmatech (stopečkách), vyrůstajících na bazidii nejčastěji po čtyřech (Kalina a Váňa, 2005).

Třída: *Agaricomycetes* (syn. *Basidiomycetes*)

Většina zástupců tvoří bazidiomata (plodnice), i když ty mohou někdy chybět. Do této třídy řadíme většinu mykorhizních hub, známých jako tzv. makromycety (Kalina a Váňa, 2005).

Podtřída: *Agaricomycotidae*

Vývojově odvozenější, homogenní skupina; většina charakteristik je již jednotná, ustálená a pro tuto skupinu specifická.

Řád: Agaricales

Tento řád představuje na druhy nejpočetnější řád rouškatých hub. Převážně se jedná o saprotrofy na rostlinných zbytcích, půdní saprotrofy, dřevní houby, slabé parazity nebo mykorhizní houby. Řada druhů patří k jedlým, často sbíraným houbám, naopak sem patří i nebezpečné jedovaté houby (Kalina a Váňa, 2005).

Čeleď: Pleurotaceae

Houby čeledi Pleurotaceae mají plodnice pleurotoidní, drobné až velké, samostatné nebo ve shlucích, klobouk je hladký u některých druhů vláknitý, lamely sbíhavé s celistvým okrajem. Třeň je centrální, excentrický boční nebo chybějící (Hrouda, 2001).

Rod: Pleurotus

Hlívy zařazujeme mezi gymnokarpní druhy kloboukatých hub, což znamená, že v průběhu vývoje plodnice nejsou její lamely nikdy kryty obalem. Tato skutečnost je důležitá z praktického hlediska především proto, že již mladé plodnice uvolňují spory z postupně zrajících lamel. Výjimkou je pouze hlíva čepičatá (*Pleurotus calyptratus* Lindb. Apud. Fr. Sacc), u níž jsou v mládí lupeny kryté částečným obalem (Jablonský a Šašek, 2006).

Hlívy jsou kosmopolitní houby, rostoucí na všech kontinentech. Pro hlívy je typický třeň, masitý klobouk, sbíhavé lupeny. Barvu mají rozlišnou dle druhu, podobně jako strukturu a chuť (Ginterová, 1985). Hlívy jsou saprotrofní, plodnice rostou nad sebou ve skupinách na kmenech odumřelých a živých stromů (především tvrdé dřevo, ale někdy i na jehličnanech) a způsobují bílou hnilobu. Plodnice vytváří na podzim, v zimě a brzy na jaře jsou často a široce rozšířené v Severní Americe (Kuo, 2005).

3.1.1 Obsahové látky a léčivé účinky hub

Houby jsou považovány za vhodný zdroj stravitelných bílkovin (Chang a Miles, 1989). V přírodě je sbíráno nespočet druhů hub pro jejich rozličné léčivé vlastnosti, ale také pro jejich možnou využitelnost jako halucinogenů a psychostimulanů kvůli čemu se staly důležitou součástí v etnomedicíně (léčitelství) od nepaměti lidstva (Subramanian, 1995, Borchers a J., 1999).

Léčivé houby dokážou modulovat (úprava aktivity) imunitní systém, snižovat krevní tlak, snižovat koncentraci glukózy a lipidů v krvi, mohou inhibovat rozvoj nádorů, zánětů a rozvoj mikroorganismů. Moderní věda identifikovala v houbách různé aktivní složky (Jong, Donovick , 1989 In: Kues , 2000).

V moderní medicíně se dnes využívají polysacharidy hub, například lentinan a schizofilan s protinádorovými vlastnostmi (Wasser 1999).

Ačkoli hlíva patří k nejznámějším pěstovaným houbám, přesto není veřejnost dostatečně informována o jejích léčivých vlastnostech. Analýzy prokázaly vysoký obsah léčivých látek v plodnicích. V tom je hlíva srovnatelná s šiitake, jejíž léčivé vlastnosti jsou známy po několik staletí (Jablonský a Šašek, 2006).

Podle Valíčka (2011) plodnice hlívy ústříčné mají výrazné protinádorové účinky, užívají se však i v prevenci kardiovaskulárních chorob (infarkt myokardu, mozkové příhody), ale také při artritidě i osteoporóze a vlekých zánětech. Zjištěny byly i tonifikační účinky při fyzické i duševním vyčerpání a pozitivní vliv při procesu stárnutí. Působí dobře rovněž při chřipce, rozedmě plic, angíně, astmatu a nachlazení. Snižují hmotnost, zlepšují růst vlasů a kostí, podporují tvorbu buněk kostní dřeně, zvyšují počet bílých krvinek. Užívají se při ztuhlosti šlach, svalů a končetin.

Čerstvé plodnice hlívy mají asi 2,5% bílkovin, 5% sacharidů a pouze 0,1 – 0,2% tuku, širokou škálu aminokyselin, zvláště kyselinu glutamovou. Dále je obsaženo asi 18 mastných kyselin, z nichž tvoří až 55% kyselina linoleová a 40% kyselina olejová. V plodnicích byl zjištěn lovastin, dále lektin a především specifický β – (1,3) – D – glukán, nazývaný pleuran s výraznými protinádorovými účinky (Valíček, 2011).

Naopak Breene 1990 uvádí, že obsah bílkovin v houbách se může lišit o 10 – 40% v sušině. Čerstvé houby obsahují 3 – 21% sacharidů a 3 – 35% vlákniny v sušině. Valíček (2011) uvádí, že u hub jsou přítomny i steroly (např. ergosterol), vitaminy skupiny B, vitamin C, K a P. Specifický je i obsah kyseliny listové (vitaminu B9) u hlívy ústřičné. Kyselina listová podporuje růst mladých buněk, a to i v kostní dřeni. Její nedostatek způsobuje snížení počtu bílých krvinek, poruchy růstu kostí a vlasů a také zánětlivé změny na pokožce dutiny ústní (afty). U šiitake je přítomný purinový alkaloid eritadenin, který má schopnost nastavit správnou hladinu cukru a cholesterolu v krvi.

Dále je u hub obsaženo antibiotikum pleurotin, vykazující antimikrobiální a protirakovinnou aktivitu, také betain, histamin, adenin a ethylamin. Velmi cenný je i obsah vlákniny tvořené hlavně chitinem, který zachycuje cholesterol. Z minerálních látek je to především draslík, železo, fosfor, ze stopových prvků potom hlavně selen, zinek, bor, jod, měď, kobalt, molybden aj. (Valíček, 2011).

Výhodnost hub jako součásti lidské výživy vyplývá hlavně z bílkovinného složení houbového mycelia. Je pravda, že bílkoviny hub se svým aminokyselinovým složením, hlavně, ale obsahem esenciálních aminokyselin se více podobají bílkovinám živočišným než rostlinným, ale přece jen název " maso lesa " se v celkovém srovnání ukazuje jako neodpovídající (Ginterová, 1992).

Zatímco celkový tuk v houbách obsahuje všechny hlavní skupiny lipidů, včetně volných mastných kyselin (mono-, di- a triglyceridů), steroly, estery sterolů a fosfolipidy jsou obsaženy v menší míře a to 2-8 % z hmotnosti sušiny. Není pochyb o tom, že jedlé, čerstvé nebo jinak zpracované houby obsahují určité množství nutričních látek, proto jsou zdrojem potravy pro většinu lidí, ale mohou být významnou složkou potravy i pro vegetariány (Breene, 1990).

Druhy hub	Penízovka sametonohá	Korálovec ježatý	Shiitake	Hlíva ústříčná
Protivirové	x	x		x
Protibakteriální		x	x	x
Protizánětlivé	x	x	x	
Protirakovinné	x	x	x	x
Snižování stresu			x	
Posilující činnosti jater			x	
Posilující činnost ledvin			x	
Zvyšování libida			x	
Imunomodulační	x	x	x	
Kardiovaskulární choroby				x
Posílení nervové činnosti		x		x
Snižování cholesterolu	x		x	x
Snižování krevního tlaku			x	

Tab. 1 Účinky vybraných léčivých hub podle Stametse 2000, Wasser a Weise 1999

Naopak, houby s přihlédnutím k celkovému složení, obsah sušiny a minerálních látek se podobají spíše zelenině. Ginterová (1985) uvádí pro srovnání látkové složení různých zemědělských komodit v tabulce č. 2.

Složka v %	Hlíva ústřičná	Žampion dvouvýtrusý	Špenát	Vepřové maso	Hovězí maso
voda	87	90	93,4	47,5	72
dusíkaté látky	5,4	4,8	2,2	14,5	21
tuky	0,2	0,4	0,3	37,3	5,5
glycidy	5,2	3,5	1,7	-	0,5
vláknina	1	0,8	0,5	-	-
Minerální látky	1	0,8	1,9	0,7	1
Kalorie v 100 g	28	34	25	380	141

Tab. č. 2. Látkové složení jednotlivých komodit

Někteří autoři (Seelkopf, 1955 a Schuster, 1957 In: Ginterová 1985) uvádějí, že v některých jedlých houbách je obsah lysinu, argininu a histidinu srovnatelný z jejich zastoupení v mase a v mléce. Pro ilustraci uvádíme obsah aminokyselin v submersním pěstěném myceliu *Pleurotus ostreatus*, houby, na niž je tato kompilace nejvíce zaměřena.

aminokyselina	% na sušinu	aminokyselina	% na sušinu
asparágová	2,4	leucín	3,6
glutámová	2,6	fenylalanín	0,7
Serín	2,8	metionín	0,6
Glycín	2,2	lyzín	1,8
Treonín	2,9	tyrozín	1,6
Alanín	2,1	histidín	1,4
Valín	1,8	arginín	1,8
Prolín	2,6	tryptofán	0,2

Tab.3. Aminokyselinové složení vypěstovaného mycelia *Pleurotus ostreatus* dle Gonzales (1993)

3.1.2 Druh *Pleurotus ostreatus*

Hlíva ústříčná (*Pleurotus ostreatus*) patří mezi nejznámější dřevokazné houby. V přírodě roste na kmenech a pařezech listnatých stromů. V dnešní době je také pěstována na upravených lignocelulóзовých substrátech (Strmisková a kol., 2006).

Dřevokazná lupenitá houba s šedavým masitým kloboukem, který je 5 – 35cm široký, lasturovitý, bokem přirostlý nebo protažený v krátký třeň. Plodnice tvoří obvykle bohaté trsy seřazené stupňovitě nad sebou. Mladé kloboučky jsou bochníčkovité s podvinutým okrajem. Pokožka je hladká a lysá, od šedé, přes šedohnědou, břidlicovitou až po černou barvu, jen u třeně běle plstnatá, lupeny bílé nebo našedlé. Třeň je 1 – 4cm dlouhý a až 2cm tlustý, válcovitý, dole kyjovitě zduřelý, bílý nebo našedlý. Roste v mírném klimatickém pásu, a to na mrtvých i živých kmenech, které poškozují bílou hnilobou. Plodnice se objevují od podzimu do jara, tj. v době kdy jiné houby nerostou (Valíček, 2011).

3.1.3 Historie pěstování hlívy

Podle Valíčka (2011), je sběr této houby záležitostí mnoha staletí, vždyť se o ní hovoří v jedné z básní z období dynastie Sung (960 – 1279).

V literatuře se uvádí, že již před staletími si lidé přinášeli hlívu, podobně jako jiné druhy hub osidlující dřevo, domů i se substrátem. Dřevo umístili na vlhčím místě a pak zde sbírali houby několik let (Jablonský a Šašek, 2006).

Kdysi byla zřejmě vyhledávanější jako dnes. Dá se to odvodit už i z názvu hlíva, gliva, který tvoří základ pro všeobecné označení hub v některých slovanských řečech a nářečích (Ginterová, 1985).

S produkčním pěstováním hlívy ústříčné se však začalo poměrně pozdě, a to teprve v polovině minulého století v Evropě (Maďarsko, Itálie) (Valíček, 2011).

3.1.3.1 Historie pěstování hlívy ve světě

Jablonský a Šašek (2006) podobně uvádějí, že produkční pěstování zahájili až maďarští mykologové v polovině 60. let. V té době zakládali v Podunajské nížině velké plantáže špalků především topolového dřeva, naočkované podhoubím hlívy ústříčné. Pouze jediná sklizeň do roka, nevýznamné hospodářské výsledky, kolísavá jakost plodnic poškozených živočišnými škůdci a v neposlední řadě i nedostatek většího množství topolového dřeva zájemce z řad produkčních pěstitelů odradily od dalšího pěstování tímto způsobem.

Počátkem 70. let začali hlívu pěstovat i v Itálii, a to na pšeničné slámě a kukuřičných větvech. Pro přípravu substrátu využili zapařovací tunely používané k přípravě žampionového substrátu a pěstování hlívy se rozšířilo do četných sezonních staveb, jako jsou drůbežárny, fóliovníky a další přístřešky (Jablonský a Šašek, 2006).

V 80. letech se rozšířilo pěstování tropických druhů hlív na různých rostlinných odpadech v Indii, Malajsii a dalších zemích jihovýchodní Asie.

V roce 2011 se vypěstovalo ve světě 4 300 000 tun hlívy a hlavním světovým výrobcem se stala Čína. V Evropě jsou největšími producenty Itálie, Francie, Maďarsko a Polsko (Jablonský a Šašek, 2006).

Chang (2013) uvádí, že v roce 1997 se na světové produkci hub podílely asijské státy 74,4%, Evropa 16,3% a Jižní Amerika pouze 1,0%. Takto nízké procento produkce bylo způsobené neznalostí lidí, že houby mohou hrát zásadní roli ve výživě a zdraví člověka.

3.1.3.2 Historie pěstování hlívy u nás

Výzkum v ČSSR začínal náhodně při hledání dlouhodobé perspektivy biotechnologického oddělení Výzkumného ústavu LIKO v Bratislavě. Bylo to na základě pozoruhodných výsledků indických autorů uveřejněných v roce 1964, kteří stanovili chemické složení některých hlív pěstovaných na rýžové slámě (Ginterová, 1985).

Technologický postup výroby sadby a pěstování hlív v Československu vyvinula RNDr. Anastázia Ginterová z Bratislavy (Jablonský a Šašek, 2006).

Dle A. Ginterové (1985) v Československu vzhledem k tradičně zdlouhavým realizacím výzkumných výsledků otevřeli první farmu na pěstování hlív v srpnu v roce 1973 v JZD Liptál, okres Vsetín. Technologie byla primitivní a kapacita farmy malá. O dva roky později otevřeli další farmu v JZD Sokolovo, Bohdalice, okres Vyškov. Zde měli zkušenosti z Liptálu a ve spolupráci s Ing. Rýznerem mohli postavit technologii na lepší úroveň.

Podobně popisuje počátky pěstování hlívy Jablonský a Šašek, (2006), kdy v České republice byla koncem 60. let vysazena první velkoplantáž špalků naočkovaných myceliem hlívy v JZD Liptál u Vsetína. Zde byl také později poprvé použit způsob pěstování hlívy na slámě a kukuřičných větenech. V roce 1975 zahájila provoz pěstírna hlívy JZD Sokolovo Bohdalice v Kojátkách, kde Ing. Rudolf Rýzner poprvé uplatnil velkovýrobní systém plodících stěn ve velkých paletách.

V 80. letech pak byl zahájen provoz v dalších podnicích, kde se substrát ze slámy tepelně ošetřoval v tunelu a osázený plnil do pytlů. Po roce 1989 bylo mnoho pěstíren hlívy zrušeno z důvodu zastavení činnosti zpracovatelského průmyslu, na který byl odbyt plodnic hlívy přednostně orientován.

K omezení pěstování hlívy v té době přispěla i skutečnost, že primitivní podmínky při přípravě substrátu způsobovaly kolísavou kvalitu substrátu, což činilo výrobu nerentabilní. Zvýšený zájem o hlívu přinesly nové poznatky o léčivých vlastnostech houby z poslední doby. V současné době se poptávka po hlívě zvyšuje (Jablonský a Šašek, 2006).

3.1.4 Fyziologické požadavky hlívy

3.1.4.1 Teplota

Pro klíčení spor je optimální teplota 28°C. Při teplotě 20°C je růst mycelia zpomalený, což kulturu hlívy může znevýhodnit proti některým kompetičním mikroorganismům. Růst mycelia se zcela zastaví při 5°C. Mycelium nepoškodí ani mraz. Substrát kolonizovaný myceliem hlívy může být vystaven teplotám pod nulou a po zvýšení teploty mycelium opět začíná růst a kultura vytváří plodnice. Problémy činí zejména v letním období přehřívání prorůstajícího substrátu v intenzivní kultuře v důsledku zvýšené aktivity mycelia houby. Víme, že mycelium hlívy odumírá, pokud je vystaveno teplotě nad 32 – 35°C v závislosti na vlhkosti substrátu.

V průběhu tvorby plodnic má hlíva ústříčná, plicní a máčková svá teplotní maxima, která pokud jsou překročena, zcela znemožní nasazování plodnic. Optimální nasazování zárodků plodnic hlív ústříčné probíhá při teplotě 8 – 12°C a zcela se zastavuje, jakmile teplota přesáhne 15°C. Hlíva ústříčná vytváří plodnice i v teplotě nad 15°C, pokud ji vystavíme předem tzv. chladovému šoku, kdy substrát prorostlý podhoubím umístíme v teplotě 5°C po dobu několika dnů. Mnohdy stačí k tvorbě plodnic vystavit kulturu hlívy ústříčné snížené noční teplotě 12 – 13°C při trvalé denní teplotě 20°C. Nové vyšlechtěné kmeny však tolerují během tvorby plodnic teploty vyšší než původní hlíva ústříčná a to 15-20°C (Jablonský a Šašek, 2006).

3.1.4.2 pH

Optimální hodnota pH během růstu podhoubí hlívy ústřičné je v rozmezí 5,5 – 6,5. Růst mycelia mimo rozmezí uvedených hodnot je zpravidla pomalejší. Při přípravě substrátu se někdy upravuje jeho pH přidávkem vápence (mleté křídly) na hodnotu 5,5 – 5,6 pH. V průběhu růstu mycelia se pH v substrátech mění. V průběhu kolonizace se pH substrátu snižuje s ohledem na tvorbu organických kyselin myceliem houby. V povrchové vrstvě substrátu, kde se nasazují plodnice, jsou hodnoty pH podstatně nižší než ve vnitřních vrstvách (pH 4 – 4, 5) (Jablonský a Šašek, 2006).

3.1.4.3 Světlo

Během kolonizace substrátu hlíva osvětlení nevyžaduje, avšak podobně jako u většiny hub rostoucích na dřevě je během nasazování a vývoje plodnic potřebná určitá intenzita osvětlení. Pro vývoj normálně vyvinutých plodnic je dostatečná intenzita osvětlení 100 - 400 luxů (měřeno na povrchu substrátu) po dobu 12hodin za den. Při vyšší teplotě, kdy plodnice rostou rychleji, má hlíva větší nároky na osvětlení (až 1000luxů) než při nízkých teplotách. Na nedostatek osvětlení reaguje plodnice tvorbou protáhlého třeně a zakrnělého klobouku. V úplné tmě se vytvářejí místo plodnic temnostní formy připomínající tvarem květák. Optimální osvětlení má vliv na vybarvení klobouku. Při nižší intenzitě osvětlení mají plodnice světlou barvu (Jablonský a Šašek, 2006).

3.1.4.4 Oxid uhličitý

V průběhu vývoje se kultura hlívy vyznačuje zcela odlišnými nároky na koncentraci oxidu uhličitého v prostředí. Během kolonizace (prorůstání) substrátu dosahuje mycelium nejvyšší rychlosti růstu, pokud je v substrátu koncentrace 2000 – 3000 ppm oxidu uhličitého. Vysoká koncentrace oxidu uhličitého potlačuje růst konkurenčních zelených plísňí. Proto se fólie na povrchu pěstebních bloků či pytlích perforují jen částečně, aby se v substrátu udržela vyšší koncentrace CO₂.

Během vývoje plodnic reagují jednotlivé kmeny hlívy na koncentraci CO₂ rozdílně. Nejcitlivější na CO₂ jsou kmeny HK35 a P24, které již při 800 ppm mají nižší výnos. Největší toleranci vykazují kmeny P20 a PX, u kterých se snížení výnosu projevilo až při koncentraci CO₂ 1500 ppm.

V průběhu nasazování a vývoje plodnic je třeba pěstírnu hlívy intenzivněji větrat a to více než žampionárnu. Při koncentraci oxidu uhličitého, která převyšuje stanovená rozmezí, se vyvíjejí deformované plodnice – protáhlé třeně šroubovitě stočené, klobouk zakrnělý nálevkovitého tvaru, dužnina měkká (Jablonský a Šašek, 2006).

3.1.5 Substráty pro hlívu

V přírodě roste hlíva ústřičná většinou na odumřelém dřevě. Hlívy rychle rostou i na různých organických odpadech, jako je sláma, kukuřičná větvena, hrachovina, pazdeří, vojtěškové seno nebo papír. Suroviny, na kterých hlívy rostou, můžeme charakterizovat jako lignocelulózové odpady, tedy látky obsahující lignin, celulózu a hemicelulózu. Předpokladem je, aby tyto netradiční materiály pro pěstování hlívy byly předem tepelně ošetřeny – pasterizovány, případně sterilizovány. K rozkladu lignocelulózových odpadů využívá hlíva systém příslušných enzymů (Jablonský a Šašek, 2006).

Podle Changa (2013) je technologie pěstování hlív odlišná pro různé druhy metod. Tyto technologie musí být provedeny správně pro dobrý výnos a upraveny především podle místních klimatických podmínek, dostupnosti materiálu pro substrát a podle použití daného druhu hub.

Podle Ginterové (1985) je hlíva organizmus nenáročný na substrát. Vyplozený hlívový substrát byl pokusně využíván jako krmivo pro hospodářská zvířata. Při sledování a zpracování vyplozeného substrátu, se zaměřujeme především na takové materiály, které by jako krmivo byly neškodné i bez hlívy. Prorůstání mycelia houby považujeme za zušlechťovací biotechnologii, která zlepšuje vlastnosti tohoto materiálu. Jde například o slámu (pšeničná a rezná), o kukuřičná větvena, o zbytek rostlin po pěstování krmného bobu apod.

Všechny tyto materiály se vhodně fyzikálně upraví a stanou se substrátem pro hlívu. Yamasaki et al. (2003) použil jako substrát pro hlívu směs z 70% trávy, 30% kávových slupek s přídavkem 2% Ca (OH)₂ a vše nechal kompostovat v dřevěných přepravkách a došel k závěru, že *Pleurotus ostreatus* lze pěstovat na lignocelulóзовých, nekompostovaných a nepasterizovaných substrátech s počátečním pH 8,7.

3.1.5.1 Příprava substrátu

Hlíva je aerobní organismus a pro svůj růst potřebuje kyslík. Materiál připravený na substrát musí být vzdušný, vlhký a objem materiálu nesmí být příliš velký (např. dlouhá stébla slámy). Ekonomickým zájmem je, aby se z minimálního prostoru získal maximální užitek (Ginterová, 1985).

Podle Stametse (2000) se substrát (např. sláma s vlhkostí kolem 14%) nechá nasáknout vodou, tak aby obsah vody v substrátu činil 72 – 76%. Poté proběhne sterilizace při 110 – 115°C v autoklávu nebo sterilizace parou.

Tepelným ošetřením zbavíme substrát zárodků jiných mikroorganismů a usnadníme tak prorůstání podhoubí hlívy (Jablonský a Šašek, 2006).

Contreras (2004) uvádí, že připravený substrát (trávy, kukuřičný klas, kukuřičná sláma, kávové slupky) se ponoří do vody s obsahem 0,5% vápna, bez dalšího tepelného zpracování. Čas ponoření substrátu je v rozmezí 0 – 48hodin. Vlhkost substrátu se musí udržet tak, aby se zamezilo šíření bakterií v substrátu.

Substráty, nesmí být zkontaminované cizorodými látkami, které by na jedné straně překážely pěstované houbě, nebo na druhé straně by tím byli ohroženi další konzumenti (např. těžké kovy). Přírodní materiály, které přicházejí v úvahu jako substrát pro hlívu, mohou obsahovat různé biologické nečistoty (zárodky hmyzu a mikroorganismy).

Jedna z metod přípravy substrátu doporučuje nechat po pasterizaci namnožit v substrátu některé bakterie rodů *Pseudomonas*, *Bacillus* a streptomycey, protože produkty těchto mikroorganismů potlačují růst zelených plísní a jejich biomasu využívá podhoubí hlívy.

Správně promíchaná sadba hlívy se substrátem je další zárukou rychlého prorůstání substrátu. Ke kolonizaci substrátu přispívá i zvýšená koncentrace oxidu uhličitého a optimální teplota 24 – 28°C (Jablonský a Šašek, 2006).

3.1.5.2 Pěstební jednotky

Substrát plníme do různých pěstebních jednotek, kterými mohou být pytle, slisované bloky zabalené do samosmršťující fólie, pěstební palety ve tvaru válců či plodících stěn. Velmi důležitý je poměr substrátu na 1 m² nebo na objem místnosti. Nejlepší podmínky pro rozvoj plodnic jsou 80 – 100kg na 1m² nebo 4 pytle na 1m² podlahové plochy (Jablonský a Šašek, 2006).

3.1.5.3 Pelety

Pelety jsou vysoce stlačené výlisky válcovitého tvaru, nejčastěji vyráběny v průměru 6 mm a různorodé délce 5 – 40mm. Kromě dřevních pelet se také na trhu objevují pelety rostlinné, kůrové, rašelinové a pelety z dalších materiálů, jako je biomasa a jejich vzájemných směsí – tzv. směsné pelety (Stupavský, 2010)).

Podle serveru Varmeco.cz biomasa je téměř jakákoli hmota organického původu, ať už rostlinného či živočišného. V souvislosti s energetickými zdroji se většinou jedná o dřevní odpad, slámu a další zemědělské zbytky a odpady, ale i exkrementy užitkových zvířat.

Suchá biomasa, což je například dřevní a suchý rostlinný odpad, se většinou zpracovává suchými procesy (spalování či zplyňování), dále lisování olejů a jejich úprava například při výrobě bionafty.

3.1.5.4 Slaměné pelety

Slaměné pelety se vyrábějí lisováním vstupní vysušené suroviny (slámy) na prstencové nebo ploché matrici bez dalších přídavných směsí, pojiv nebo lepidel. (Stupavský, 2010). Tyto pelety se využívají jako topné pelety pro jejich vysokou výhřevnost. Dále se využívají jako podestýlka pro hospodářská a ušlechtilá zvířata (Varmeco.cz).

3.2 Charakteristika manganu

V přírodě se mangan vyskytuje ve formě sloučenin Mn^{2+} , Mn^{4+} a méně často také Mn^{3+} . Je relativně koncentrován v některých hydrotermálních ložiscích.

Mangan je hned po železe druhým nejrozšířenějším těžkým kovem v zemské kůře. Je to tvrdý, křehký kov. V čisté formě má stříbrobílou barvu, jinak je ocelově šedý, podobný železu. Je to špatný vodič tepla a elektrické energie.

V běžném životě se patrně nejčastěji setkáme se sloučeninami sedmimocného manganu – manganistany. Manganistany se připravují oxidací manganinů. Například hypermangan (manganistan draselný) je fialová látka, která se dobře rozpouští ve vodě.

Obsah veškerého manganu v půdě kolísá v rozmezí 0,01 – 0,29%. Vrchní vrstva půdy v důsledku biologické akumulace obsahuje více manganu než půdotvorný substrát. Maximální obsah manganu se vyskytuje v půdách na vyvěřelinách a sedimentech. V písčitých půdách a solných půdách obsah klesá až na pouhé stopy (Richter, 2007).

Podle Bencko et. al.(1995) jsou zdroji manganu v životním prostředí jeho rudy, tak i produkty lidské činnosti, konkrétně odpady z výroby manganu, feromanganu a jiné metalurgické odpady, vyřazené suché galvanické články. Hodnoty manganu v ovzduší se pohybují na úrovni 6. 10 – 9 mg/m³. V pracovním prostředí jsou jeho koncentrace řádově vyšší a dosahují až desítek mg/m³. V potravinách se obsah Mn pohybuje v rozmezí desetin a desítek (výjimečně i stovek) mg/kg. Průměrný obsah v živé hmotě suchozemských rostlin se udává na úrovni 30mg/kg.

Síran manganatý je anorganická, manganatá sůl kyseliny sírové v podobě prášku světle růžové barvy. Tato látka se používá při galvanickém pokovení, a dále na výrobu jiných, složitějších sloučenin obsahujících mangan. Rovněž je tato látka vytvářena při čištění manganu, zejména od železitých sloučenin Bencko et. al., 1995).

3.2.1 Účinky manganu ve výživě lidí

Mangan je stopový prvek, který je soustředěn v mitochondriích, zejména v buňkách hypofýzy, jater, slinivky, ledvin a kostí. Ovlivňuje syntézu mukopolysacharidů, stimuluje jaterní syntézu cholesterolu a mastných kyselin, dále je kofaktorem mnoha enzymů, včetně arginázy a alkalické fosfatázy v játrech (AMA Drug Evaluations Annual)

Kofaktor enzymu je látka, která tvoří s řetězcem aminokyselin tzv. složené enzymy, bez těchto látek enzym není funkční) označeného jako glukosyltransferáza, který je nezbytný pro syntézu látek (mukopolysacharidů glukosaminoglykanů) (Bencko et al. 1995).

Mangan je obsažen v našem organismu a jeho pravidelný přísun v potravě je důležitý z několika důvodů. Mangan je prvek, který je zároveň pro tělo nezbytný ale i potenciálně toxický. V organismu hraje významnou roli v řadě fyziologických pochodů, kterých se účastní buď jako součást enzymů (např. v antioxidantních dějích) nebo jejich aktivátor (např. enzymů podílejících se na metabolismu cukrů, aminokyselin a cholesterolu (Andrt, 2011).

Mangan patří mezi těžké kovy, které člověk do jisté míry potřebuje. V lidském těle je mangan přítomen v koncentraci kolem 0,65 mg/kg. Je prvkem důležitým pro krvetvorbu a podílí se na správném vývoji mezibuněčné hmoty, kostí a chrupavek. Pomáhá také hlídat hladinu cholesterolu v krvi, rovněž ovlivňuje růst lidského plodu, vývoje orgánů a správnou funkci vnitřního ucha důležitého pro udržování rovnováhy.

V údajích o příjmu manganu potravou se značně různí. Zatímco některé zdroje uvádějí rozmezí 2 – 9mg. Bencko et al. (1995) udávají 5 – 1000mg z pitné vody, 2 – 8 mg z potravy a 0,5 – 2 mg z ovzduší. Minimální dávka potřebná pro zdravý vývoj organismu je 2 – 3 mg/den. Mangan je důležitý pro činnost mozku, pomáhá k zabezpečení správné struktury kostí, přispívá k překonávání únavy, zlepšuje paměť, zvyšuje celkovou odolnost nervů, podporuje svalové reflexy a pomáhá využít vitamín C. Co se týká vstřebávání do organismu tohoto prvku, muži obecně vstřebávají mangan hůře než ženy. Vstřebávání manganu z potravy může narušit současný obsah železa. Absorpce manganu je naopak zvýšena, je-li železa nedostatek (Andrt, 2011).

3.2.2 Působení manganu na rostliny

Mangan se řadí k těžkým kovům, které rostlina přijímá jako kationt Mn^{2+} , zvláště při vyšší kyselosti půdy. V rostlinách se pohybuje jako Mn – chelát převážně v lýku cévních svazků a ovlivňuje metabolismus IAA a dusíku. (Kincl a Krpeš, 2000).

Vaněk a kol., 2007 uvádějí, že obsah manganu v rostlinách se pohybuje ve značném rozpětí, obecně je dán stanovištěm, pH půdy a rostlinným druhem. Rostliny pěstované na kyselejších stanovištích vykazují vyšší obsah Mn. Pohyblivost manganu v rostlinách je omezená, Mn je obtížně transportován ze starších orgánů, proto jeho opětovné využití v mladých orgánech je redukováno. Mangan se účastní řízení oxidačních, redukčních a karbonylačních procesů při tvorbě glycidů a bílkovin, dále se účastní fosforylačních reakcí a aktivuje enzymy účastnící se oxidace kyseliny α – ketoglutarové, dekarboxylace kyseliny oxalátové a oxaljantarové.

Mangan je důležitým prvkem při fotosyntetických pochodech (fotolýze vody) a nejdůležitějším aktivátorem v Krebsově cyklu. Je nepostradatelný při výstavbě chloroplastů a při tvorbě buněčných membrán. Jeho nedostatek způsobuje omezení syntézy bílkovin, vitamínu C a chlorofylu. Nadbytek manganu se vyskytuje jen na silně kyselých půdách.

Podle Hejnáka a kol.(2007) nedostatek manganu ve výživě rostlin vede k zeslabení její fotosyntézy a dýchání. Viditelné příznaky způsobují inhibici růstu, chlorózy a nekrózy u mladých listů, opad listů.

Co se týče vlivu manganu na pěstované houby byly činěny pokusy s přidavkem sloučenin obsahující stopový prvek mangan, jehož cílem bylo zvýšit výnos plodnic hlívy. Tak např. Nevel (2012) přidával do substrátu určité dávky síranu manganatého (170, 255 a 340 ppm) a zkoumal jeho vliv na výnos plodnic hlívy.

Přídavek síranu manganatého byl občas přidáván také v produkčních výrobnách substrátu hlívy v Holandsku (Jablonský, 2013 osobní sdělení).

3.2.3 Manganu ve výživě hospodářských zvířat

Mangan je pro organismus zvířat nenahraditelným prvkem. Je součástí systému některých enzymů, zúčastňuje se v procesu tkáňového dýchání a při jeho nedostatku v krmné dávce je možné pozorovat zpomalený růst, deformace kostry, zintenzivnění růstu patního kloubu, které je označováno jako peroza.

Snížení hladiny manganu v organismu zvířat je provázeno také poruchami pohlavních funkcí a zpomalení růstu. U nosnic dochází ke snížení snášky vajec, jejich oplozenosti a líhivosti, poruše tvorby skořápky vajec aj. (pivovarskekvasnice.cz)

3.3 Enzymy

Chemické reakce v živých objektech probíhají 10krát rychleji než v systémech neživých, a to díky biokatalyzátorům označovaných jako enzymy. Enzymy jsou molekuly bílkovin, které jsou uspořádány tak, aby působily specificky, měnily rychlost chemických reakcí a regulovaly svou aktivitu (Musil a Nováková, 1990).

Vzájemnou reakcí mezi skupinami bílkovinné molekuly a substrátem (látka, která je vázána v molekule pomocí aminokyselin) dochází k přeměně substrátu na jinou látku – produkt. Díky rozmanitosti struktury bílkovin, umožňuje existenci velkého množství enzymů, specifické pro jednotlivé substráty.

Enzymy mohou obsahovat skupiny, které nejsou složkami z aminokyselin a podílejí se na katalytických reakcích, koenzym a prostetické skupiny. Enzymy katalyzují jen metabolické reakce, které jsou termodynamicky možné, reakce exergonické. Endergonické děje probíhají jen tehdy jsou - li s ději exergoními (Rosypal, 1998).

Podle Horáka (2002) na aktivitu enzymů, má vliv řada faktorů. Především teplota, pH, koncentrace substrátu, enzymu a reakčního produktu, dále přítomnost modifikátorů (aktivátorů a inhibitorů). Všechny tyto faktory působí v organismu společně, vzájemně se prolínají a vytváří přirozené optimální podmínky pro činnost enzymů.

Musil a Nováková (1990) píše, že pH optimum je taková hodnota při níž je aktivita enzymu optimální a nad touto hodnotou nebo pod ní aktivita enzymu klesá. Za fyziologické teploty aktivita enzymu stoupá, ale nad určitou teplotou je enzymově katalyzovaná reakce ovlivněna denaturací bílkovinné části. Všechny enzymy nejsou stejně citlivé na změny teploty

3.3.1 Forma a výskyt enzymů

Houba *Pleurotus ostreatus* má nutriční a léčivé vlastnosti, které jsou závislé na kolonizovaném substrátu. V přírodě, tato houba roste na mrtvém dřevě, ale může být i uměle pěstována na zemědělských odpadech (kávové slupky, piliny eukalyptu, bagasa z cukrové třtiny). Degradace těchto zemědělských odpadů zahrnuje některé enzymové komplexy tvořené z oxidačních (lakáza, mangan peroxidáza a lignin peroxidázou) a hydrolitických enzymů (celulázy, xylanáza a tanáza) (Luz a Nunes, 2012.)

Jednou z hlavních složek dřeva, lesní hrabanky a dalších typů rostlinné biomasy je ligninocelulóza. Podrobně popisuje i Baldrián a spol. (2005), že houby způsobující bílou hnilobu se vyznačují jedinečným souborem extracelulární oxidázy a peroxidázy, které jim umožňují účinně rozkládat lignin. Skutečností je, že ligninolytické enzymy rozkládají širokou škálu organických sloučenin strukturně podobných ligninu. Mezi ně patří i xenobiotika jako polycyklické aromatické uhlovodíky, polychlorované bifenyly, syntetická barviva a výbušniny, (které přitahují zvláštní pozornost ke studiu ligninolytických enzymů už v posledních dvou desetiletí).

Daleko méně je známo o extracelulárním systému používaným houbami bílé hniloby, rozkládající celulózu a hemicelulózu, které jsou hlavním zdrojem uhlíku pro mycelium hub. U druhů hub, které byly použity pro in situ biodegradaci (*Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* a *Pleurotus ostreatus*) jsou doposud omezené informace o produkci celulolytických a hemicelulolytických enzymů a jejich regulaci přítomnosti kovů v substrátu (Baldrián a spol., 2005).

V minulosti byla velká pozornost věnována vlivu těžkých kovů na houby bílé hniloby. Těžké kovy mohou být pro bílé plísně toxické a mohou mít vliv i na jejich růst, aktivitu extracelulárních enzymů a na výživu v půdě (Baldrián a spol., 2005).

Podle místa působení se enzymy dělí na intracelulární a extracelulární. Intracelulární enzymy jsou většinou uvnitř buňky ve vázané formě. Extracelulární enzymy jsou z buněk vylučovány (Gymbos.cz).

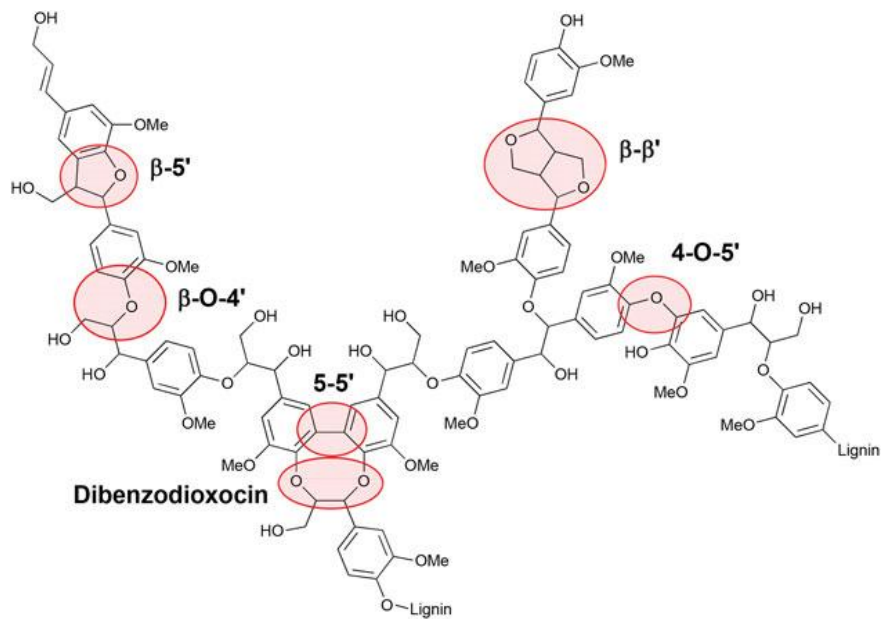
3.3.2 Lignin

Lignin je organická látka, která váže buňky, vlákna a cévy, které tvoří dřevo a ligninové prvky rostlin, například ve slámě. Po celulóze je lignin nejrozšířenějším obnovitelným zdrojem uhlíku na Zemi. Není možné určit přesnou strukturu ligninu jako chemické molekuly. Všechny ligniny vykazují určité rozdíly v jejich chemickém složení. (ili-lignin.com).

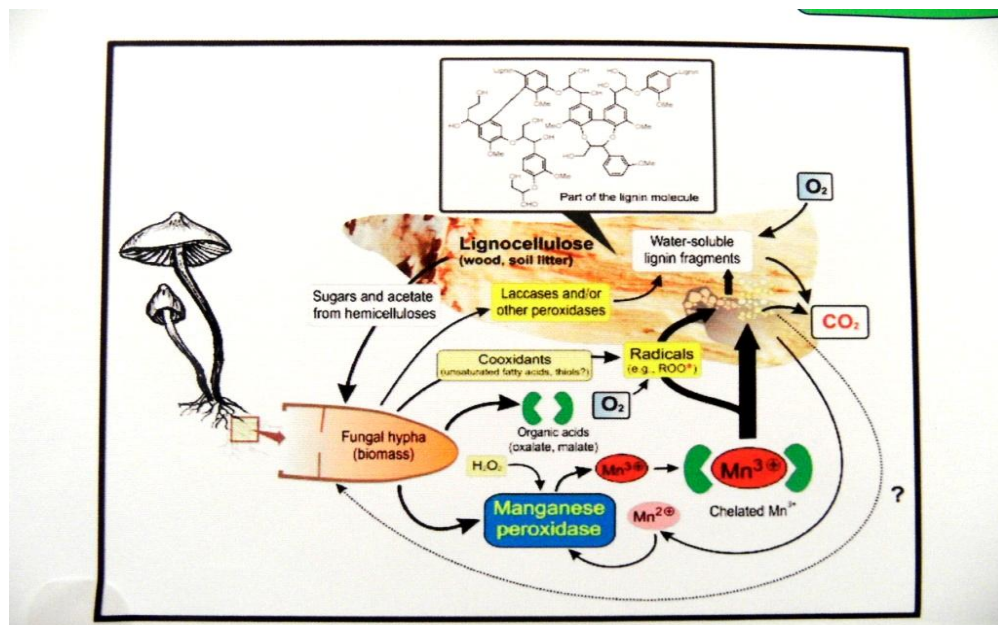
Lignin je velmi rezistentní k mikrobiální degradaci, protože je jen málo organismů, které jsou vybaveny vlastním biodegradčním systémem, který by byl schopný rozkládat substrát s takovým nedostatkem struktury a prostorové pravidelnosti (Kirk et. Farrell, 1987).

Podle Baldriána (2008) je rozklad ligninu katalyzován sadou oxidáz a peroxidáz s pomocí enzymů poskytujících hydroxylové radikály, organické kyseliny a arylalkoholy. Složení lignolytických systémů je tedy velmi složité a specifické. Je však zřejmé, že mikroorganismy jsou schopny rozkládat lignin stejně, jako celulózu, hemicelulózu.

Martens a Zadražil (1998) uvádějí, že je při rozkladu ligninu ve dřevě zapojeno mnoho enzymů, o jejichž působení na lignin je prakticky málo známo. Přesto, že část těchto enzymů je zvána "lignináza", doposud se nepodařilo enzymaticky rozložit lignin bez přítomnosti houbového mycelia. Ligninázy jsou inaktivovány v přítomnosti ligninu během 20 minut, protože aktivita jednotlivých enzymů je ovlivněna geneticky-druhovými vlastnostmi a podmínkami, ve kterých se houba nachází (teplota, složení plynné fáze - obsah kyslíku a oxidu uhličitého, přítomnost živin atd.).



Obrázek č. 1: Schéma ligninu a jeho běžných vazeb.



Obrázek č. 2: Schéma rozkladu lignocelulózy pomocí lignolitických enzymů houbovým myceliem

3.3.3 Lignolytické enzymy

Tato skupina enzymů je v přírodě velmi universální a nachází uplatnění v celé řadě průmyslového odvětví. Lignolytické enzymy se podílejí na degradaci komplexů ligninu a studie prokázaly, že velké množství ligninocelulózových zbytků jsou k dispozici pro výrobu lignolytických enzymů (K.N.Niladevi, 2009).

3.3.3.1 Lakáza

Lakáza je známá po mnoho let v rostlinách, houbách, hmyzu a nedávné době byla nalezena i v bakteriích. Lakáza vykazuje nízký redukční potenciál, i přesto může oxidovat širokou škálu substrátů. Lakázy jsou produkovány houbami bílé hniloby *Basidiomycetes* (stopkovýtrusné) a řadou *Ascomycetes*. (vřeckovýtrusné) a jejich molární hmotnost se pohybuje kolem 50 – 70 kDA a kyselým pH (3 – 6 (Baldrián, 2008)).

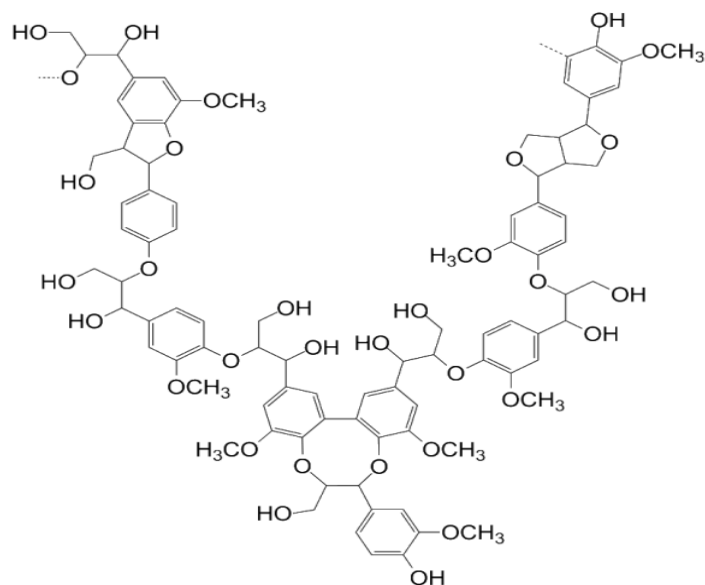
Koláčková (1999) uvádí, že lakáza se často používá jako enzym sloužící k rozlišení, zda se jedná o houby bílé hniloby, které ji zpravidla syntetizují nebo o houby zpravidla hnědé hniloby, které lakázu nevytvářejí. Často také záleží na chemickém složení média, na kterém jsou kultury hub pěstovány a na kterém se potom pomocí barvicích technik, enzymy dokazují. Je zajímavé, že hlavně minerálně chudá media, provokují houby k syntéze různých enzymů.

Podle Mayer a Staples (2002) se lakáza podílí na pigmentaci spor plísni, na dřevnatění buněčných stěn, dále je použita při delignifikaci bílé hniloby dřeva a je součástí bioremediačních procesů za účelem ochrany životního prostředí způsobené průmyslovými odpady vod.

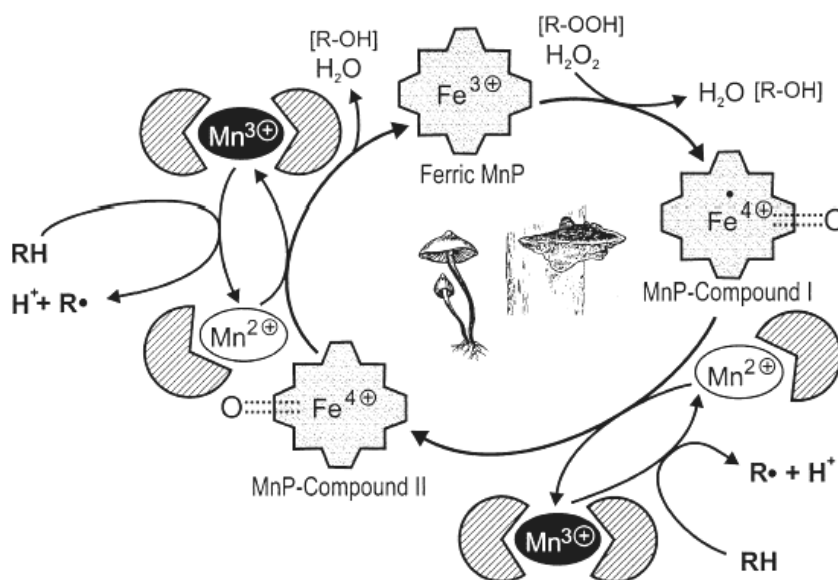
3.3.3.2 Mangan – dependentní peroxidáza

Mangan peroxidáza je nejčastější lignin modifikující peroxidáza, která je produkována téměř všemi houbami bílé hniloby a houbami kolonizující půdy. Tyto houby vylučují Mn – peroxidázu do svého mikroprostředí (Hofrichter, 2002).

Podle Baldriána (2008) mají mangan peroxidázy vyšší molekulovou hmotnost (47 – 60 kda) než lignin peroxidázy. Mangan peroxidázy jsou schopny oxidovat fenolické substráty, nejčastěji oxidů Mn^{2+} na kationt Mn^{3+} , který je stabilizován organickými kyselinami. Chelát Mn^{3+} je difúzní a může oxidovat širokou škálu substrátů, včetně fenolů, nefenolových aromatických skupin, karboxylových kyselin, thiolů a nenasycených mastných kyselin. Tato oxidace může vést k mineralizaci a rozkladu ligninu.



Obrázek č. 3: Katalytický cyklus mangan dependentní peroxidázy



Obrázek č. 4: Cyklus Mn - dependentní peroxidázy

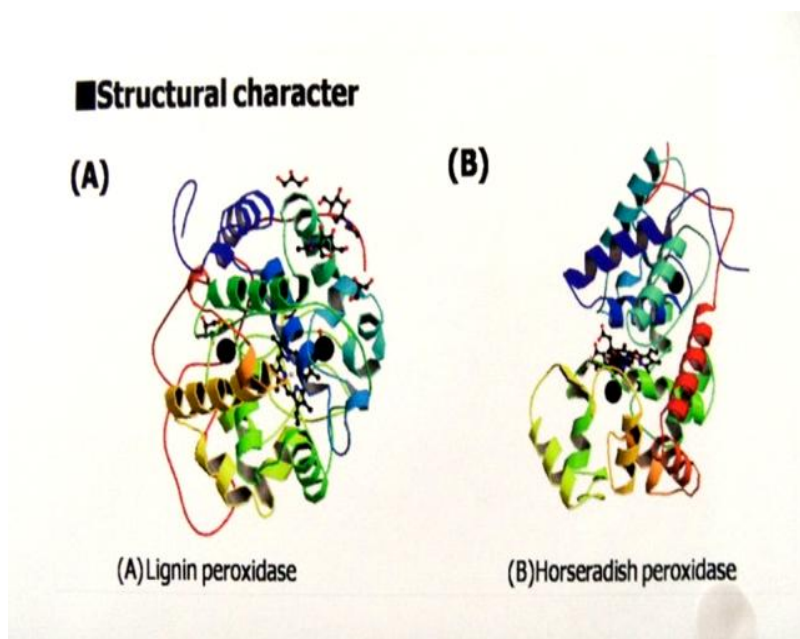
3.3.3.3 Lignin peroxidáza

Podle Koláčkové (1999) lignin peroxidáza je schopná depolymerizovat lignin (štěpení nefenolických podjednotek ligninu), oxidovat a depolymerizovat škálu dimerů a oligomerů strukturně příbuzných ligninu a dále katalyzovat produkci aktivního druhu kyslíku O_2 za účasti H_2O_2 . Obsahuje Fe protoporfínu jako prostetickou skupinu.

Bylo zjištěno, že rychlost rozkladu ligninu je mnohem větší v přítomnosti lignin peroxidázy a že při degradaci syntetického ligninu hraje důležitější roli než mangan dependentní peroxidáza (Jong et. al. 1989).

Piontek (2001) uvádí, že lignin peroxidáza se nachází v rostlinných buněčných stěnách a je schopná oxidovat aromatické sloučeniny s redoxním potenciálem vyšším než 1,4.

Podle Baldriána (2008) mají lignin peroxidázy molární hmotnost kolem 40 kDa a velmi nízké pH (2,5 – 3).



Obrázek č. 5 Schéma Lignin peroxidázy

3.4 Houby bílé a hnědé hniloby

3.4.1 Charakteristika hub bílé hniloby

Houby bílé hniloby (white rot fungi) jsou schopné rozkládat všechny složky dřeva (celulóza a lignin). Dřevo jejich působením získává bílou barvu v důsledku prorůstání bílého houbového mycelia (Baldrián, 2008).

Tyto houby produkují různé isoformy extracelulárních oxidáz včetně lakázy, Mn-peroxidázy a lignin peroxidázy, které se podílejí na degradaci ligninu v jejich přirozeném ligninolytickém substrátu. (Wesenberg, 2003)

Podle degradace ligninu dělíme tyto houby do dvou skupin. První skupina hub degraduje lignin zároveň s celulózou a nachází se především v tvrdé části dřeva, výjimečně v měkké části dřeva. Do této skupiny patří *Irpex lacteus*, *Phanerochaete chrysosporium* a *Heterobasidion annosum*. Druhá skupina hub. je schopna degradovat lignin selektivně a nachází se v tvrdé i měkké části dřeva, jsou to např. *Pleurotus sp*, *Ganoderma australe*, *Phlebia tremellosa*, *Ceriporiopsis subvermispora*. (Pořízka, 2012).

Jiné rozdělení hub bílé hniloby do čtyř skupin na základě produkce lignolytických enzymů navrhnul Baldrián (2008):

1. houby produkující lignin peroxidázu, Mn-peroxidázu a lakázu
2. houby produkující Mn-peroxidázu a lakázu
3. houby produkující ligninperoxidázu a lakázu
4. houby produkující pouze lakázu.

Univerzální peroxidáza byla izolována z *Pleurotus spp.* a dalších stopkovýtrusných houbách. Byla popsána jako třetí typ lignolytických peroxidáz, kombinující vlastnosti lignin peroxidázy, mangan peroxidázy a mikrobiální peroxidázy oxidačních fenolických sloučenin.

3.4.2 Charakteristika hub hnědé hniloby

Dřevo je specifický materiál, který je velmi odolný proti mikrobiálnímu rozkladu. Hmota, ze které se dřevo skládá, obsahuje polysacharidy, zejména celulózu a lignin. Houby hnědé hniloby pouze polysacharidy, lignin ve dřevě zůstává (Baldrián, 2009).

Houby hnědé hniloby obsahují omezený počet dřevokazných *Basidiomycetes*, které způsobují rychlé poškození dřeva depolymerizací složky celulózy. Při depolymerizaci celulózy dochází ke ztrátě hmotnosti dřeva, v pokročilém stádiu k rozkladu, ke ztrátě celulózy a modifikaci ligninu (K. Kleman – Leyer a spol., 1992).

Baldrián (2009) uvádí, když houba hnědé hniloby kolonizuje například pařez, kde má dostatek uhlíku pro růst biomasy, ale postrádá další živiny, jako je dusík nebo fosfor, může vyslat svoje vlákna do půdy, kde je těchto prvků dost, a přetransportovat si je do pařezu. Tyto houby umí také živit svoje mycelium v poměrně chudém půdním prostředí tím, co získá rozkladem dřevní hmoty z pařezu.

Mezi houby způsobující hnědou hnilobu patří z těch u nás nejrozšířenějších např. Troudnatec pásový (*Fomitopsis piniola*), Hnědáček Schweinitzův (*Phaeolus schweinitzii*), sírovec žlutooranžový (*Laetiporus sulphures*) a březovník březový (*Piptoporus betulinus*) (Kolařík, J. a spol, 2005).

Podle Baldriána (2009) je nejnebezpečnější houbou hnědé hniloby dřevomorka domácí (*Serpula lacrimans*), které se lze těžko zbavit. Pro svůj růst potřebuje poměrně málo vody a vodu si dokáže sama i vyprodukovat v průběhu rozkladu, tzv. metabolickou vodu. Metabolická voda vzniká chemickými procesy při rozkladu dřeva. Dřevomorka je schopná vodu také transportovat svými vlákny ze vzdálenějších míst, kde je vody dost.

4 Materiál a metodika

Dřevní houba - *Pleurotus ostreatus* kmen 35 byla kultivována na substrátech obohacených a neobohacených solemi obsahujícími mangan o různých koncentracích (síran manganatý, manganistan draselný neboli hypermangan). V pokusu byla sledována rychlost kolonizace substrátu myceliem této houby. V průběhu kolonizace byly odebrány vzorky substrátu, ve kterých byla stanovena aktivita vybraných enzymů a úbytek organické hmoty.

Použitý kmen: *Pleurotus ostreatus*

Pro tuto práci byla použita houba *Pleurotus ostreatus* kmen 35, ze sbírek VÚRV Praha Ruzyně.

Hypermangan

Využití v lékařství jako desinfekce a antiseptikum, léčba plísňových infekcí, kůže a léčba alergické reakce při barvení vlasů.

Síran manganatý

Používá se v tiskařské barvě, pro výrobu oxidu manganatého, barvení porcelánu, ve farmaceutickém průmyslu a v krmivu pro hospodářská a drobná zvířata.

4.1 Varianta č. 1: Postup přípravy – růstové zkoušky

Zrnitá sadba

Zrnitá sadba houby byla připravena z pšenice, která byla povařena ve vodě. Během varu, po nabobtnání obilek pšenice se voda scedila a obilky byly proprány studenou vodou. Poté po okapání obilek byla přidána sádra s práškovou křídou. Nosičem byly zaplněny sklenice do $\frac{3}{4}$, lahve uzavřeny vatovými zátkami a zakryty alobalem. Lahve byly vysterilizovány při 120 °C po dobu 2 hodin.

Po přirozeném zchladnutí byl nosič za aseptických podmínek naočkován bločkem agaru s myceliem *Pleurotus ostreatus*. Po dobu růstu mycelia 14 dnů ve tmě a při teplotě 24 - 27 °C byla sadba v lahvích 2x protřepávána. Připravená sadba byla skladována při teplotě 2 - 5 °C.

Slaměné pelety

Pelety jsou granule získané vysokotlakým lisováním lignocelulózového odpadu. Využívají se jako topné pelety pro jejich vysokou výhřevnost a jako podestýlka pro hospodářská a užitková zvířata.

Chemikálie pro přípravu substrátu

- Destilovaná voda
- Manganistan draselný - hypermangan
- Síran manganatý

Přístrojové vybavení

- Flowbox
- Autokláv
- Klimatizační box BINDER KBW 400
- Laboratorní sušárny

Postup přípravy substrátu pro růstové zkoušky

U každé varianty jsme použili 250g slaměných pelet, které jsme zalili (ohřátým) roztokem 0,5 l vody a daným množstvím hypermanganu nebo síranu manganatého. Pouze u 7. varianty jsme zalili pelety pouze horkou vodou, tato varianta je kontrolní. Po několika hodinách, když jsou pelety dokonale rozpuštěny, jsme takto připravený substrát řádně promíchali, a naplnili do zkumavek po 4 ks od každé varianty a zkumavky uzavřeli hliníkovou fólií.

Každou zkumavku jsme řádně označili příslušným číslem varianty. Zbylý substrát od každé varianty jsme použili ke stanovení pH substrátu.

Označené zkumavky jsme podrobili sterilizaci v autoklávu a po zchladnutí substrátu (následující den) jsme zaočkovali substrát zrnitou sadbou *Pleurotus ostreatus* na povrch. Očkování probíhalo v sterilním prostředí ve flowboxu, kde jsme pomocí sterilní lžičky odebírali zrnitou sadbu a pokládali na povrch připravené zkumavky. Zkumavku jsme přikryly hliníkovou fólií, kterou jsme zajistili gumičkou, aby se zabránilo kontaminaci z prostředí. Zaočkované zkumavky se uložily do klimatizačního boxu při 24°C, kde substrát prorůstal.

V průběhu prorůstání jsme hodnotili intervaly přírůstků, které jsme zaznamenávali podél stěny zkumavek, každé měření jinou barvou, pro dobré rozlišení termínu měření při vyhodnocování výsledků. Měření prorůstání přírůstků končilo v okamžiku, kdy mycelium v první ze zkumavek dorostlo ke dnu sklenice. Poté pomocí pravítka jsme měřili jednotlivé přírůstky, vždy na dvou stranách (osách) u každé zkumavky a zapisovali do tabulky pro další vyhodnocení.

Stanovení pH substrátu

Ze zbylého substrátu při přípravě zkumavek se z každé varianty odebralo 50 g substrátu, který se smíchal se 100 ml destilované vody a po vyluhování (30 – 60min) se zjistilo pH substrátu.

Stanovení sušiny a vlákniny

Po 21dnech, po ukončení prorůstání substrátu se vybrala od každé varianty jedna zkumavka a z ní se odebralo ze dvou různých míst cca 50 g prorostlého substrátu. Tento vzorek se nechal v sušárně sušit přibližně 1 den při teplotě 105 °C. Po usušení se materiál zvažil a vypočítalo se procento sušiny, ze kterého se vypočítalo procento vlákniny v materiálu.

4.2 Varianta č. 2: Postup přípravy – stanovení aktivity enzymů

Živné medium – agar

Pro všechny varianty pokusů bylo použito standardního živného média - sladový agar, který byl vyroben z 1l vody, 20g agaru a 20g sladového výtažku. Sterilizovaný sladový agar byl naléván do Petriho misek.

Chemikálie pro přípravu substrátu

MM medium „Kirk“:

(Tien a Kirk, 1988), pH=4,5

- Glukóza – 10g/l
- bazální roztok – 100ml/l
- 2,2 dimethylkcinát 1,4g/l
- Thiamin HCl (100mg/) – 10ml/l
- Tartrát amonný – 0,1g/l
- Stopové prvky – 60ml/l

*Bazální roztok (1L): KH_2PO_4 – 20g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 5g

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 1g

Stopové prvky – 100ml

*Stopové prvky (1L): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 3g

$\text{MnSO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ – 0,5g

NaCl – 1g

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1g

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,1g

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1g

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,1g

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,1g

H_3BO_3 – 10mg

Nitrilacetát – 1,5g

Purf: 80ml pro extrakci

- 8,9g octan sodný
- 3,0g kyselina octová
- 1000ml destilovaná voda

Přístrojové vybavení

- Flowbox
- Autokláv
- Klimatizační box BINDER KBW 400
- Laboratorní třepačka
- Jednohlavová pipeta

Příprava substrátu pro stanovení aktivity enzymů

Aktivita enzymů se měřila ze substrátu očkovaného myceliem narostlým na Kirkově mediu. Připravené medium jsme naplnili do Erlenmayerových baněk 250 ml a nechali vysterilizovat v autoklávu. Následující den jsme do sterilního media zaočkovali houbovou kulturu a nechali po dobu 15dní kultivovat. Mezitím jsme si připravili zkumavky se substrátem stejným způsobem jako u předešlé varianty pokusu s výjimkou, že uprostřed jsme udělali pomocí skleněné tyčinky díru až na konec zkumavky. Takto připravené zkumavky jsme očkovali ve flowboxu ve sterilních podmínkách.

Baňky s Kirkovo mediem byly porostlé myceliem, které tvořilo malé chuchvalce, shluky. Shluky jsme pomocí speciálního mixéru zhomogenizovali. Takto připravené inokulum jsme pomocí pipety očkovali zkumavky se substrátem.

Zkumavky se zakryli hliníkovou folií, zagumičkovali a nechali prorůst v klimatizačním boxu při 24° C.

Poté se z každé zkumavky 0,1,2,3,4,5,6 odebraly dva vzorky po 5g a to z 22. dne měření a 36. dne měření. Enzym byl vytřepáván z prorostlého substrátu do pufru o pH a to tak, že do všech 14kádinek jsme přidali předem připravený pufr. Kádinky se označily dle čísla zkumavky/dne měření; 0/22 a 0/36. Po dobu 30min jsme v kádinkách vytřepali výluh ze substrátu pro pufr na třepáče. Vzniklý supernatant byl získán filtrací přes filtrační papír do plastových zkumavek (falkonů), abychom získali materiál pro stanovení aktivity enzymů. Ampulky jsme označili příslušným měřením jako u kádinek.

4.3 Měření a stanovení aktivity lignolytických enzymů

Měřena byla aktivita lignolytických enzymů v substrátu prorostlém *Pleurotus ostreatus* po různém způsobu ošetření substrátu (KMnO₄ vs. MnSO₄).

Použité chemikálie:

ABTS (2,2 azinobis – 3- ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)

Dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Na₂HPO₄ 2H₂O)

Dihydrát síranu manganatého (MnSO₄ 2H₂O)

Dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄)

DMAB (3-dimethylaminobenzoová kyselina)

EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina)

Kyselina citronová (citrát)

Kyselina jantarová (sukcinát)

Kyselina mléčná (laktát)

Kyselina octová (acetát)

MBTH (3methyl-2-benzothiazolinon-hydrazon-hydrochlorid)

Octan sodný

Peroxid vodíku

Roztoky:

Pufir pro extrakci slámy (octanový pufir 160 mM, pH 5,0)

8,9 g octan sodný

3,0 g kys. octová

1000 ml destilovaná voda

Roztok DMAB (25 mM)

0,0826 g DMAB

20 ml fosfátový pufir

Roztok MBTH (1 mM)

0,0043 g MBTH

20 ml destilovaná voda

Roztok MnSO_4 (2 mM)

0,0169 g $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

50 ml destilovaná voda

Roztok EDTA (2 mM)

0,074 g $\text{Na}_2 \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

50 ml destilovaná voda

Roztok H₂O₂ (1 mM) – připravit čerstvý před každým měřením

10 µl 30% H₂O₂

88 µl destilovaná voda

Sukcinát laktátový pufr (100 mM, pH 4,5) – stanovení Mn-peroxidasy

0,146 g kyselina jantarová

1,64 g kyselina mléčná, 60%

100 ml destilovaná voda

Fosfátový pufr (100 mM, pH 6,5) – rozpuštění DMAB

0,950 g KH₂PO₄

0,540 g Na₂HPO₄ 2H₂O

100 ml destilovaná voda

Citrát fosfátový pufr (100 mM citrát a 200 mM fosfát, pH 5,0) – stanovení lakasay

2,1 g kyselina citronová, monohdrát

3,56 g Na₂HPO₄ 2H₂O

100 ml destilovaná voda

Roztok ABTS (0,08%)

40 mg ABTS

50 ml destilovaná voda

Přístrojové vybavení:

- ELISA Spektrofotometr TECAN
- Vortex třepačka
- Analytické váhy

Lakáza

- Měření v mikrotitrační destičce
- Reakční směs: 50 µl vzorek
150 µl citrátový pufr
50 µl roztok ABTS
- Substrát: ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)
- Měření při 420 nm

Lakáza

- Použitý pufr: Citrát-fosfátový pufr (0,1 M citrát a 0,2 M fosfát), pH 5
- Chromogenní substrát: ABTS (0,08% ve vodě)
- Do každé jamky napipetováno 50 µl vzorku, 150 µl pufru a 50 µl substrátu ve třech opakováních pro každý vzorek
- měření při 420 nm na spektrofotometru, měření každých 30 s po dobu 3min
- enzymová aktivita počítána z rozdílů absorbancí v lineární oblasti

Peroxidasy a oxidasy

- Reakční směs: 50 µl vzorek a 200 µl AR/AP/AB

Směsi obsahují sukcinil-laktátový pufr, substráty DMAB a MBTH

AR – aktivita pozadí + aktivita peroxidasy (obsahuje MnSO₄ a peroxid vodíku)

AP – aktivita pozadí + aktivita peroxidasy nezávislých na manganu (obsahuje H₂O₂)

AB – aktivita pozadí

- Měření při 595 nm

Manganová peroxidasa

- použit sukcinát-laktátový pufr (100 mM, pH4,5)
- chromogenní substráty: DMAB (25 mM ve fosfátovém pufru) a MBTH (1 mM ve vodě)
- Do každé jamky napipetováno 50 μ l vzorku a 200 μ l příslušné směsi AR, AP či AB (viz tabulka v rozpisu)
- 3 sady měření pro každý vzorek: první sada měření obsahovala směs s peroxidem vodíku (1 mM) i s manganatými ionty (2 mM), druhá sada neobsahovala manganaté ionty (a zbylé manganaté ionty byly naopak chelátovány pomocí 2 mM EDTA) a třetí sada obsahovala směs bez peroxidu vodíku i manganatých iontů opět s přídavkem EDTA
- tzn. celkem 9 jamek pro každý vzorek
- měření při 590 nm na spektrofotometru TECAN, měření každých 30 s po dobu 3 minut
- enzymová aktivita manganové peroxidasy byla počítána z rozdílů absorbancí v lineární oblasti s odečtením aktivity oxidas a peroxidas bez manganu

Harmonogram pokusů

Pokus č. 1: příprava substrátu: 2.4. 2012

založení - očkování: 3.4.2012

ukončení – poslední měření růstu: 9.5.2012

Pokus č. 2: příprava substrátu: 13.6.2012

založení - očkování: 14.6.2012

ukončení – poslední měření růstu: 20.7.2012

Pokus č. 3: příprava substrátu: 16.10.2012

založení - očkování: 17.10.2012

ukončení – poslední měření růstu: 21.11.2012

Pokus č. 4: příprava substrátu: 16.1.2013

založení - očkování: 17.1.2013

ukončení – poslední měření růstu: 1.3.2013

Pokus č. 5: příprava substrátu: 6.2.2013

založení - očkování: 7.2.2013

končení – poslední měření růstu: 8.3.2013

ukončení – enzymatická aktivita: 12.3.2013

4.4 Pokus č. 1: Vliv přídatku manganistanu draselného na růst mycelia a rozklad organické hmoty houbou *Pleurotus ostreatus*

Pro každou ze 7 variant bylo použito 250 g slaměných pelet a 500 ml roztoku, který byl připraven následovně:

Varianty	mM	g hypermanganu
1.	2	0.16
2.	6	0.475
3.	10	0.79
4.	14	1.105
5.	18	1.42
6.	20	1.58
7	0	0

Plánované analýzy z tohoto pokusu:

1. Rychlost růstu mycelia
2. Obsah vlákniny po skončení kolonizace
3. pH před a po skončení kolonizace substrátu
4. Sušina před a po skončení kolonizace substrátu

4.5 Pokus č.2 a č. 3: Vliv přídavku manganistanu draselného a síranu manganatého na růst mycelia a rozklad organické hmoty houbou *Pleurotus ostreatus*

Pro každou ze 7 variant bylo použito 250 g slaměných pelet a 500 ml roztoku, který byl připraven následovně:

Varianty	mM	g hypermanganu
1.	2	0.16
2.	6	0.475
3.	10	0.79
4.	14	1.105
5.	18	1.42
6.	20	1.58
7	0	0

Varianty	mM	l/molů	g MnSO ₄	Na 500 ml
1.	2	0,002	0,338	0,169
2.	6	0,006	1,014	0,507
3.	10	0,01	1,69	0,845
4.	14	0,014	2,366	1,183
5.	18	0,018	3,042	1,521
6.	20	0,02	3,38	1,69

Tab. č. 1: Počet zkumavek na odběr aktivity enzymů u přidavku hypermanganu

mol	Odběry na aktivitu enzymů				Manganistan draselný	Počet zkumavek
	1. Odběr	2. Odběr	3. Odběr	4. Odběr	Celkem zkumavek	
2	2	2	2	2	8	4
6	2	2	2	2	8	4
10	2	2	2	2	8	4
14	2	2	2	2	8	4
18	2	2	2	2	8	4
20	2	2	2	2	8	4
	12	12	12	12	48	24

Tab. č. 2: Počet zkumavek na odběr aktivity enzymů u přidavku síranu manganatého

mol	Odběry na aktivitu enzymů				S. manganatý	Počet zk.
	1. Odběr	2. Odběr	3. Odběr	4. Odběr	Celkem zkumavek	
0	2	2	2	2	8	4
2	2	2	2	2	8	4
6	2	2	2	2	8	4
10	2	2	2	2	8	4
14	2	2	2	2	8	4
18	2	2	2	2	8	4
20	2	2	2	2	8	4
	14	14	14	14	56	28

4.6 Pokus č. 4 a č. 5: Vliv přídavku manganistanu draselného a síranu manganatého na růst mycelia a rozklad organické hmoty houbou *Pleurotus ostreatus*, použití sadby na MM mediu „Kirk“.

Pro každou ze 7 variant bylo použito 250 g slaměných pelet a 500 ml roztoku, který byl připraven následovně:

Varianty	mM	g hypermanganu
1.	2	0.16
2.	6	0.475
3.	10	0.79
4.	14	1.105
5.	18	1.42
6.	20	1.58
7	0	0

Varianty	mM	l/molů	g MnSO ₄	Na 500 ml
1.	2	0,002	0,338	0,169
2.	6	0,006	1,014	0,507
3.	10	0,01	1,69	0,845
4.	14	0,014	2,366	1,183
5.	18	0,018	3,042	1,521
6.	20	0,02	3,38	1,69

5 VÝSLEDKY

Kapitola výsledky zahrnuje tři podkapitoly. První kapitola popisuje „Statistické vyhodnocení“, kde je znázorněna variabilita růstu mycelia hlívy a porovnání ošetření substrátu hypermanganem a síranem manganatým. Jednotlivé grafy statistického vyhodnocení jsou uvedené v příloze č. 3.

Druhá kapitola popisuje „Růstové zkoušky mycelia“, výsledky jsou zaznamenány pomocí grafů a tabulek. V grafech jsou zaznamenány výsledky růstových zkoušek *Pleurotus ostreatus*. Uvedené údaje v grafech jsou průměry přírůstků naměřené při vyhodnocování tabulek na konci prorůstání mycelia. V tabulkách jsou uvedené jednotlivé přírůstky všech variant viz. příloha č. 2.

Třetí podkapitolou je „Stanovení aktivity ligninolytických enzymů“. Pomocí grafů je znázorněna aktivita lakázy a Mn – peroxidázy a porovnána s růstem mycelia.

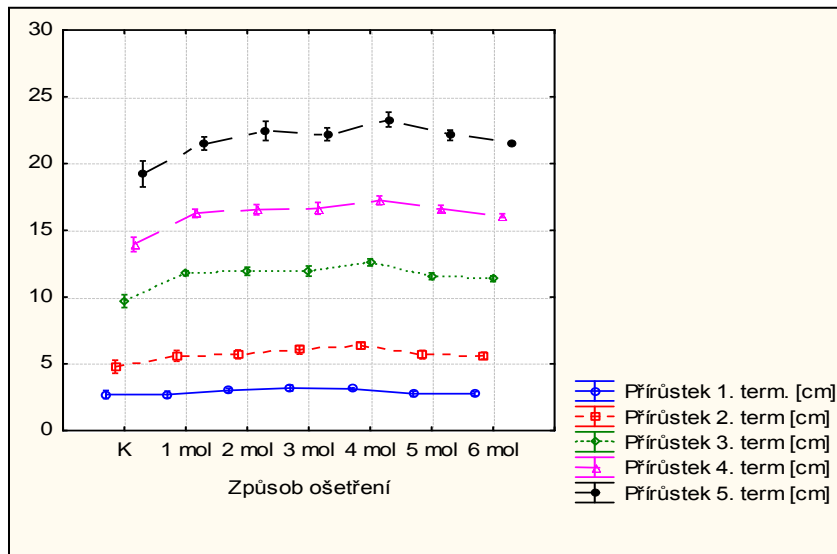
Grafy znázorňují statistické vyhodnocení jednotlivých pokusů růstu mycelia *Pleurotus ostreatus*. Vyhodnocení výsledků bylo zpracováno v počítačovém programu Statistika. Jednotlivé linky znázorňují průběh růstu mycelia daného ošetření

5.1 Statistické vyhodnocení

Statistické vyhodnocení pokusů je znázorněno grafy č. 1 – 5. K statistickému vyhodnocení byly použity celkové přírůstky z jednotlivých pokusů a zpracovány v programu Statistika. Grafy znázorňují průběh růstu mycelia jednotlivých přírůstků.

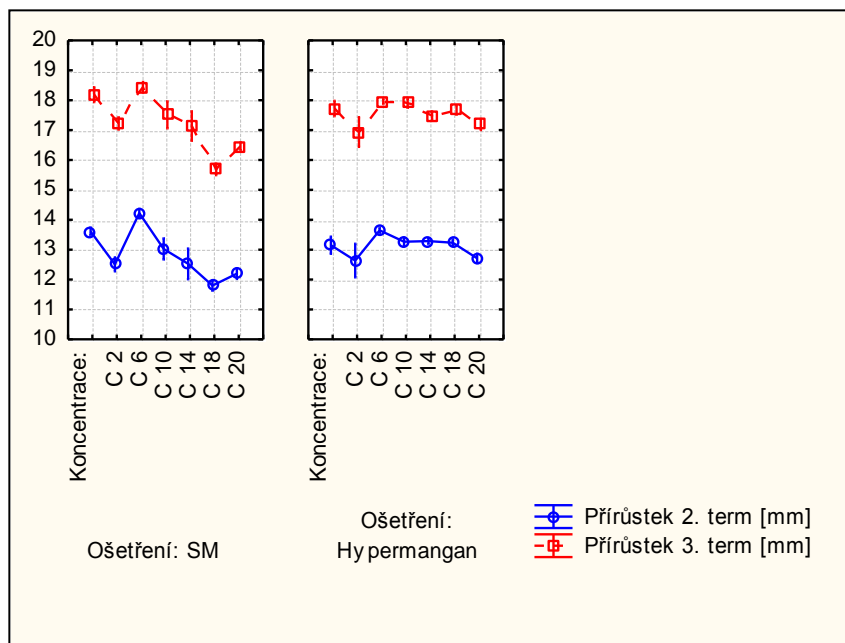
Z grafu je vidět, že kolonizace substrátu myceliem byla pozvolná a u všech přírůstků.

S termínem přírůstků se zvyšovala variabilita kolonizovaného substrátu



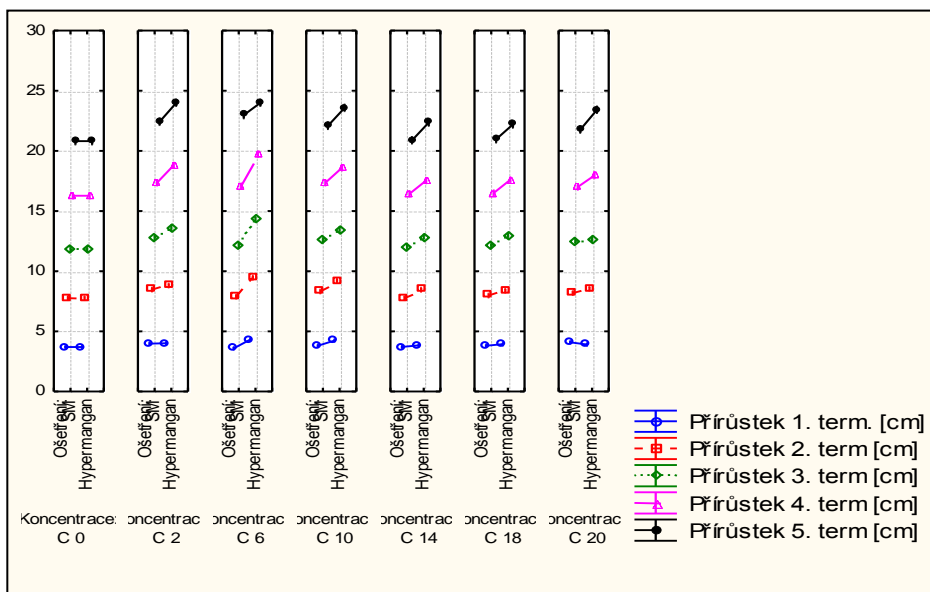
Graf č. 1: Statistické vyhodnocení pokusu č. 1

V grafu je znázorněn velmi podobný průběh kolonizace substrátu myceliem po ošetření hypermanganem a síranem manganatým. Kdy při zvyšování koncentrace došlo k postupnému zpomalení prorůstání mycelia substrátem. Substrát ošetřený 2 moly vykazoval velmi špatné podmínky pro růst mycelia.



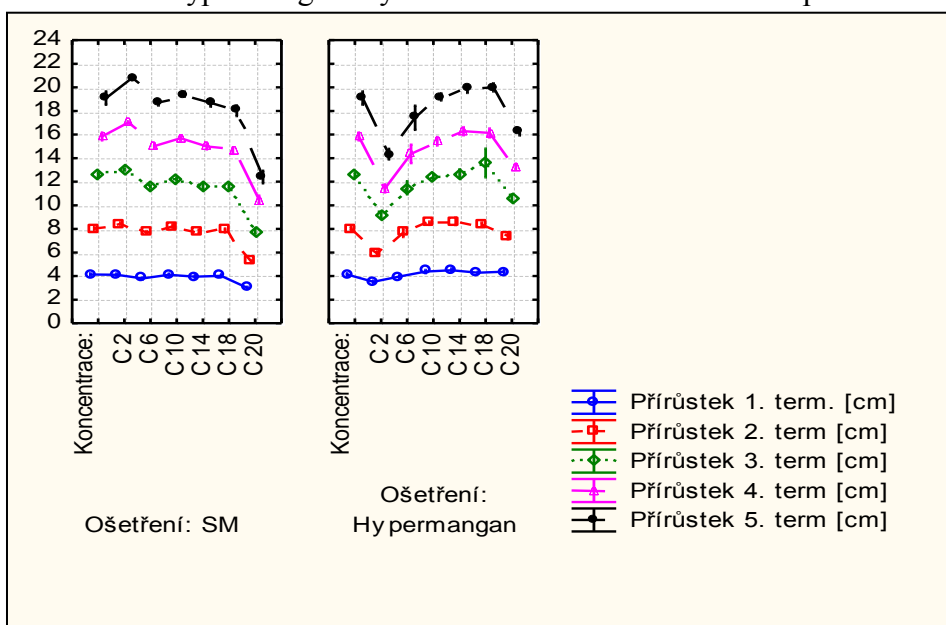
Graf č. 2: Statistické vyhodnocení pokusu č. 2

Ze souhrnného grafu je patrné, že ošetření hypermanganem a síranem manganatým mělo podobný vliv na průběh prorůstání mycelia substrátem. Mycelium *Pleurotus ostreatus* kolonizovalo o něco rychleji substrát ošetření hypermanganem.



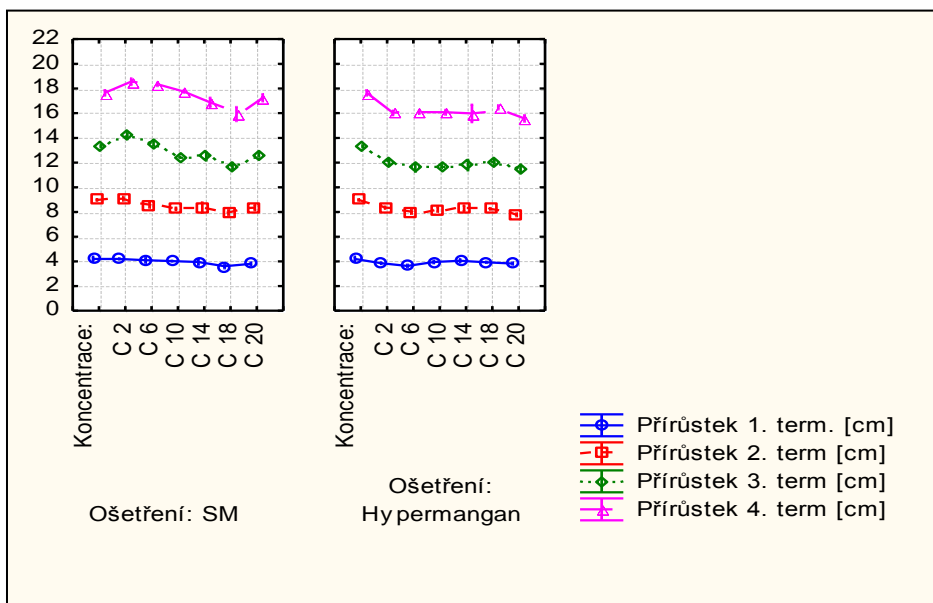
Graf č. 3 : Statistické vyhodnocení pokusu č. 3

Z výsledků vyhodnocení je dobře vidět rychlost růstu mycelia jednotlivého působení ošetření hypermanganem a síranem manganatým. Vyrovnanější růst mycelia je zřejmý při ošetření síranem manganatým, kdy průběh prorůstání mycelia klesá s vyšší koncentrací. Ošetření hypermanganem má opačný průběh, s přibývajícím koncentrací hypermanganu rychlost kolonizace substrátu stoupá.



Graf č. 4: Statistického vyhodnocení pokusu č. 4

Z grafu je patrný podobný průběh kolonizace substrátu v prvních dnech měření, kdy je růst mycelia velmi pomalý. U ošetření hypermanganu se průběh kolonizace substrátu během prorůstání nemění.



Graf č. 5: Statistické vyhodnocení pokusu č. 5

5.2 Růstové zkoušky mycelia

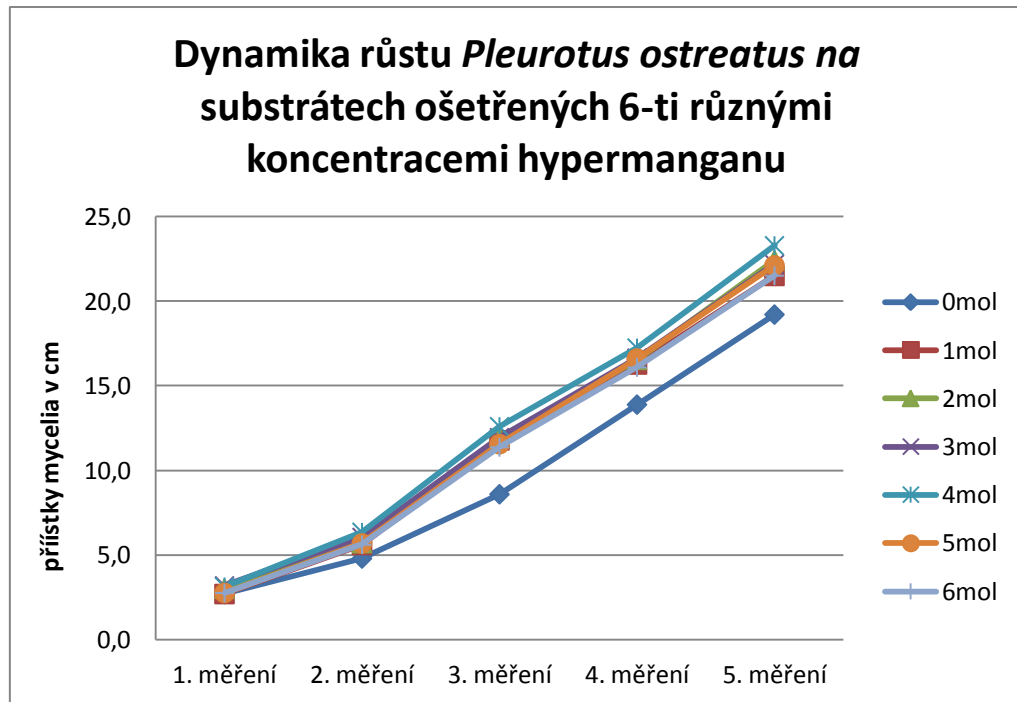
5.2.1 Pokus č. 1: Vliv koncentrací hypermanganu na růst mycelia

Pleurotus ostreatus

V tabulkách můžeme vidět růst mycelia v jednotlivých zkumavkách, za přidání dané koncentrace hypermanganu, 1,2,3,4,5 a 6 moly. V první tabulce jsou data z kontrolní varianty, tzn. bez přidání hypermanganu. Některé přírůstky se shodovaly a v některých případech se lišily o milimetry. Důvodem může být nestejně očkovaní sadbou. Zeleně označená čísla znamenají první známky výskytu plodnic hlívy.

V první tabulce můžeme vidět, že u některých zkumavek kontrolní varianty ještě nedošlo k úplnému prorůstání mycelia a už došlo k výskytu plodnic. Největší výskyt plodnic je u kontrolní varianty a varianty, kde bylo ošetření substrátu 4moly hypermanganu.

Dále vysoký výskyt plodnic byl u varianty se 1 a 2 moly hypermanganu, kde došlo k prorůstání u dvou zkumavek. Naopak u varianty 5, kde byl substrát ošetřen 4moly hypermanganu nebyl žádný výskyt plodnic.



Graf.č 6: Vyjádření dynamiky růstu *Pleurotus ostreatus* na ošetřeném substrátu různou koncentrací hypermanganu

Stanovení hrubé vlákniny

V tabulce je zapsán obsah vlákniny v substrátech ošetřených jednotlivými variantami koncentrace hypermanganu. Hodnoty hrubé vlákniny jsou uváděny v %. Nekolonizovaný substrát (kontrolní varianta) obsahoval 32,8%. Všechny prorostlé substráty obsahovaly menší množství vlákniny než kontrolní varianta, hodnota byla naměřena v průměru 35% vlákniny v substrátu. Pro stanovení hrubé vlákniny byla použita 0,13M kyselina sírová a 0,23M hydroxid draselný. * FB - FibreBag

Číslo FB/ vzorku	(hmotnost vysuš.FB)	(hmotnost prázdného spal.kel)	(navážka vzorku - na tisíciny)	(FB po vyvaření + spal.kel)	FB + kelímek po spálení	% surové vlákniny
1.	0,2573	29,5014	1,058	29,8610	29,5031	35,8
2.	0,2567	29,9092	1,004	30,2541	29,9103	34,4
3.	0,2562	26,2643	1,0236	26,6311	26,2656	36,6
4.	0,2568	27,5797	1,0134	27,9314	27,5812	35
5.	0,2619	26,5241	1,0308	26,8868	26,5257	36,1
6.	0,2613	25,8120	1,0241	26,1715	25,8128	35,9

Tab. č. 4: Vyhodnocení hrubé vlákniny v kolonizovaném substrátu *Pleurotus ostreatus* v %

Stanovení pH substrátu

Pro stanovení pH substrátu byl použit poměr 1: 2 – 25ml vody: 50g substrátu. Po několika minutách se směs přefiltrovala přes filtrační papír do kádinky a změřilo se pH pomocí pH metru. V tabulce jsou zapsané hodnoty pH substrátu kontrolní varianty, před naočkováním sadbou *Pleurotus ostreatus* a hodnoty pH substrátů ošetřených danými koncentracemi hypermanganu. Kontrolní varianta vykazovala pH kyselejší, protože použitým materiálem pro substrát byly použity slaměné pelety. S vyššími dávkami koncentrace hypermanganu se zvyšuje i hodnota pH substrátů.

Číslo vzorku	0.	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Počet molů hypermanganu	0	2	6	10	14	18	20
Hodnota pH	5,2	6,9	7,3	7,2	7,3	7,4	7,4

Tab. č. 5: Tabulka s hodnotami pH jednotlivých substrátů

Stanovení obsahu sušiny

V tabulce jsou zapsány výsledky množství sušiny obsažené v jednotlivých substrátech. Množství sušiny bylo měřeno před kolonizací substrátu myceliem a po kolonizaci substrátu s přidavkem daných koncentrací hypermanganu. Ve všech ošetřených substrátech různými koncentracemi je obsah sušiny velmi podobný, kolem 25 – 26%. S rostoucí koncentrací hypermanganu roste i obsah sušiny v kolonizovaném substrátu. V porovnání s kontrolní variantou, která má obsah sušiny 28,8% , mají kolonizované substráty nižší obsah sušiny.

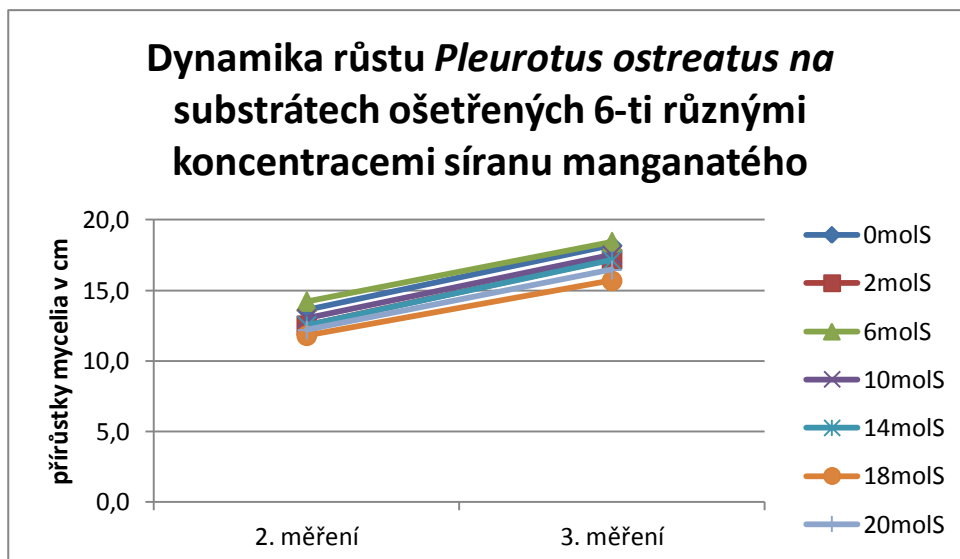
Číslo vzorku	0.	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Počet molů hypermanganu	0	2	6	10	14	18	20
Obsah sušiny v %	28,8	25,7	25,7	25,6	25,7	26,2	26,1

Tab. č. 6: Obsah sušiny v jednotlivých substrátech

5.2.2 Pokus č. 2 a č. 3: Vliv koncentrací manganistanu draselného a síranu manganatého na růst mycelia a rozklad organické hmoty houbou *Pleurotus ostreatus*

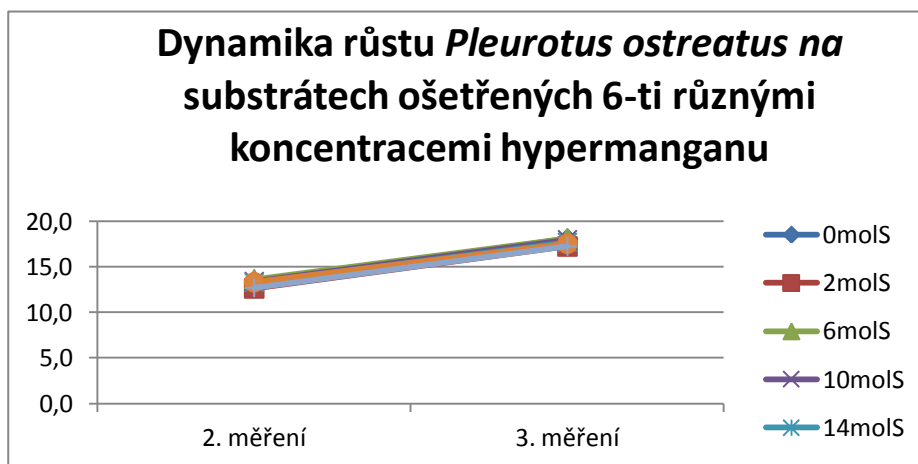
Pokus č.2 byl kontrolou pro pokus číslo 3. Přírůstky mycelia *Pleurotus ostreatus* jsme měřili po cca 14 a 21 dnech v letním období.

Graf ukazuje průměrné přírůstky mycelia po 14 a 21 dnech. Ošetření substrátu 6moly síranu manganatého mají nejlepší vliv na růst mycelia, kdy dynamika růstu je pozvolná. Nejpomalejší růst mycelia vykazuje substrát ošetřený 18moly, kdy přírůstky dosahují jen 16cm. V tomto pokusu nedošlo k vytvoření plodnic.



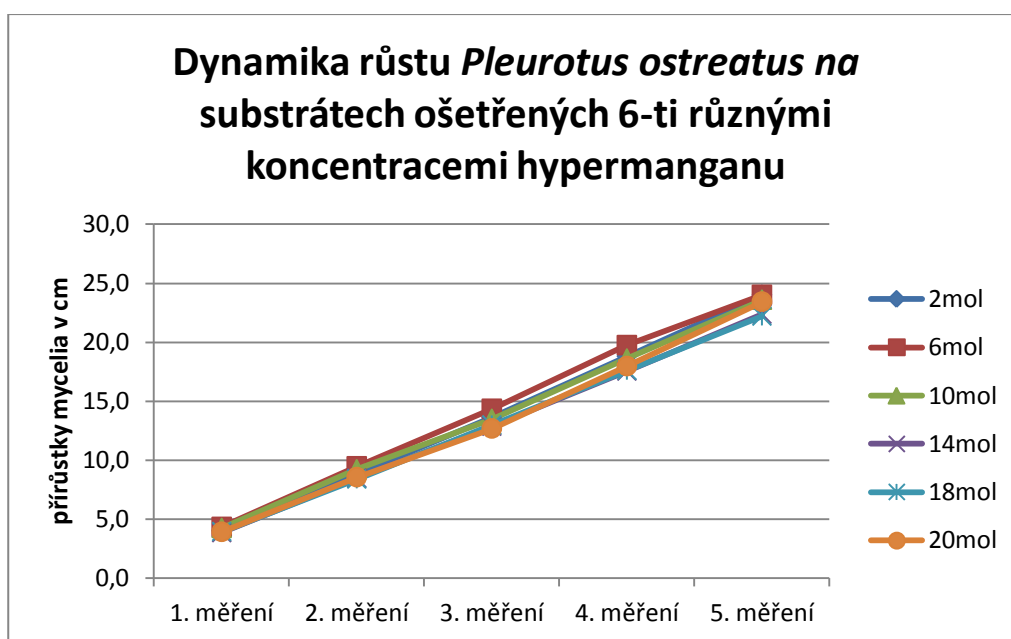
Graf.č. 7 : Vyjádření dynamiky růstu *Pleurotus ostreatus* na ošetřeném substrátu různou koncentrací síranu manganatého v pokusu č. 2.

Z grafu je patrná velmi podobná dynamika růstu mycelia při ošetření substrátu 6-ti různými koncentracemi. Mycelium *Pleurotus ostreatus* reaguje velmi podobně na všechny koncentrace hypermanganu oproti ošetření síranem manganatým. Růst je pozvolný a liší se jen o milimetry. U toho to pokusu došlo ke kontaminaci substrátu, výskytu zelené plísně u ošetření 10moly hypermanganu, kdy kontaminace neměla vliv na průměrný růst mycelia. U substrátu ošetřeného 14moly hypermanganu byl zaznamenán výskyt plodnic *Pleurotus ostreatus*.



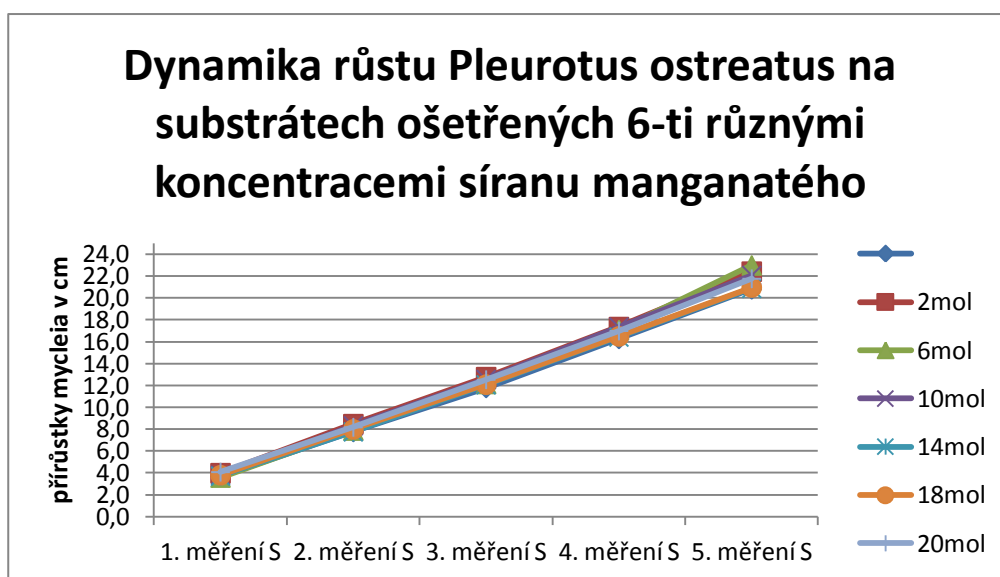
Graf.č. 8 : Vyjádření dynamiky růstu *Pleurotus ostreatus* na ošetřeném substrátu různou koncentrací hypermanganu v pokusu č. 2.

Z grafu č. je zřejmé že, mycelia *Pleurotus ostreatus* dosáhla nejlepšího růstu na substrátu ošetřeném 6moly hypermanganu. Ve druhé polovině prorůstání (po 21. dnech) se růst mycelia zvýšil, ale ke konci měření se růst zpomalil a vyrovnal s ostatními přírůstků. Mycelium na substrátu ošetřeném 20moly hypermanganu prorůstalo ze začátku velmi pomalu až při 4 měření (28 dnech) se aktivita růstu zrychlila a mycelium dosáhlo stejných průměrných přírůstků jako předešlé varianty. Na substrátu ošetřeném 18moly vykazovalo mycelium *Pleurotus ostreatus* ke konci nízké prorůstání než u ostatních variant i když na začátku prorůstání mycelia bylo velmi aktivní.



Graf č. 9: Vyjádření dynamiky růstu *Pleurotus ostreatus* na ošetřeném substrátu různou koncentrací hypermanganu v pokusu č. 3

Z grafu je zřejmé, že *Pleurotus ostreatus* vykazuje nejlepších výsledků na substrátu ošetřeném 6moly. I když na začátku růstu byla aktivita mycelia nejnižší, při 3 a 4měření (cca 21 - 28dní) aktivita růstu stoupá a na konci růstu je aktivita mycelia nejvyšší. Na rozdíl od substrátu ošetřeného 18 moly, 14 moly a kontrolní variantou, kdy na začátku měření mycelium aktivně prorůstalo a během růstu aktivitu ztrácelo, ke konci měření bylo prorůstání mycelia velmi pomalé.



Graf č. 10 : Vyjádření dynamiky růstu *Pleurotus ostreatus* na ošetřeném substrátu různou koncentrací síranu v pokusu č. 3

Stanovení obsahu sušiny

V tabulce je uvedeno množství sušiny ve vybraných vzorcích. Tyto vzorky byly odebrány ze substrátu ošetřeného síranem manganatým a hypermanganem. Obsah sušiny v obou variantách byl nižší než obsah sušiny u kontrolní varianty, kdy substrát obsahoval kolem 28% sušiny. Substráty ošetřené síranem manganatým nedosahovali ani ¼ obsahu sušiny v substrátu.

Číslo vybraného vzorku	Počet molů síranu manganatého	Obsah sušiny v %	Počet molů hypermanganu	Obsah sušiny v %
1.	18	21,6	18	25,6
2.	20	22,3	20	26,3
3.	0	27,6	0	28,2

Tab. č. 7: Obsah sušiny v jednotlivých substrátech

Stanovení hrubé vlákniny

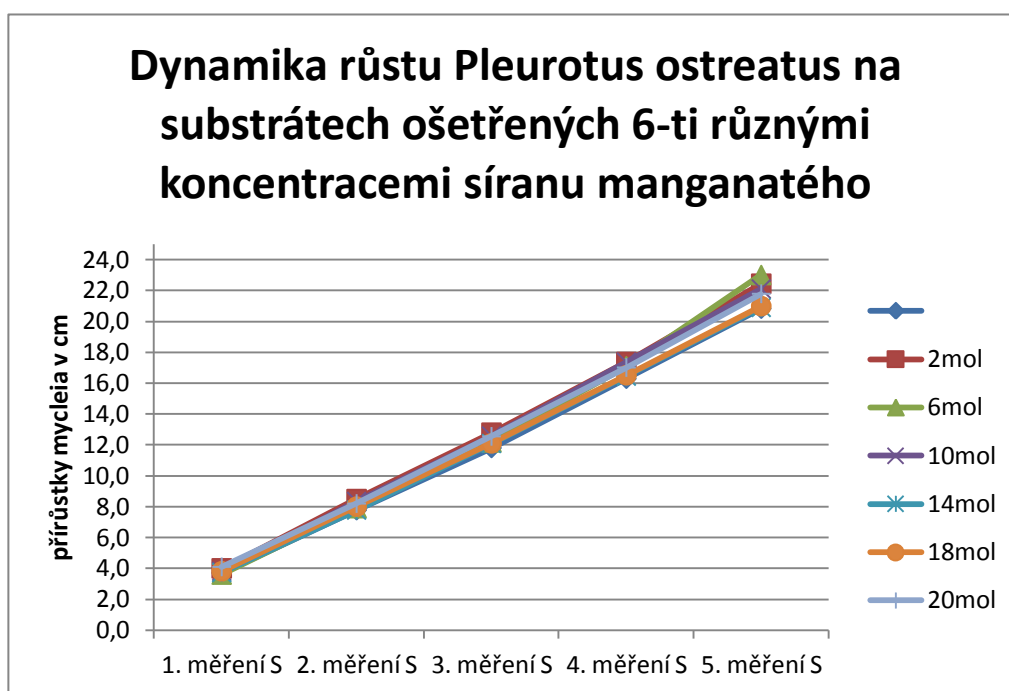
Tabulka znázorňuje obsah hrubé vlákniny v substrátu ošetřeném jednotlivými koncentracemi hypermanganu a síranu manganatého. Můžeme vidět, že nejvyšší obsah vlákniny je v substrátu kontrolní varianty. Obsah vlákniny v ošetřených substrátech byl velmi podobný. Nejnižší obsah vlákniny obsahoval substrát ošetřený 14moly obou látek.

Číslo vybraného vzorku	Počet molů síranu manganatého	Obsah vlákniny v %	Počet molů hypermanganu	Obsah vlákniny v %
1.	0	33,2	0	32,6
2.	2	31,3	2	31,4
3.	6	32,4	6	31,8
4.	10	32,2	10	31,4
5.	14	29,8	14	30,5
6.	18	31,8	18	31,6
7.	20	31,6	20	30,2

Tab. č. 8: Vyhodnocení hrubé vlákniny v substrátech s přidavkem hypermanganu a síranu manganatého

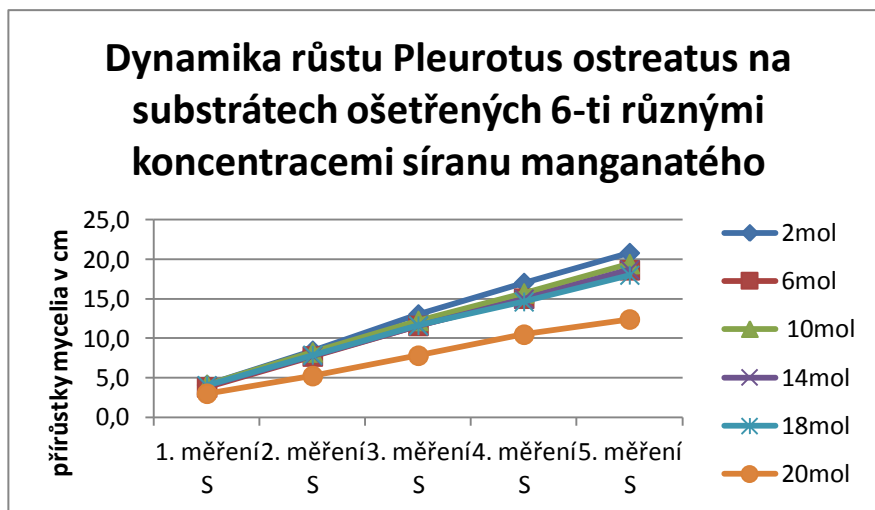
5.2.3 Pokus č. 4 a č. 5 : Vliv přídavku manganistanu draselného a síranu manganatého na růst mycelia a rozklad organické hmoty houbou *Pleurotus ostreatus*, použití sadby na MM médiu „Kirk“

Z grafu je zřejmé, že ošetření 2moly mělo špatný vliv na prorůstání mycelia, při této koncentraci mycelium prorůstalo velmi pomalu. Naopak výrazně lepší vliv na aktivitu mycelia mělo ošetření substrátu koncentrací 18moly. Podobných výsledků vykazovala mycelium na substrátu kontrolní varianty



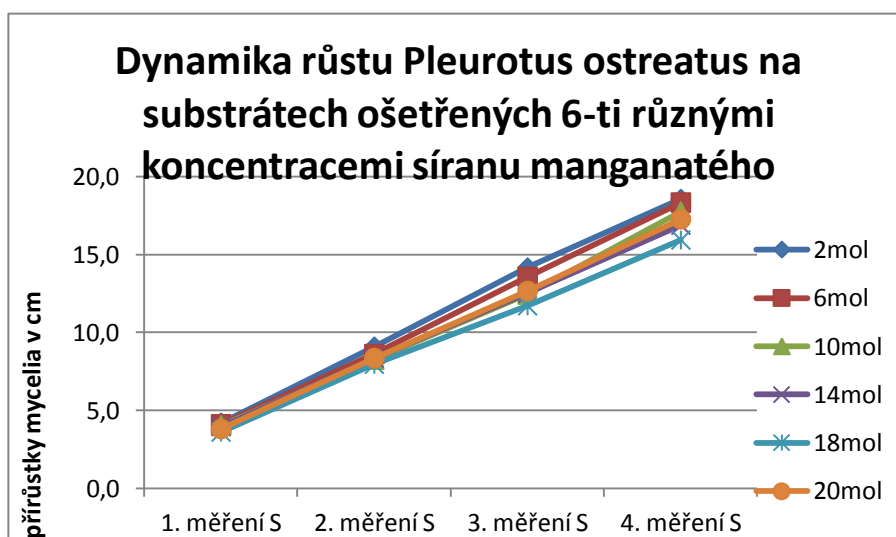
Graf.č. 11: Vyjádření dynamiky růstu *Pleurotus ostreatus* na ošetřeném substrátu různou koncentrací hypermanganu v pokusu č. 4

Z grafu č. je patrné, že *Pleurotus ostreatus* dosáhla nejlepšího růstu na substrátu ošetřeném 2moly síranu manganatého, kdy průběh prorůstání byl pozvolný. Substrát ošetřený 20 moly síranu manganatého naopak vykazoval velmi špatné podmínky pro aktivitu mycelia



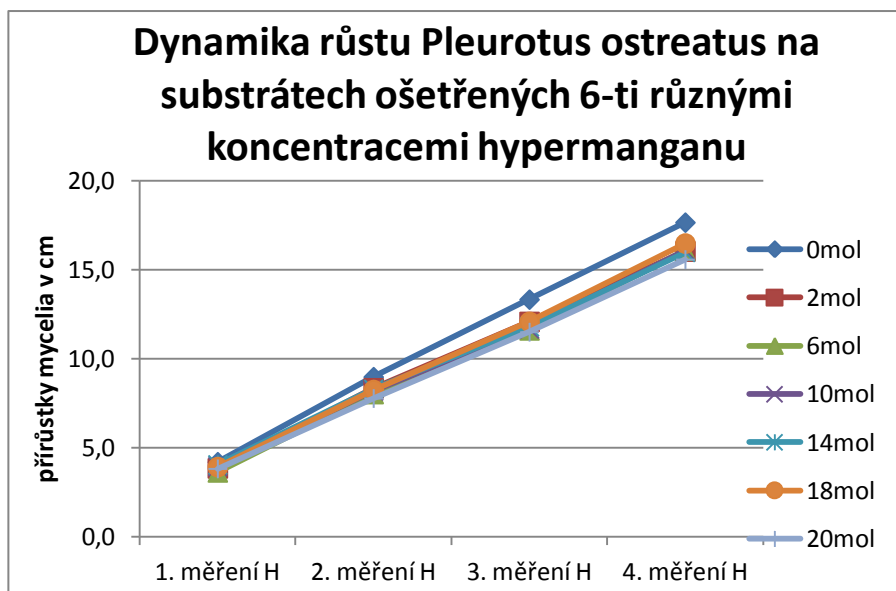
Graf.č. 12 : Vyjádření dynamiky růstu *Pleurotus ostreatus* na ošetřeném substrátu různou koncentrací síranu manganatého v pokusu č. 5.

Graf znázorňuje velmi strmý růst mycelia *Pleurotus ostreatus*. Po druhém měření je vidět rychlý nástup růstu mycelia u substrátu ošetřeného 2moly síranu manganatého, kde jsou dobré podmínky pro hlívu. Ošetření substrátu 6moly je také přínosem, ze začátku je růst pozvolný a při třetím měření aktivita stoupá, na konci měření je stejná jako u ošetření 2moly. Horší podmínky pro aktivitu hlívy je na substrátu ošetřeném 18moly, prorůstání je pomalejší.



Graf. č. 13 : Vyjádření dynamiky růstu *Pleurotus ostreatus* na ošetřeném substrátu různou koncentrací síranu manganatého v pokusu č. 5

Graf znázorňuje, že v tomto pokus je kontrolní varianta pro aktivity hlívy ideálním prostředím. Růst mycelia je pozvolný a vykazuje nejlepší výsledků. Ostatní varianty ošetřených substrátů jsou si svoji aktivitou velmi podobný. V těchto případech byly v podstatě stejné průměrné přírůstky



Graf.č. 14 : Vyjádření dynamiky růstu *Pleurotus ostreatus* na ošetřeném substrátu různou koncentrací hypermanganu v pokusu č. 5

Celkové shrnutí přírůstků mycelia hlívy ústřičné na substrátu ošetřeném hypermanganem a síranem manganatým.

Tvorba plodnic se nejčastěji vyskytovala u substrátů ošetřených hypermanganem oproti substrátu obohacenému síranem manganatým. Výskyt plodnic byl velmi rozdílný v různých koncentracích substrátů. Nejčastější výskyt plodnic byl na substrátech ošetřených 14moly, ale také na substrátech s koncentrací 2,6 moly a jednou kontrolní variantou. U síranu se plodnice vyskytly pouze jedinkrát a to na substrátu ošetřeném 6moly síranu manganatého. Nejlepší růst mycelia *Pleurotus ostreatus* byl na substrátech ošetřených 6 moly hypermanganu tak i síranu manganatého v několika pokusech. Dobré výsledky také vykazovaly substráty s ošetřením 2 moly v obou variantách. Celkově tedy nejlepší podmínky pro *Pleurotus ostreatus* tvoří substráty ošetřené 6moly obou přísad. V grafech viz příloha č. 3 – můžeme vidět porovnání růstu mycelia při ošetření hypermanganem a síranem manganatým.

5.3 Měření a stanovení aktivity lignolytických enzymů

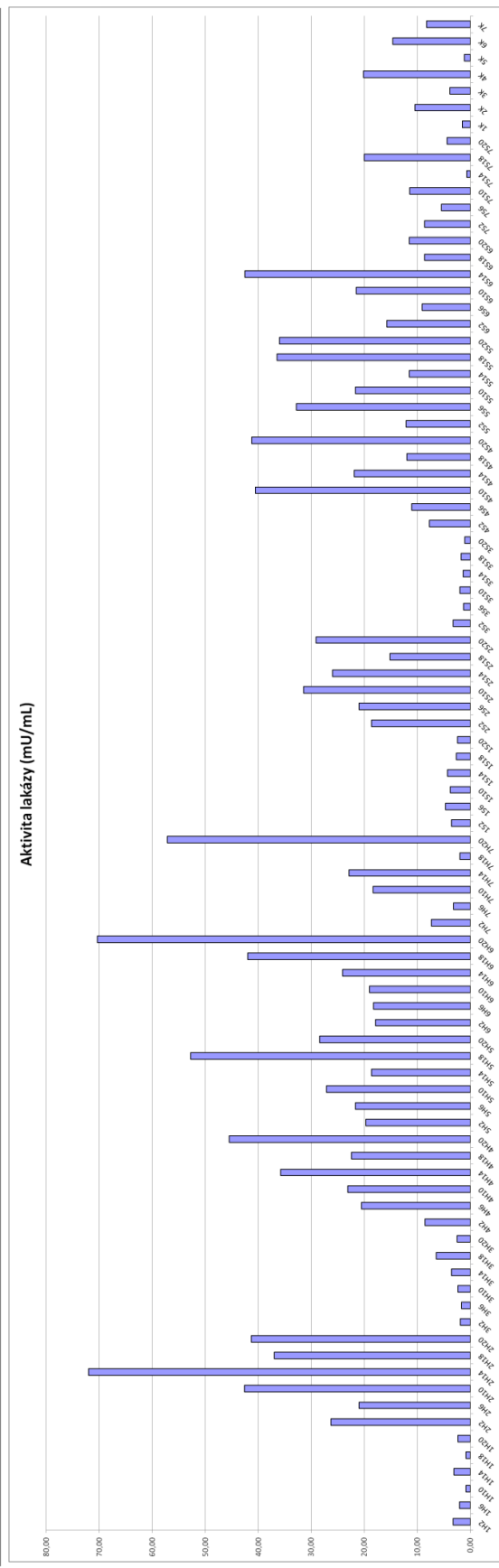
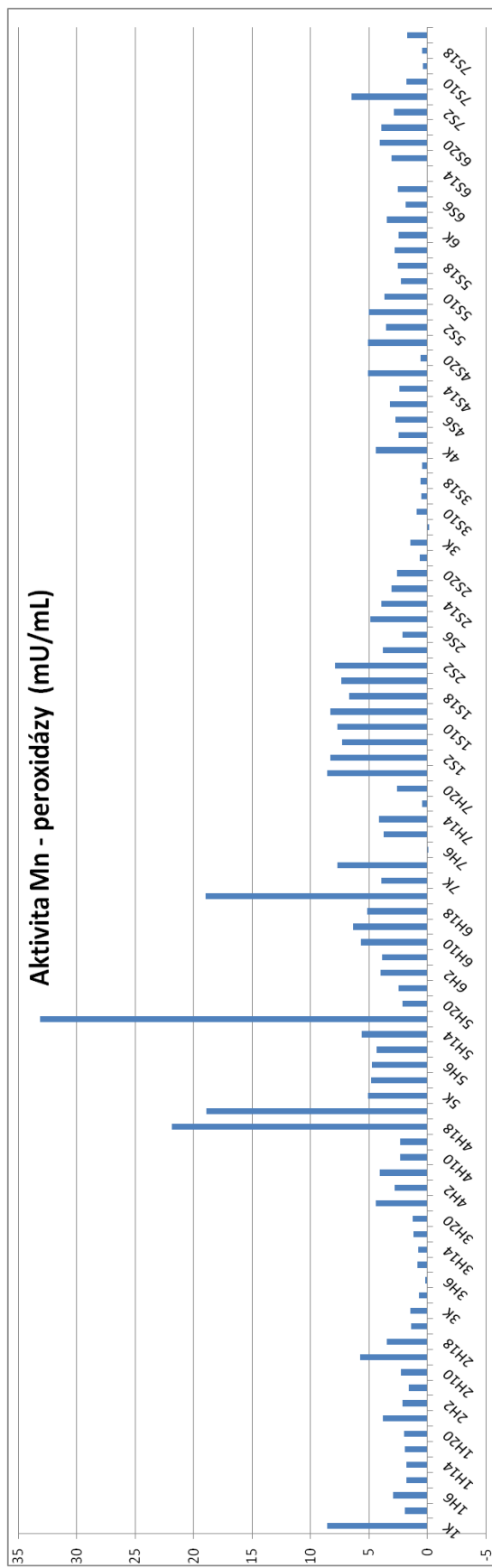
Vzorky pro první měření aktivity lakázy a Mn – peroxidázy měly být odebrány po ukončení prorůstání mycelia u pokusu č. 4. Zkumavky s kolonizovaným substrátem byly kontaminovány plísní z důvodu kontaminace substrátu při pipetování.

U pokusu č. 5 po ukončení prorůstání mycelia byly vzorky odebrány ze dvou míst, první odběr cca po 22 dnech a druhý odběr cca po 36 dnech od naočkování. Tyto vzorky byly vyluhovány a zpracovány podle metodiky a do doby stanovení lignolytických enzymů zmrazeny.

Z grafu č. 15 „Aktivita lakázy“ můžeme vidět, že aktivita byla vyšší u vzorků mladšího mycelia, které bylo odebráno po cca 22 dnech (vzorky z druhého odběru 7-12) ze substrátů ošetřené 2, 6, 10, 14, 18, 20 moly hypermanganem a síranem manganatým (20 – 26 odběr). Naopak velmi nízká aktivita byla změřena u starších vzorků odebraných po 36 dnech od očkování (odběr 1 – 6 a 13 – 19) obou variant.

Graf č. 16 znázorňuje aktivitu Mn – peroxidázy v substrátech. V grafu můžeme vidět, že aktivita Mn – peroxidázy byla mnohem nižší než aktivita lakázy. Mladší myceliu vykazovalo vyšší aktivitu Mn – peroxidázy v substrátu. U vzorků odebraných po 36 dnech ,tedy vzorky staršího mycelia vykazovaly menší aktivitu Mn – peroxidázy.

Graf č. 17 celkově porovnává aktivitu ligninolytických enzymů a růst mycelia *Pleurotus ostreatus*. V tomto grafu je porovnán růst mycelia z pokusu č.5. V porovnání aktivity lakázy s růstem přírůstků mycelia vykazovala aktivita lakázy nejlepších výsledků na substrátech ošetřených vyššími koncentracemi hypermanganu a síranu manganatého. Pro získání vysoké aktivity lakázy se nejvíce osvědčilo ošetření substrátu koncentracemi 14, 18 a 20moly. Celkově nízká aktivita lakázy byla zaznamenána u 1. a 3. termínu měření přírůstků. V 7 termínu měření byla nízká aktivita lakázy jen u některých koncentrací. V porovnání v ošetření substrátu byla aktivita lakázy vyšší u ošetření substrátu hypermanganem. U aktivity Mn - peroxidázy je to podobné, kdy v porovnání s růstem přírůstků mycelia je aktivita vyšší u substrátů ošetřených vyššími koncentracemi síranu manganatého a hypermanganu. Nejvyšší aktivita byla zaznamenána u ošetření hypermanganem koncentrací 18 a 20moly čtvrtého, 18moly pátého a 20moly šestého termínu měření.



6 Diskuze

Rychlost růstu mycelia *Pleurotus ostreatus* byla průkazně ovlivněna ošetřením substrátu ze slaměných pelet různými koncentracemi hypermanganu a různými koncentracemi síranu manganatého. Z výsledků je patrné, že mycelium *Pleurotus ostreatus* prorůstalo nejrychleji na substrátech ošetřených 6moly hypermanganu a 6moly síranu manganatého. Tato koncentrace měla velmi dobrý vliv i na výskyt plodnic podobně jako u kontrolní varianty v 1. pokusu, kdy došlo k výskytu plodnic u několika zkumavek. Velmi podobné výsledky vykazovalo mycelium i na substrátu ošetřeném 2moly hypermanganu. U síranu manganatého měla koncentrace 2moly jen slabší výsledky. Celkově z toho vyplývá, že na substrátu ošetřeném pouze vodou byl růst mycelia *Pleurotus ostreatus* pomalejší. V některých případech nedošlo ani k úplnému prorůstání mycelia zkumavkou. Podobné vlastnosti vykazoval i substrát ošetřený 18 a 20 moly hypermanganu, i 18 a 20moly síranu manganatého. Na těchto substrátech mělo mycelium pomalý růstu. Podobně Van Nevel (2012) zkoušel testovat *Pleurotus ostreatus* na potřebu minerálních látek a zjistil, že produkce hlívy je vyšší na substrátech obohacených vyšší koncentrací manganu. Tyto údaje byly dále testovány v sérii tří různých dávek síranu manganatého (170, 255 a 340g/ t substrátu), poté tyto údaje byly porovnány, zda byl získán vyšší výnos v porovnání s kontrolním substrátem. Pozitivní vliv byl zpětně vidět z prvního týdne sklizně s návratností + 21,7%, 28,8% a 35,5% ve srovnání s kontrolní variantou.

Nevelovy průměrné výnosy ukazují pozitivní vliv přídavků síranu manganatého, ale pokud jsou zkoumány jednotlivé zkoušky, účinek dávek nebyl tak jasný. Za účelem prozkoumání vlivu 3sérií síranu manganatého při dávkách 170, 255 a 340 g/ t plodícího substrátu, byly dávky testovány na dvou různých kmenech (Sylvan HK 35 a K12). Výsledky této studie vykazovaly, že přidáním síranu manganatého je výtěžnost vyšší. Avšak mezi dávkami nebyl významný rozdíl. Vyšší výtěžnost byla u dávek 170, 255 a 340g /t u kmene HK35, respektive s návratností + 20%, 17% a 18% ve srovnání s kontrolou. U kmene K12 byly vyšší výnosy v tomto pořadí + 20, 17 19% ve srovnání s kontrolou. K podobným výsledkům jsme došli i v našem pokusu, kdy bylo použito stejného kmene H35 a přidání 6 a 2 molů síranu manganatého mělo velmi dobrý vliv na kolonizaci substrátu oproti kontrolní variantě.

Eichlerová a kol. (2000) kultivovala třináct basidiomycet - odvozené izoláty hlívy ústříčné Florida (f6) kmene, lišící se v úrovni produkce enzymu ligninolytických a dalších charakteristik (míra rozšíření podhoubí, morfologie kolonií) od rodičovského kmene, pěstovány na přírodních substrátech. Za těchto podmínek byly studovány ligninolytické enzymové aktivity, úbytek organické hmoty, rozklad polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) a kolonizace na sterilní a nesterilní půdě. Aktivita ligninolytických enzymů byla podstatně vyšší u slámy než v tekuté kultuře, ačkoli byly mezi izoláty méně výrazné rozdíly. Některý z izolátů ukázal velmi dobrou schopnost rozkládat lignocelulóзовé substráty (sláma) a relativně vysoké ztráty organické hmoty byl zjištěny po 50 dnech kultivace u těchto kmenů. Původní kmen f6 a izoláty B13 a B26 úspěšně rozložily všech sedm testovaných PAH sloučenin přítomných v experimentálních půdních vzorcích. Vyšší nebo nižší produkce ligninolytických enzymů testovaných izolátů neměla žádný nebo podstatný vliv na rozsah rozkladu organické hmoty. V tomto pokusu, bylo nalezeno šest basidiomycet dobře rostoucích v nesterilní půdě a vhodných pro budoucí biotechnologické využití. K podobným výsledkům došel i Hernández (2003) při pěstování hlívy na nesterilním substrátu složeném ze směsi 70% trávy, 20% kávových vláken a 2 % Ca (OH)₂ v bednách. Kdy zjistili, že je možné pěstovat *P. ostreatus* na lignocelulóзовé, nekompostované, nepasterované půdě s počáteční pH 8,7 a že kompostování po dobu dvou až tří dnů zvyšuje biologickou účinnost.

Chiu, Chan (2012) studoval do jaké míry a jak ovlivní mangan, vápník a kadmium výnos plodnic u *Pleurotus pulmonarium*, druh hlívy ústříčné, V této studii použili běžné pěstitelské postupy a zkoumali účinky kadmia (potencionální kontaminující látky z průmyslových zdrojů), vápníku (látky, která se nachází v houbovém kompostu) a mangan (látky, která byla prohlašována, že zlepšuje výnosy *Pleurotus ostreatus*). Všechny tři kovové soli neovlivnily sporulaci. Vápník přidání chloridu zkrátil čas potřebný pro houby, aby plně kolonizovaly kompost a zajistily lepší výnos. Nerozpustné soli vápníku ve vyšších koncentracích měly podobný i když méně výrazný účinek. Vápník je žádoucí pro pěstování hlívy ústříčné, ale není nezbytný, protože sláma pro pěstební substrát je sama o sobě schopna poskytnout potřebné minerály. Ionty kadmia snížily výnos plodnic o 50%.

Chloridy manganu způsobily zpožděný růst mycelia hlívy a snížily výnos plodnic, ale zvýšil celkový obsah aminokyselin v třeni. Zatímco síran manganatý nijak výrazně nezvýšil obsah manganu v plodnicích. V naší práci bylo zjištěno, že střední dávky hypermanganu měli dobrý vliv na výskyt plodnic u dvou pokusů. U substrátů s nižšími koncentracemi síranu manganatého byl vliv manganu slabší a plodnice se vyskytovaly jen zřídka.

Celá řada prací se zmiňuje o obohacování substrátů pro pěstované houby za účelem zvýšení obsahu zdraví prospěšných látek (selen D vitamin). Tak na př. Stajic a kol (2006). Se zabývali nejvhodnější zdrojem selenu pro obohacování. Pokus prováděli na hlívě ústřičné. Cílem jejich výzkumu bylo prozkoumat účinky tří zdrojů selenu, které byly v různých koncentracích přidány do médií, ze kterých je vstřebávala mycelia. Selen byl použit ve formě seleničitanu sodného, selenanu sodného a oxidu selenatého v následujících koncentracích: 0.3mg/l, 0.7mg/l, 1mg/l a 1.3mg/l. Na základě schopnosti absorpce a retence *Se* myceliem, se jako dobré zdroje *Se* prosadily Na_2SeO_3 a SeO_2 , které byly nejlépe vstřebány do plodnic hub. Při koncentraci 1,3 mg/l v substrátu byl obsah selenu v plodnicích 530 $\mu\text{g/g}$. Na_2SeO_4 se ukázal jako méně vhodný zdroj.. Remešová (2008) zkoušela podobný pokus, i na žampionech. Pro pokus použila 99% seleničitan sodný pentahydrát (. Pro pokus použila 15 mg $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 30 mg $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. A zjistila, že množství selenu v plodnicích stoupá s množstvím přidaného seleničitanu..

Feeney (2008) uvádí, že složení živin a biologicky aktivní látky se mohou značně lišit z důvodu rozdílů druhů hub, substrátu nebo pěstebního substrátu, vývojové fáze a věku houby. Obsah živin v čerstvých houbách souvisí s obsahem vlhkosti, která je závislá na podmínkách během pěstování. Většina hub produkuje ergosterol, prekurzor vitamínu D, vlivem slunečního nebo ultrafialového záření. USDA Databáze živin pro standard referenční číslo 16 list 76 IU, uvádí obsah vitamínu D na 100g žampionů. Jiní ve svých studiích uvádějí, že v houbách byla prokázána úplná nebo částečná absence vit. D. Žampion byl označen za nejlepší zdroj vit D.

Baldrián (2006) uvádí, že aktivita lakázy a Mn-dependentní peroxidázy byla prokázána u různých druhů hub. Existuje mnoho taxonomických nebo fyziologických skupin hub, které obvykle neprodukují významné množství těchto enzymů nebo je produkuje jen několik druhů.

Produkce lakázy nebyla nikdy prokázána u nižších hub, jako jsou *Zygomycetes* a *Chytridiomycetes*. Existuje mnoho záznamů, že je lakáza a Mn peroxidáza produkována saprotrofními houbami z třídy *Basidiomycetes*, tzn. houbami bílé hniloby, které způsobují degradaci ligninu. U *Pleurotus ostreatus* byla zjištěna produkce enzymů pouze intracelulární. Podstatnou část aktivity lakázy a Mn peroxidázy v *P. ostreatus* vykazuje buněčná stěna, zatímco v jiné houbě třídy *Basidiomycetes*, například *Agricorus bisporus*, nebyla činnost těchto enzymů v buněčné stěně nalezena.

Měřením aktivity lignolytických enzymů v našem pokusu, bylo zjištěno, že aktivita lakázy vykazovala nejlepších výsledků na substrátech ošetřených vyššími koncentracemi hypermanganu a síranu manganatého. Pro získání vyšší aktivity lakázy se osvědčilo ošetření substrátu 14, 18 a 20 moly. Celkově nízká aktivita lakázy byla zaznamenána u 1. a 3. termínu měření přírůstků. V 7. termínu měření byla nízká aktivita lakázy jen u některých koncentrací. V porovnání v ošetření substrátu byla aktivita lakázy vyšší u ošetření substrátu hypermanganem. U aktivity Mn - peroxidázy je to podobné, kdy v porovnání s růstem přírůstků mycelia je aktivita vyšší u substrátů ošetřených vyššími koncentracemi síranu manganatého a hypermanganu. Nejvyšší aktivita byla zaznamenána u ošetření hypermanganem koncentrací 18 a 20 moly čtvrtého, 18 moly pátého a 20 moly šestého termínu měření.

Dále Baldrián (2006) uvádí, že v prvních dnech kultivace substrátu byla aktivita lakázy vyšší, kolem 80 – 100%, v průběhu kultivace se aktivita snížila až na 30%. Předpokladem bylo, že hlavním zdrojem variability je nezávislý vývoj enzymatické aktivity na jednotlivých kulturách. Z vypracovaných grafů měření aktivity ligninolytických enzymů v našich pokusech bylo zjištěno, že aktivita lakázy je vyšší u staršího mycelia odebraného po 22 dnech očkování a mladší mycelium vykazovalo a dost nižší aktivitu lakázy, toto potvrzuje o Baldrián (2006), že aktivita lakázy a Mn peroxidázy je dána stářím mycelia, vlhkostí substrátu a dostatkem kyslíku. Také se ukázalo, že kultury s vyšší aktivitou lakázy vykazují vysokou produkci druhého lignolytického enzymu Mn – dependentní peroxidázu. Variabilita aktivity ligninolytických enzymů může být způsobena různými zdroji inokula.

Podobně uvádí Rühl et. al.,(2008), kdy prováděli pokus kultivace *Pleurotus ostreatus* u kmenů 030 a K12 na pšeničné slámě v průmyslových podmínkách. Lignolytická aktivita byla sledována v průběhu pěstebního období, během kultivace mycelia. V této práci došli k výsledkům, že lakáza, mangan peroxidáza (MnP) a univerzální (mangan - nezávislý) peroxidáza vykazovali vysokou aktivitu ve vegetativní fázi růstu mycelia a pokles aktivity těchto enzymů začal po zahájení tvorby plodnic. Přímou po sklizni ve všech pozorovaných vlnách, došlo k prudkému nárůstu všech tří enzymatických aktivit v substrátu pro oba kmeny (maximální aktivity pro lakázou 1/1-03/1 U / ml, pro MNP 15 - 16 U / ml a pro VP 01/01-4/01 U / ml).

Podle našich výsledků hodnota pH kolonizovaného substrátu myceliem *Pleurotus ostreatus* a ošetřeného pouze vodou měla 5,2. Hodnoty pH ošetřeného substrátu byly podstatně vyšší v rozmezí pH 6,9 – 7,4. Podle Jablonského a Šaška (2006) se optimální hodnoty pH pro růst podhoubí pohybují v rozmezí 5,5 – 6,5 a během kolonizace substrátu se hodnoty pH mění. Jiné hodnoty pH má substrát ve vnitřních vrstvách a podstatně nižší hodnoty pH má

substrát na povrchu. Což potvrzuje, že měření aktivity lakázy v našem pokusu bylo úspěšnější u mladšího mycelia, prorostlé na těsně pod povrchem, kde je nižší pH. Podobně uvádí Souza a Peralta (2003), že lakáza vykazuje optimální aktivitu při pH 4,0 a 5,5.

7 Závěr

Bylo prokázáno, že výrazný vliv na rychlost prorůstání mycelia *Pleurotus ostreatus* měl přídavek 6molů hypermanganu a 6molů síranu manganatého do substrátu ze slaměných pelet. Podobných výsledků bylo dosaženo na substrátu ošetřeném 2moly hypermanganu.

U substrátu ošetřeného pouze destilovanou vodou byla rychlost růstu mycelia nízká. Snížené přírůstky mycelia *Pleurotus ostreatus* byly zaznamenány na substrátech ošetřených 18 a 20moly hypermanganu, i síranu manganatého.

Stanovením aktivity ligninolytických enzymů, lakázy a dependentní Mn - peroxidázy bylo zjištěno, že na začátku prorůstání mělo mycelium, odebrané cca po 22 dnech od naočkování vyšší aktivitu lakázy než mycelium, které bylo odebráno cca po 36 dnech od naočkování. V porovnání aktivity lakázy na substrátech ošetřených hypermanganem a síranem managanatým bylo zřejmé, že aktivita lakázy byla vyšší u vzorků odebraných na substrátech ošetřených hypermanganem.

8 Seznam literatury

- Baldrián, P. 2006. Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, volume 30, issue 2, p. 215 – 242
- Baldrián, P. 2008. Enzymes of Saprotrophic Basidiomycetes. *British Mycological Society Symposia Series*, volume 28, Edited by Lynne Boddy, Juliet C. Frankland and Pieter van West, p. 19 – 41, ISBN: 978-0-12-374185-1
- Baldrián, P., Gabriel, J. 2003. Lignocellulose degradation by *Pleurotus ostreatus* in the presence of cadmium. *FEMS Microbiology letters*, 220(2), 235-240
- Baldrián, P., Valášková, V., Merhautová, V., Gabriel, J. 2005. Degradation of lignocellulose by *Pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc. *Research in Microbiology*, volume 156, issue 5 – 6, p. 670 – 676
- Bencko, V., Cikrt, M., Lener, J. 1995. *Kovy v životním a pracovním prostředí člověka*. Grada - Avicenum Praha, 288s
- Bram, V. N. 2012. Influence of Manganese Sulfate on the Yield of *Pleurotus* in Abstracts of the 18th congress of the international society for mushroom science, Beijing
- De Souza, C. G. M., Peralta, R. M. Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium. *Journal of basic microbiology*, 2003, 43.4: 278-286.
- Eichlerová, I., Homolka, L., Baldrian, P., Gabriel, J. 2000. Screening of *Pleurotus ostreatus* isolates for their ligninolytic properties during cultivation on natural substrates. *Biodegradation*, 11(5), 279-287.
- Feeney, M. J. 2008. Nutrition research – the Future Begins Now. Volume 7, P1
- Ginterová, A. 1985. *Pestujeme huby*. Příroda, Bratislava, 208s. ISBN: 80-07-00517-X
- Ginterová, A. 1992. *Pestovanie hub*. Příroda, Bratislava, 213s. ISBN: 80-07-00517-X
- Hawksworth, D. 2001 in Halpern, G. M. 2007. *Healing mushrooms*. Square one publisher. Inc.

- Hejnák a kol. 2007. Fyziologie, Praha, CZU Praha, ISBN: 978-80-213-1667-6 Hofrichter, Martin. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial technology*, 2002, 30.4: 454-466.
- Horák, V., Stazsková, L. 2009. Biochemie. CZU Praha, FAPPZ, ISBN: 978-80-213-0980-7
- Hrouda, P. 2001. Pleurotoid fungi of the family Polyporaceae in the Czech republic and Slovakia. *Czech Mycology*, Praha, Česká vědecká společnost pro mykologii, 0009-0476
- Chang, S. T., Miles, P. G. 1989. Edible mushroom and their cultivation. 345pp. ISBN: 0-8493-6758-X
- Chang, S.T. 2013. Modern Views on Edible and Medicinal Mushroom Biotechnology and Impact on Global Human Welfare with Special Attention on China s.3-16. In: Proc. of the 17th Internat. Medicinal Mushroom Conference, Beijing,.
- Chiu, S. W., Chan, Y. H. Cadmium and manganese in contrast to calcium reduce yield and nutritional values of the edible mushroom *Pleurotus pulmonarius*. *Mycological Research*, 1998, 102.4: 449-457.
- Jablonský, I., Šašek, V. 2006. Jedlé a léčivé houby, pěstování a využití. Brázda, Praha, 264s + 16 přílohy, ISBN: 80-209-0341-0
- Jablonský, Ivan. 2013, nepublikováno. Osobní sdělení.
- Kalina, T., Váňa, J. 2005. Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. Karolinum, Praha, 606s. ISBN: 978-80-246-1036-8
- Kinc, M., Krpeš, V. 2000. Základy fyziologie rostlin. Montanex a.s. ISBN: 80-7225-041-8
- Kirk, T. K., Farrell, R. L. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annual Reviews in Microbiology*. 1987, 41(1), 465-501.
- Kleman - Leyer, Karen, et al. Changes in molecular size distribution of cellulose during attack by white rot and brown rot fungi. *Applied and environmental microbiology*, 1992, 58.4: 1266-1270.
- Kolářková, M. 1999. Enzymy ligninolytického systému hub. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Biologická fakulta, 31s.

- Kolařík, J. a spol. 2005. Péče o dřeviny rostoucí mimo les II., Vlašim, 710s. ISBN: 80-86327-44-2
- Martens, R.; Zdražil, F. Screening of white-rot fungi for their ability to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Folia microbiologica*, 1998, 43.1: 97-103.
- Mayer, A. M., Staples, R. C. 2002. Laccase: new function for an old enzyme. *Phytochemistry*. Volume 60, Issue 6, p. 551 – 565
- Musil, J., Nováková, O. 1990. *Biochemie v obrazech a schémata*. Avicenum, Praha, 396s. ISBN: 80-109-89
- Niladevi, K. H. 2009. *Ligninolytic Enzymes*. Pp397 – 414, ISBN: 978-1-4020-9941-0
- Remešová, M. 2008. Vliv obohacení žampionového substrátu seleničitanem sodným na obsah selenu v plodnicích hub. Bakalářská práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. FAPPZ, Katedra zahradnictví a krajinářské architektury, s59
- Rosypal, S. 1998. *Přehled biologie*. Scientia, Praha, ISBN: 80-7183-110-7
- Rühl, M., Fischer, Ch., Kües, U. Ligninolytic enzyme activities alternate with mushroom production during industrial cultivation of *Pleurotus ostreatus* on wheatstraw-based substrate. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 2008, 2.4: 478-492.
- Stajic, M. Brceski, I. Wasser, S. P. Nevo, E. Screening of selenium absorption ability of mycelia of selected *Pleurotus* species. *Agrofood industry hi tech*. 2006, roč. 17, č. 3. ISSN 1120-6012
- Stamets, P. 2000. *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*. Ten speed Press, California, 574 p. ISBN: 0-89815-608-4
- Strmisková, G., Strmiska, F., Dubravický, J. 1992. Mineral composition of oyster mushrooms. *Volume 36, Issue 2*. p 218 – 212
- Valíček, P. 2011. *Houby a jejich léčivé účinky*. Start, 190s. ISBN: 978-80-86231-54-9
- Vaněk, V. a kol. 2007. *Výživa polních a zahradních plodin*. Profi Press, s.r.o. Praha, ISBN: 976-80-86726-250

Internetové zdroje monografie

Kuo, M. 2005. Pleurotus ostreatus: The Oyster Mushroom. MushroomExpert.com [online] [cit. 2013-10-07] Dostupné z: <http://www.mushroomexpert.com/pleurotus_ostreatus.html>

About lignin. Ili-lignin.com [online] [cit. 2013-9-20] Dostupné z: <http://www.ili-lignin.com/aboutlignin.php>

AMA Drug Evaluations Annual. Manganese In: pubchem.net [online] [cit. 2013-12-9] Dostupné z: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=23930&loc=ec_rcs] >

Andrt Tomáš, Mangan In: Celostní medicína [online] 2011.12-1. [cit. 2013-12-8] Dostupné z: <<http://www.celostnimedicina.cz/mangan.htm> >

Breene, W. 1990. Nutritional and medicinal value of speciality mushrooms. Journal of Food Production, [online] 53, 883-894. [cit. 2013-12-04] Dostupné z: <http://www.academia.edu/305933/Medicinal_Mushrooms_Their_therapeutic_properties_and_current_medical_usage_with_special_emphasis_on_cancer_treatments>

Contreras, E. P., Sokolov, M., Mejía, G., Sánchez, J. E. 2004. Soaking of substrate in alkalit water as a pretreatment for the cultivation of Pleurotus ostreatus. Journal of horticulture science and biotechnologi [online] 79 (2), 234 - 240 [cit. 2014-02-18] Dostupné z: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852403001184>>

Enzymy. Gymbos.cz [online] [cit. 2013-12-18] Dostupné z: <<http://www.gymbos.cz/kabinety/chemie/enzymy.pdf>>

Hernández, Daniel; Sánchez, José E.; Yamasaki, Keiko. A simple procedure for preparing substrate for *Pleurotus ostreatus* cultivation. Bioresource technology [online] 2003, 90.2: 145-150 [cit. 2014-02-15] Dostupné z: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852403001184>>

Informace o kvasnicích. Pivovarské kvasnice [online] [cit. 2014-2-15] Dostupné z: <<http://pivovarske-kvasnice.cz>>

Jong, S.Ch., Donovan, R. 1989. Antitumor and Antiviral Substances from fungi. Advances in Applied Microbiology, [online] 34: 183-262. [cit. 2013-11-24] Dostupné z: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065216408703198>>

Luz, J. M. R. D., Nunes, M. D., Paes, S. A., Torres, D. P., Silva, M. D. C. S. D., Kasuya, M. C. M. 2012. Lignocellulolytic enzyme production of *Pleurotus ostreatus* growth in agroindustrial wastes. *Brazilian Journal of Microbiology*, [online] 43(4), 1508-1515. [cit.2013-12-29] Dostupné z < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822012000400035&script=sci_arttext >

Piontek, K., Smith, AT., Blodig, W. 2001. Lignin peroxidase structure and function. [online] [cit. 2013-9-20] Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11356137>

Pořízek, R., Dorňáková, V., Svorová, J. 2012. Dekolorizace barviv imobilizovanými kulturami ligninolýtických hub. [online][cit.2014-2-26] Dostupné z <konference.osu.cz/svk/sbornik2012/pdf/budoucnost/porizka.pdf >

Richter, R.. Živinný režim půd. Mn v půdě. Ústav agrochemie a výživy rostlin, MZLU v Brně [online].2007 [cit. 2014-1-18] Dostupné z: <http://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/vyziva_rostlin/html/agrochemie_pudy/puda_mn.htm>

Slaměné pelety. Varmeco.cz [online].[cit.2013-11-07] Dostupné z: <<http://www.varmeco.cz/proc-pelety.html> >

Stupavský, V. 2010. Pelety z biomasy - dřevěné, rostlinné, kůrové pelety. In: *Biom.cz* [online].2010-01-01 [cit. 2013-01-07]. Dostupné z WWW: < <http://biom.cz/cz/odborne-clanky/pelety-z-biomasy-drevene-rostlinne-kurove-pelety> >. ISSN: 1801-2655.

Wasser, S. P., Weis, A. L. 1999. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Critical Reviews™ in Immunology*, 19(1). [online] [cit. 2014-01-18] Dostupné z: < <http://www.dl.begellhouse.com/journals/2ff21abf44b19838,174d87735d78cb97,503729f455f5b84d.html> >

Wesenberg, Dirk; Kyriakides, Irene; Agathos, Spiros N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances* [online] 2003, 22.1: 161-187. [cit. 2013-9-20] Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14623049> >

Zdroj obrázkové dokumentace

Obrázek č. 1: Schéma ligninu a jeho běžných vazeb[online] [cit.2013-11-16] Dostupné z: <Zdroj:[<http://www.rsc.org/chemistryworld/2013/10/model-lignin-oligomers-biofuel>]>

Obrázek č. 2: Schéma rozkladu lignocelulózy pomocí lignolitických enzymů houbovým myceliem. Dostupné z < Jablonský Ivan >

Obrázek č. 3 a 4: Katalytický cyklus mangan dependentní peroxidázy. [online] [cit. 2013-11-16] Dostupné z < [<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022901005282>]>

Obrázek č. 5: Schéma Lignin peroxidázy. Dostupné z < Jablonský, Ivan >

Zdroj fotodokumentace

Obrázek č. 1: *Pleurotus ostreatus* (hlíva ústříčná) Dostupné z < vlastní zpracování >

Obrázek č. 2: Příklad prorůstání *Pleurotus ostreatus* v blocích v pěstírnách. Dostupné z < vlastní zpracování >

Obrázek č. 3: Označení zkumavek jednotlivých variant. Dostupné z < vlastní zpracování >

Obrázek č. 4: Naočkovaný substrát zrnitou sadbou. Dostupné z < vlastní zpracování >

Obrázek č. 5 - 6: Průběh prorůstání substrátu myceliem u jednotlivých pokusů. Dostupné z < vlastní zpracování >

Obrázek č. 7: Prorostlý substrát myceliem celou zkumavkou. Dostupné z < autor Jablonský I.>

Obrázek č. 8: Zkumavky s výskytem plodnic *Pleurotus ostreatus*, Dostupné z < autor Jablonský I.>

Obrázek č. 9: Vzorky k měření enzymatické aktivity. Dostupné z < vlastní zpracování >

Obrázek č. 10: Použité chemikálie – pufrý. Dostupné z < vlastní zpracování >

Obrázek č. 11 a 12: Příklady mikrotitračních destiček se zabarvením vzorků při měření enzymatické aktivity lakázy. Dostupné z < vlastní zpracování >

Obrázek č. 13 a 14: Příklady mikrotitračních destiček se zabarvením vzorků při měření enzymatické aktivity Mn – dependentní peroxidázy. Dostupné z < vlastní zpracování >

Obrázek č. 15 a 16: Baňky s Kirkovo mediem a se shluky mycelia *Pleurotus ostreatus*. Dostupné z < vlastní zpracování >

Obrázek č. 17: Rozrušení shluků mycelia pomocí laboratorního mixéru a aplikace pomocí jednonálové pipety na substrát. Dostupné z < vlastní zpracování >

Obrázek č. 1: Povrchově kultivované mycelium. Dostupné z < autor Jablonský I. >

9 Přílohy

9.1 Příloha č. 1: Fotodokumentace



Obrázek č. 1: *Pleurotus ostreatus* (hlíva ústříčná)

Obrázek č. 2: Příklad prorůstání *Pleurotus ostreatus* v blocích v pěstírnách



Obrázek č. 3: Označení zkumavek jednotlivých variant

Obrázek č. 4: Naočkovaný substrát zrnitou sadbou

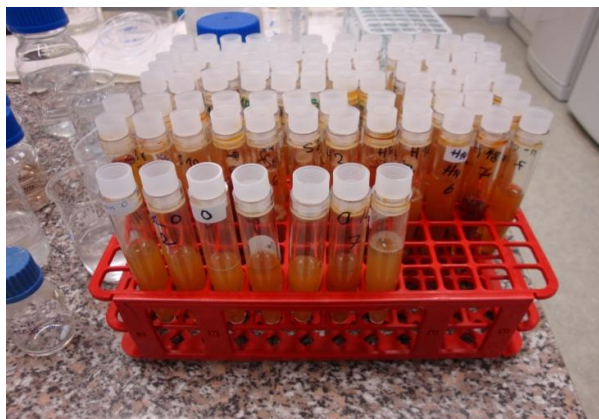


Obrázek č. 5 a 6: Průběh prorůstání substrátu myceliem u jednotlivých pokusů



Obrázek č. 7: Prorostlý substrát myceliem celou zkumavkou.

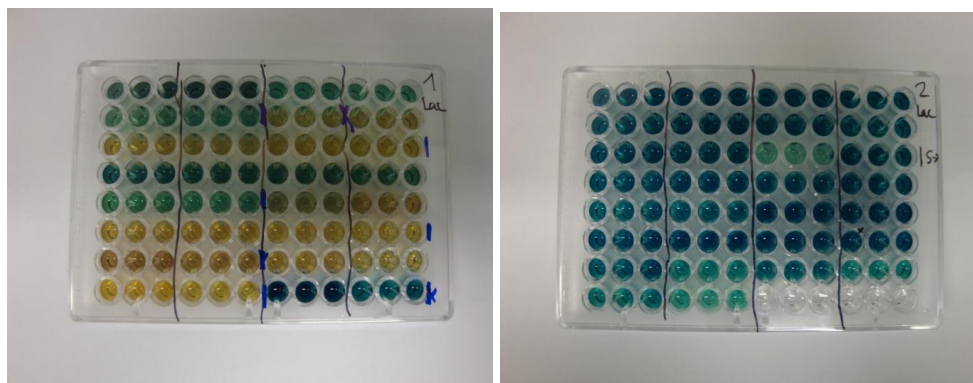
Obrázek č. 8: Zkumavky s výskytem plodnic *Pleurotus ostreatus*



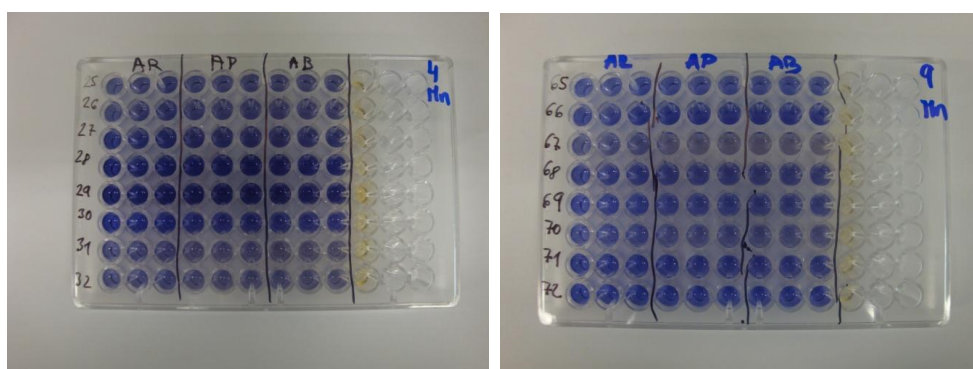
Obrázek č. 9: Vzorok k měření enzymatické aktivity



Obrázek č. 10: Použité chemikálie – pufry



Obrázek č. 11 a 12: Příklady mikrotitračních destiček se zabarvením vzorků při měření enzymatické aktivity lakázy



Obrázek č. 13 a 14: Příklady mikrotitračních destiček se zabarvením vzorků při měření enzymatické aktivity Mn – dependentní peroxidázy



Obrázek č. 15 a 16: Baňky s Kirkovo mediem a se shluky mycelia *Pleurotus ostreatus*



Obrázek č. 17: Rozrušení shluků mycelia pomocí laboratorního mixéru a aplikace pomocí jednonálové pipety na substrát



Obrázek č. 18: Povrchově kultivované mycelium

9.2 Příloha č. 2: Tabulky

V tabulkách můžeme vidět růst mycelia v jednotlivých zkumavkách, za přidání určité koncentrace hypermanganu a síranu manganatého 1,2,3,4,5 a 6 moly a kontrolní varianta, tzn. bez přidání hypermanganu a síranu manganatého. Některé přírůstky se shodovaly a v některých případech se lišily o milimetry. Důvodem může být nestejněměrné očkování sadbou. Zeleně označená čísla znamenají první známky výskytu plodnic hlívy.

* K – kontaminace

Tabulky 1. – 7: Přírůstky mycelia v 7 - 8 denních intervalech

Pokus č. 1: založeno 3.4. 2012 , ukončeno 9.5. 2012

<i>0mol</i>	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	Průměr
1. měření	4,4	3,4	2,1	2,9	2	1,9	2,5	2,4	2,7
2. měření	7	6,2	3,2	5,3	3,4	3,4	5,2	4,6	4,8
3. měření	11,6	10,7	9,2	10,4	7,9	7,7	10,3	9,8	8,6
4. měření	16,1	15	14,4	14,5	12	11,4	14,3	13,9	13,9
5. měření	25	19,7	19,2	19,2	16,5	15,8	19,5	18,9	19,2

<i>1mol</i>	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	Průměr
1. měření	3,7	2	3,1	3,8	2,2	2,2	2,6	2	2,7
2. měření	6,6	5	6,2	6,8	5,6	5,9	5,5	3,2	5,6
3. měření	11,7	11	12	12,5	11,7	12,3	11,9	11,2	11,8
4. měření	16,3	15,5	17,2	17,7	16,2	16,7	15,5	15,1	16,3
5. měření	21,2	21	23,6	23,7	21,1	21,3	20,2	20	21,5

<i>2mol</i>	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	Průměr
1. měření	4	2,7	3	2,7	2,9	3,2	3	2,6	3
2. měření	7,4	4,8	5,3	4,6	6,6	6	5,5	5,5	5,7
3. měření	13,2	12,1	11,4	10,6	12,8	12,3	11,9	11,2	11,9
4. měření	17,6	17,1	16,4	15,2	17,7	17,6	15,2	15,6	16,6
5. měření	23,6	23,5	21	20,7	25	25	20,3	20,5	22,5

10 mol	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	Průměr
1. měření	4,5	4	4,2	4,1	4,7	4,1	3,7	4,6	4,2
2. měření	9,5	9,2	9,5	9,3	9	8,6	8,6	10	9,2
3. měření	14	13,5	13,5	13,7	13	12,5	13,3	14,4	13,5
4. měření	19,4	18,7	18,9	18,9	18	17,6	18,1	19,2	18,6
5. měření	24	24	24	24	22,2	22,5	24	24	23,6

14 mol	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	Průměr
1. měření	3,2	3,5	4	3,9	3,5	4	4,1	4,5	3,8
2. měření	7,7	8,2	8,9	8,7	7,4	8,6	9	9,2	8,5
3. měření	12	12,5	13,1	13,3	12	12,5	13,5	14	12,9
4. měření	17	17	18	18	16,5	17,2	18,2	18,4	17,5
5. měření	21,5	22,7	23,5	23,3	21	21,6	22,2	23,1	22,4

18 mol	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	Průměr
1. měření	3,2	4	4,1	4,5	4,2	3,7	3,8	4	3,9
2. měření	8	8,6	9	9,1	8,1	7,5	8	8,8	8,4
3. měření	12,7	13,9	13	13,2	12,7	12	12,7	13,6	13
4. měření	17,7	18,5	17,8	17,5	16,8	16,9	17,6	18	17,6
5. měření	22,8	23,3	22	21,7	21,2	21,4	22,5	22,7	22,2

20 mol	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	Průměr
1. měření	4,1	3,7	4	4	4,1	4	3,5	3,9	3,9
2. měření	9	8,2	7,8	8,5	9,2	8,6	8,1	9	8,6
3. měření	13,2	12	12,5	12,9	13	12,5	12,4	12,9	12,7
4. měření	18,5	17,5	16,7	17,4	18,4	18	18,4	18,8	18
5. měření	24	24	21,6	21,8	24	24	24	24	23,4

Síran manganatý

0 mol	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	Průměr
1. měření	3,7	4	4	3,9	3,7	3,4	3,3	3,6	3,7
2. měření	8	8	8,1	8	7,6	7,6	7,4	7,4	7,8
3. měření	12,1	12,3	12,5	12	12	11,2	11,2	11	11,8
4. měření	16,9	16,9	17,2	16,8	16,5	15,5	15,2	15,2	16,3
5. měření	21,4	22,1	22,1	22,2	20,4	19,8	19,4	19,1	20,8

2 mol	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	Průměr
1. měření	3,6	4,4	4,5	4,2	4,2	3,9	3,5	3,6	4
2. měření	8,3	8,6	8,7	9,3	8,5	8,1	7,8	8,5	8,5
3. měření	12,7	13	13,6	13,6	12,5	12,5	12	12,3	12,8
4. měření	17,4	17,5	17,9	18	17	17,1	17	17	17,4
5. měření	22,5	22,2	23,5	23,3	21,7	21,8	21,8	22,6	22,4

6 mol	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	Průměr
1. měření	3,8	4	3,1	3,6	3,2	3,9	3,6	3,5	3,6
2. měření	9	8	6,9	7,2	7,6	8,4	8,3	7,7	7,9
3. měření	13,5	12,1	11,8	11,8	11,1	11,7	12,7	12,5	12,2
4. měření	18,1	17,1	16,5	16,6	16,7	16,6	17,6	17,4	17,1
5. měření	23	22,4	22,4	23	22,6	22,5	24	24	23

10 mol	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	Průměr
1. měření	4	4	4	3,7	3,7	3,7	3,6	3,7	3,8
2. měření	8,4	8,2	8,6	8,4	8,2	8,2	8,5	8,1	8,3
3. měření	12,7	12,5	13	12,3	12,5	12,7	12,2	12,6	12,6
4. měření	17,5	16,8	17,7	17,5	17,4	17,2	17,6	17,1	17,4
5. měření	22,2	21,6	22,8	22	22,1	21,8	22,3	21,9	22,1

14 mol	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	Průměr
1. měření	3,7	3,7	3,7	3,9	3,6	3,5	3,7	3,9	3,7
2. měření	8	7,2	8	8,1	7,4	7,3	8	8,1	7,8
3. měření	12,2	11,7	12,5	12,2	11,2	11,7	12,4	12,7	12,1
4. měření	16,3	16,2	17,1	17	15,2	15,9	16,9	16,9	16,4
5. měření	21	21	21,2	21,3	19,9	20	21,1	21,6	20,9

18 mol	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	Průměr
1. měření	3,6	4,1	4	4	3,5	4	3,6	3,6	3,8
2. měření	8,3	8,5	8	8,5	7,7	8	7,5	7,4	8
3. měření	12,7	12,6	12,1	12,3	11,8	12,1	11,9	11,2	12,1
4. měření	17	17,3	16,4	16,8	16	16	16,5	16	16,5
5. měření	21,1	22	21	21	20,2	20,5	21	21	21

20 mol	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	Průměr
1. měření	4,4	4,5	3,5	4	3,7	4,1	3,9	4,6	4,1
2. měření	8,4	8,5	7,8	8,4	7,5	8	8,1	8,8	8,2
3. měření	13,2	12,9	12	12,5	11,9	12,6	12,5	12,7	12,5
4. měření	17	17,3	16,9	17,1	16,4	17	17	17,3	17
5. měření	21,5	22,1	21,2	21,7	21,7	22	21,7	22,3	21,8

Tabulky č. 35 – 47: Přírůstky mycelia v 7 - 8 denních intervalech
Pokus č. 4: založeno 17.1. 2013 , ukončeno 1.3. 2013

Hypermangan

<i>0mol</i>	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	Průměr
1. měření	3,6	3,9	4	4,2	4,4	4,3	4,2	4,5	4,1
2. měření	7,7	7,4	8,3	8,4	8	7,6	8,5	8,4	8
3. měření	12,1	12	12,2	12,9	13,2	12,4	13,3	12,6	12,6
4. měření	15,7	13,9	15,3	16	17	16	16,7	16,1	15,8
5. měření	19	15,4	19,1	19,1	20,5	19,7	20,4	19,5	19,1

<i>2mol</i>	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	Průměr
1. měření	3,2	3,2	3,6	3,5	3,4	3,8	3,7	3,8	3,5
2. měření	5,4	5,5	6,8	5,9	5,5	6	6,1	6,2	5,9
3. měření	8,6	9	10,3	9,8	8,4	8,5	9,2	9,4	9,2
4. měření	10,4	10,6	12,6	13,1	10,9	11,1	11,2	11,6	11,4
5. měření	13	13,4	16,1	16,4	13,6	13,6	14,3	14,3	14,3

<i>6mol</i>	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	Průměr
1. měření	3,9	3,8	4,5	4	4	3,5	3,8	4,2	4
2. měření	8	7,9	8,6	8,3	6,4	5,8	7,9	8,5	7,7
3. měření	12,7	12,6	12	11,1	9,1	9,1	12,3	13	11,5
4. měření	16,4	16,2	14	13,6	11	11,5	16	16,2	14,4
5. měření	20	19,9	16,9	16,2	13,2	13,6	19,6	20	17,4

<i>10mol</i>	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	Průměr
1. měření	5	4,5	4,6	4,5	4,4	4	4,3	3,8	4,4
2. měření	9,2	8,9	8,5	8,6	8,2	8,4	8,2	7,9	8,5
3. měření	13,3	12,9	12,2	12	11,9	12,4	12,6	12	12,4
4. měření	16,6	16,4	15,6	14,5	14	14,3	16,2	15,8	15,4
5. měření	20,4	19,8	19,5	18,9	18	18	19,5	19,4	19,2

<i>14mol</i>	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	Průměr
1. měření	4,4	5,3	4,4	4,2	4,3	4,9	3,9	4,6	4,5
2. měření	9	9,1	8,4	8	9,4	10	7,3	8	8,7
3. měření	13,1	13,2	12,3	12	13,6	14,2	11,1	12,1	12,7
4. měření	16,4	17	16,1	15,6	17	17,8	14,7	15,7	16,3
5. měření	19,9	21	20,1	19,8	20,6	20,9	17,9	19,6	20

18mol	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	Průměr
1. měření	4	4,6	4,2	4,5	4,2	4,6	4	4,2	4,3
2. měření	8,6	8,6	8,9	8,9	7,8	8,6	7,4	8,1	8,4
3. měření	21,9	13,2	13,2	12,8	11,8	12,9	10,9	12	13,6
4. měření	17	17,1	17,1	16,5	15,2	16,2	14	16	16,1
5. měření	20,6	20,4	21,2	20,2	19,3	20,5	18	19,8	20

20mol	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	Průměr
1. měření	4,7	4,4	4,5	3,9	4,5	4,7	4,5	3,8	4,4
2. měření	7,8	7,2	6,2	6,7	7,6	8,2	8,6	7	7,4
3. měření	10,8	11,2	10,2	10	10,1	12	11,2	9,7	10,7
4. měření	14	13,3	13,1	12,2	12,6	14,4	13,7	13	13,3
5. měření	17,1	15,8	16,6	15,3	15	17,2	16,2	16,5	16,2

Síran manganatý

2 mol	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	Průměr
1. měření	4	3,8	4,1	4,4	3,8	4,1	4,7	4	4,1
2. měření	8,3	8,6	8,2	8,5	7,9	8,2	9	8,8	8,4
3. měření	13,1	13,2	12,9	12,7	12,6	12,8	13,5	13,5	13
4. měření	16,9	17	17,1	16,6	17	16,7	17,4	17,5	17
5. měření	20,3	21,1	20,4	20,3	20,9	20,5	21,4	21,6	20,8

6 mol	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	Průměr
1. měření	3,8	3,9	3,7	3,8	3,7	3,5	3,7	4,3	3,8
2. měření	7,6	7,8	7,5	7,4	7,8	7,4	7,9	8,3	7,7
3. měření	12	11,8	11,2	11,3	11,4	11	12	12	11,6
4. měření	16,1	15,2	14,5	14,3	14,9	14,6	15,5	15,2	15
5. měření	19,6	18,3	18,2	18	18,9	19	18,6	18,5	18,6

10 mol	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	Průměr
1. měření	4,5	4,2	4,2	3,9	3,8	3,7	4,2	4,4	4,1
2. měření	8,9	8,4	8,1	7,8	8	7,6	8,1	8,9	8,2
3. měření	12,9	13	12	11,4	12,4	12	11,8	12,3	12,2
4. měření	16,4	16,6	15,5	15	15,8	15,3	15,1	15,9	15,7
5. měření	20	19,8	19,7	19,2	19,5	18,2	19	20	19,4

14 mol	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	Průměr
1. měření	4,4	3,8	3,7	3,6	3,5	4,1	4,2	4,3	4
2. měření	8,7	8	7,1	7,2	7,6	7,9	8	7,7	7,8
3. měření	12,8	12,2	11	10,7	11,2	11,8	11,8	11,2	11,6
4. měření	16	15,4	14,1	14,1	14,6	15	15,6	15,1	15
5. měření	19,5	18,8	17,6	17,8	18	18,4	20,1	19,3	18,7

18 mol	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	Průměr
1. měření	3,8	4	4	3,8	4	4,8	3,8	4	4
2. měření	7,6	7,9	7,7	7,4	7,9	8,8	7,5	8,2	7,9
3. měření	11	11,2	11,5	11,3	12	12,5	11,6	11,8	11,6
4. měření	14,1	14,6	14,6	14,5	15,6	15,8	14,2	13,6	14,6
5. měření	17,7	16,3	18	18,4	19,5	20	17	17,2	18

20 mol	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	Průměr
1. měření	2,6	2,7	3,2	3,3	3	3,4	2,8	3	3
2. měření	4,8	5	5,3	4,9	5,3	5,7	5,2	5,7	5,2
3. měření	8,2	8,6	8,5	7,2	8	7,9	6,9	7,2	7,8
4. měření	11,5	11,8	11,6	9,8	9,6	9,4	10,3	9,8	10,5
5. měření	14,4	14,8	12,6	12	10,8	11	12	11,6	12,4

Tabulkyč. 48 – 56: Přírůstky mycelia v 7 - 8 denních intervalech
Pokus č.5: založeno 7.2. 2013 , ukončeno 8.3. 2013

Hypermangan

0	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	průměr
1. měření	4,4	4	4,6	3,8	4,2
2. měření	9,1	8,8	9	9	9
3. měření	13,2	13,2	13,3	13,6	13,3
4. měření	18	17,1	17,5	18	17,7

2mol	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	průměr
1. měření	3,9	3,8	4	3,7	3,9
2. měření	8,3	8,3	8,6	8,2	8,4
3. měření	11,5	12,2	12,2	12,4	12,1
4. měření	15,5	16,2	16,1	16,3	16

6mol	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	průměr
1. měření	3,6	3,4	3,6	3,9	3,6
2. měření	7,9	8,2	7,6	8,4	8
3. měření	11,2	12,2	10,9	12,1	11,6
4. měření	15,9	16,4	15,8	16,2	16,1

10mol	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	průměr
1. měření	4,2	3,9	4	3,7	4
2. měření	8,4	8	8,6	7,8	8,2
3. měření	11,5	11,5	12	11,7	11,7
4. měření	15,6	16,2	16	16,5	16,1

14mol	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	průměr
1. měření	4,3	3,9	4,2	3,8	4,1
2. měření	8,4	7,9	8,9	8	8,3
3. měření	12,2	11	12,8	11,2	11,8
4. měření	16,7	14,7	17,6	14,9	16

18mol	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	průměr
1. měření	3,9	4	4	3,8	3,9
2. měření	8,3	8,2	8,4	8,1	8,3
3. měření	12,2	11,7	12,6	11,8	12,1
4. měření	16	16,7	16,6	16,6	16,5

20mol	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	průměr
1. měření	3,6	3,9	3,8	4	3,8
2. měření	7,5	7,7	7,9	8	7,8
3. měření	11	12,2	10,9	11,9	11,5
4. měření	15	15,8	15,3	16,2	15,6

Síran manganatý

2mol	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	průměr
1. měření	4,2	4,3	4,1	4,2	4,2
2. měření	9,2	9,3	8,6	9,2	9,1
3. měření	14,1	14,7	13,5	14,3	14,2
4. měření	18,2	19,1	18	18,9	18,6

<i>6mol</i>	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	průměr
1. měření	4,2	4,2	4,5	3,5	4,1
2. měření	9	8,4	9	8	8,6
3. měření	13,7	13,4	14,1	13	13,6
4. měření	18,1	18,3	18,7	18,2	18,3

<i>10mol</i>	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	průměr
1. měření	4	4	4,1	4	4
2. měření	8	8,4	8,2	8,4	8,3
3. měření	12,3	12,5	12,4	12,5	12,4
4. měření	17,6	17,9	17,6	17,9	17,8

<i>14mol</i>	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	průměr
1. měření	3,6	4,2	3,5	4,5	4
2. měření	7,8	8,9	7,5	9,2	8,4
3. měření	11,6	12,5	12,7	13,2	12,5
4. měření	16,7	17	16	17,8	16,9

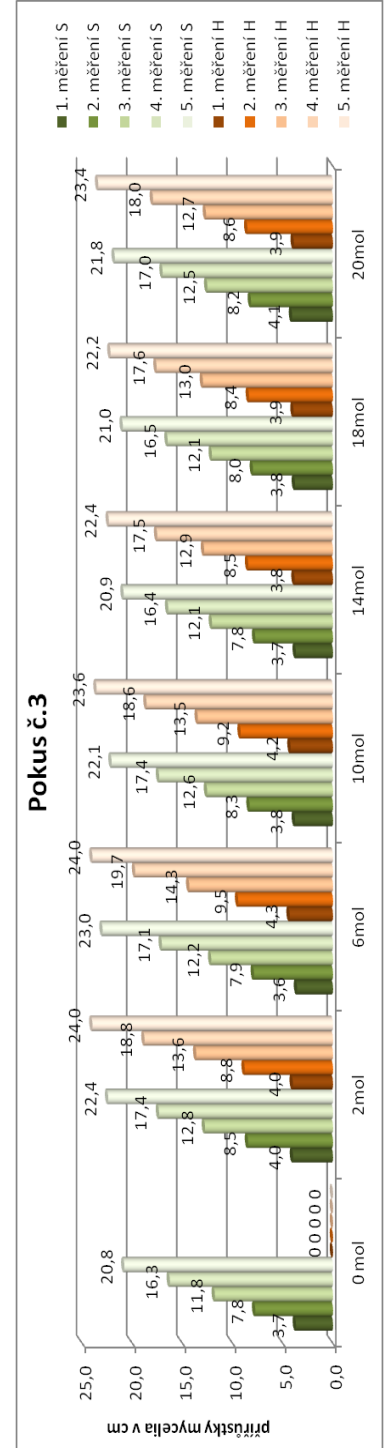
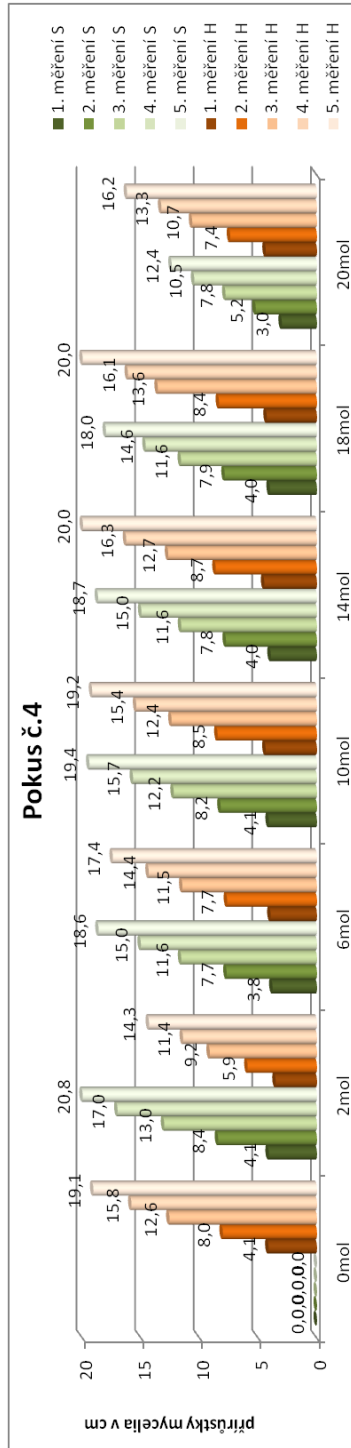
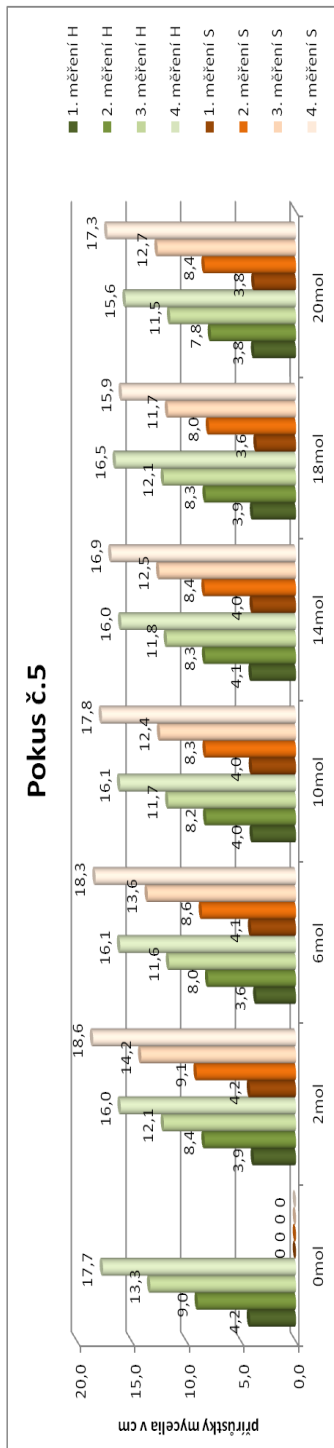
<i>18mol</i>	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	průměr
1. měření	3,8	3,5	3,9	3,2	3,6
2. měření	8,4	7,6	8,3	7,5	8
3. měření	12	11,2	12,3	11,3	11,7
4. měření	16,8	14,8	17	15,1	15,9

<i>20mol</i>	osa 1	osa 2	osa 1	osa 2	průměr
1. měření	3,5	4	3,9	3,8	3,8
2. měření	8	8	8,8	8,6	8,4
3. měření	12,3	12,9	12,4	13	12,7
4. měření	16,9	17,4	16,7	18	17,3

9.3 Příloha č. 3: Grafy

9.3.1 Grafy měření růstu

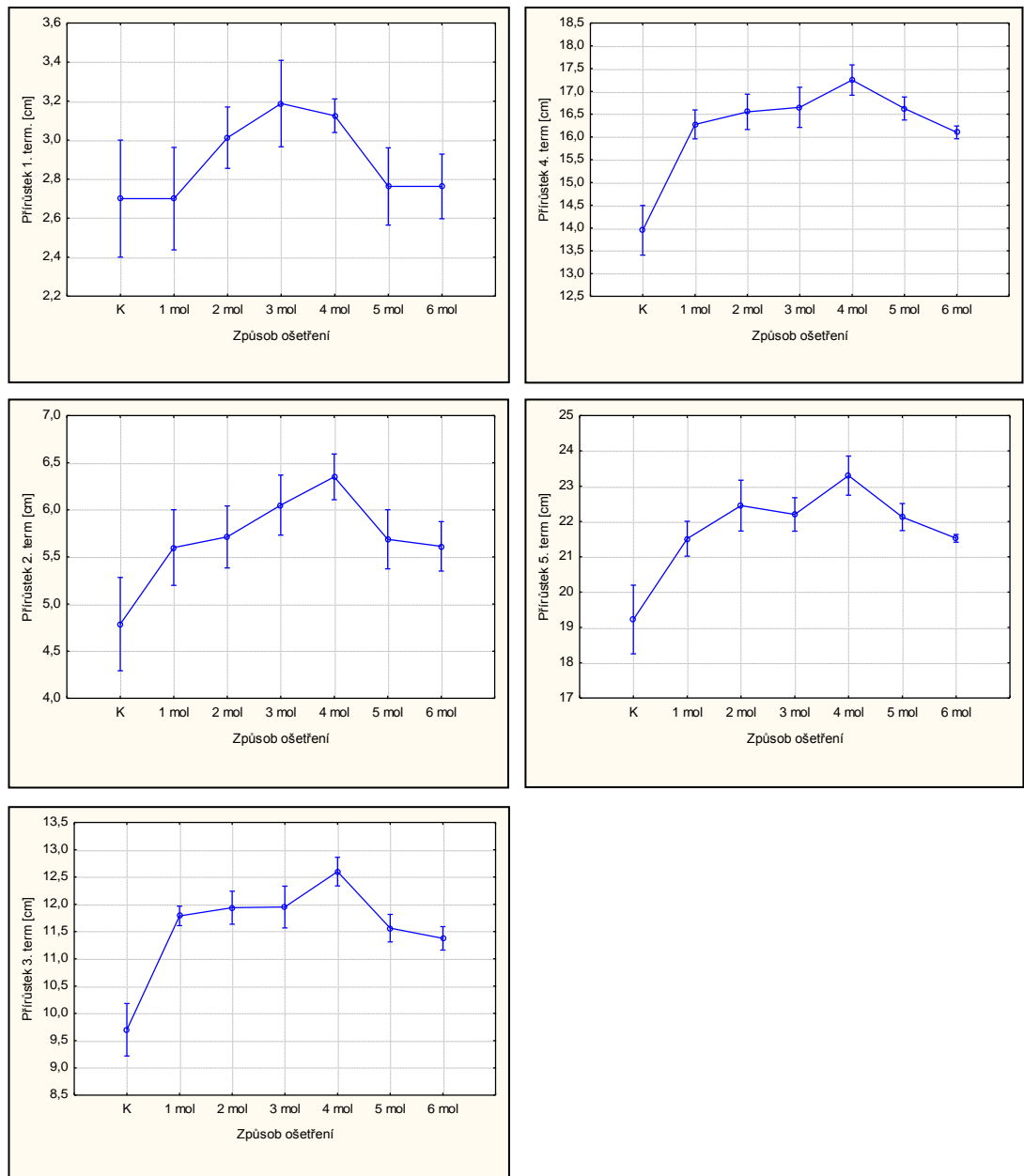
Grafy znázorňují porovnání rozdílů v ošetření substrátu hypermanganem a síranem manganatým v jednotlivých pokusech.



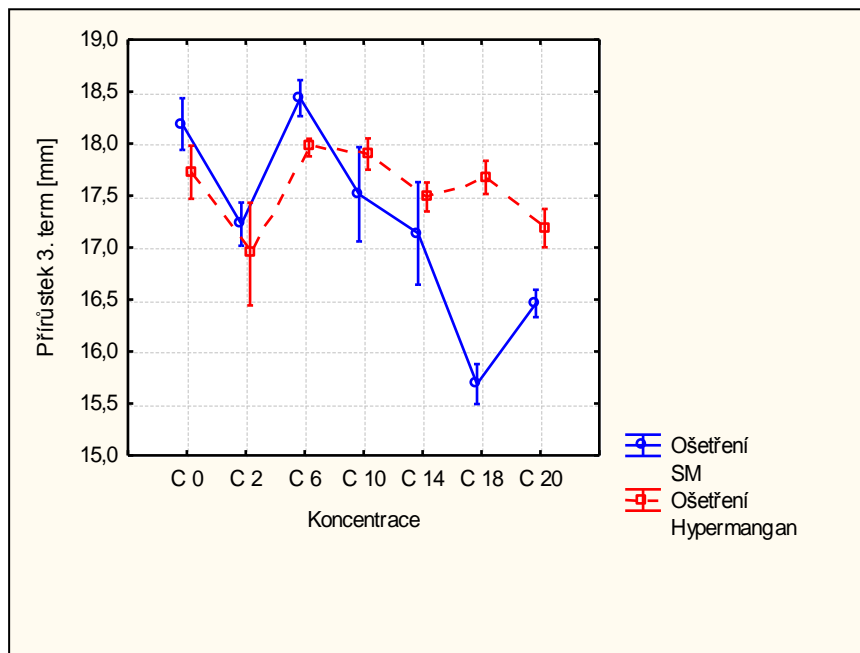
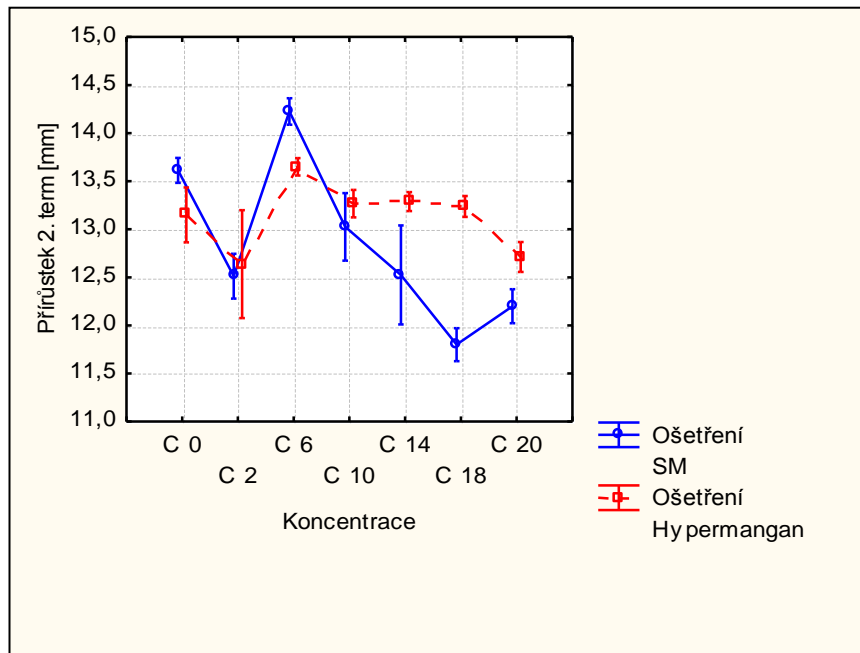
9.3.2 Grafy statistického vyhodnocení

Grafy znázorňují jednotlivé termíny měření přírůstků *Pleurotus ostreatus*. Tyto pokusy byly vypracovány programem Statistika.

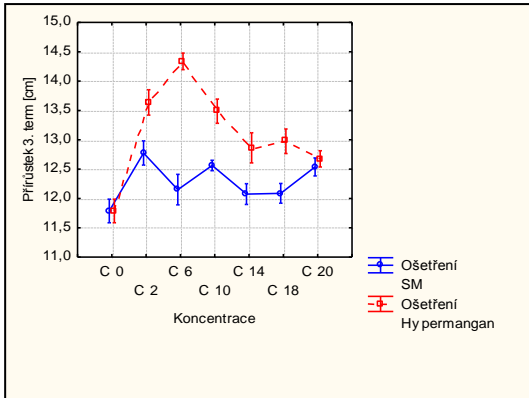
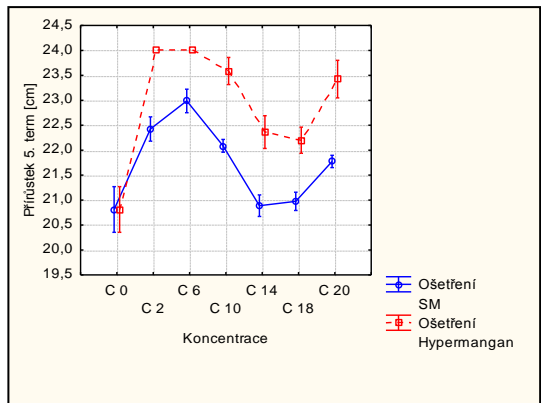
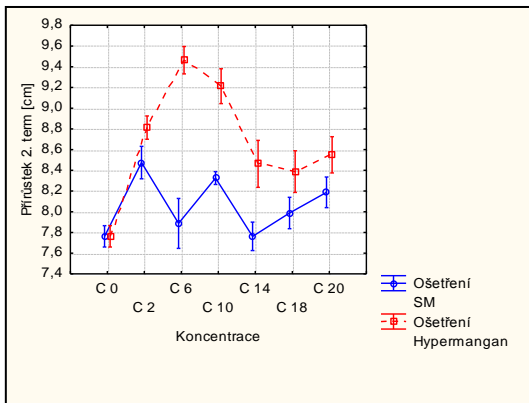
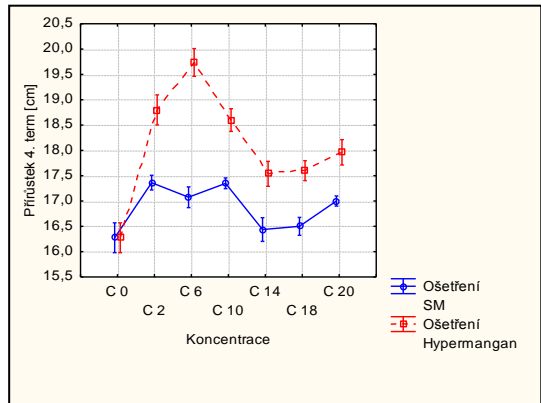
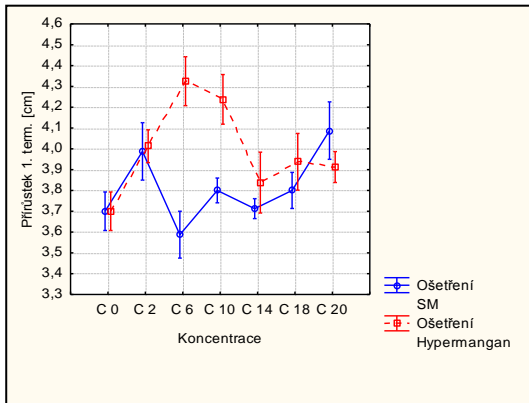
Graf č. 4 – 8: Statistické vyhodnocení pokus č. 1



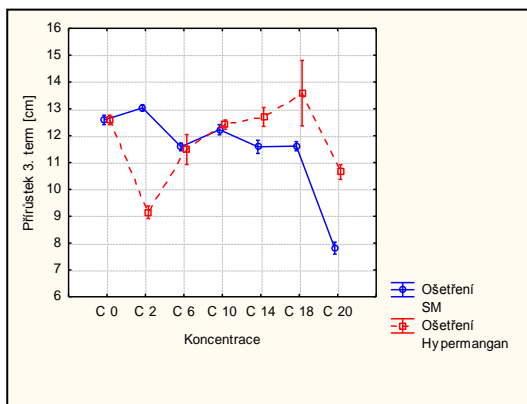
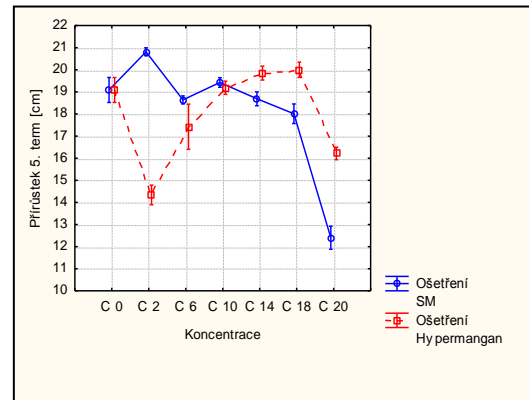
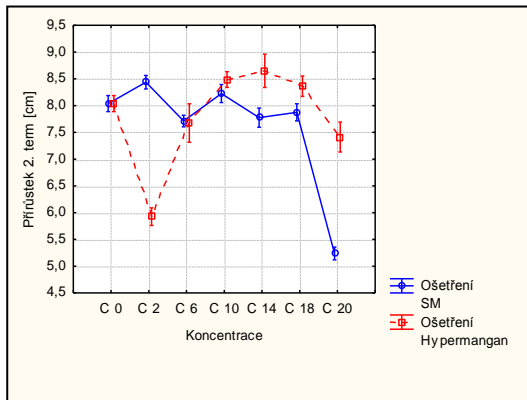
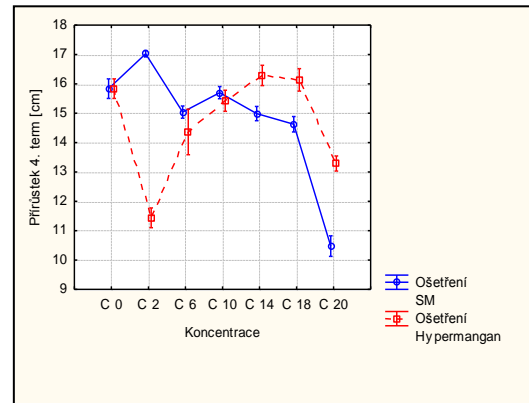
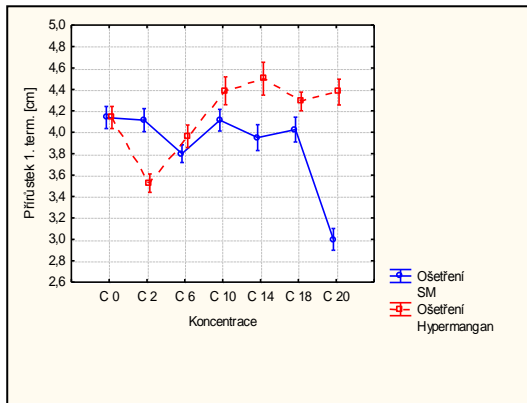
Graf č. 9 – 10: Statistické vyhodnocení pokus č. 2



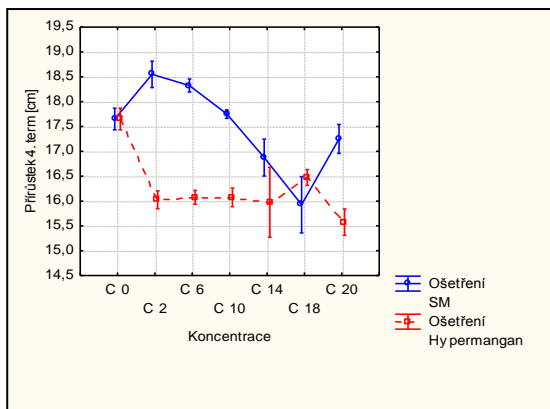
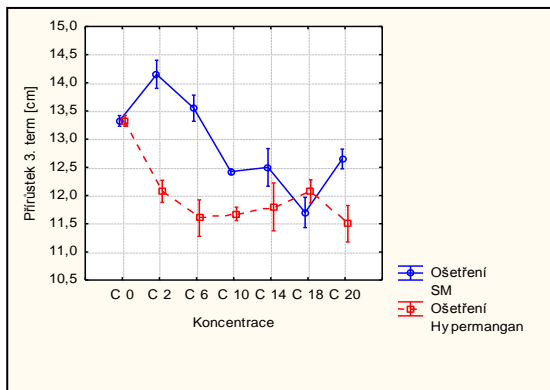
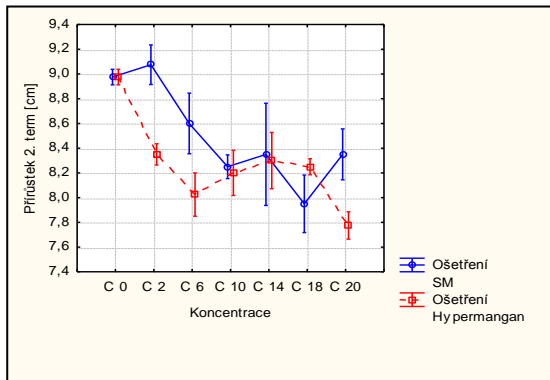
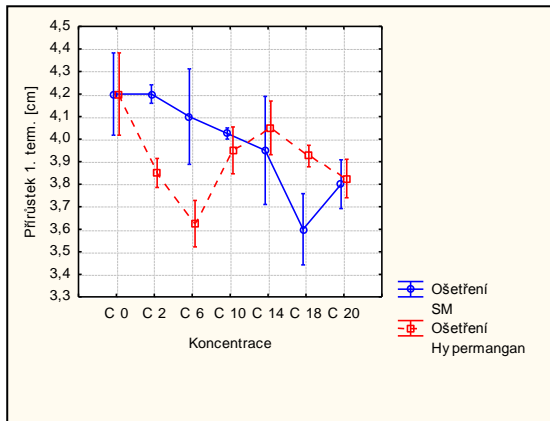
Graf č. 11 – 15: Statistické vyhodnocení pokus č. 3



Graf č. 16 – 20: Statistické vyhodnocení pokus č. 4



Graf č. 21 – 24: Statistické vyhodnocení pokus č. 5



Seznam příloh

Příloha č. 1: Fotodokumentace

Obrázek č. 1: *Pleurotus ostreatus* (hlíva ústříčná)

Obrázek č. 2: Příklad prorůstání *Pleurotus ostreatus* v blocích v pěstírnách

Obrázek č. 3: Povrchově kultivované mycelium

Obrázek č. 4: Příklady označení zkumavek jednotlivých variant

Obrázek č. 5: Naočkovaný substrát zrnitou sadbou

Obrázek č. 6: První termín měření aktivity růstu *Pleurotus ostreatus*

Obrázek č. 7 a 8: Průběh prorůstání substrátu myceliem u jednotlivých pokusů

Obrázek č. 9: Prorostlý substrát myceliem celou zkumavkou.

Obrázek č. 10: Zkumavky s výskytem plodnic *Pleurotus ostreatus* Zobrazení jednotlivého měření růstu mycelia různou barvou

Obrázek č. 11: Vzorky k měření enzymatické aktivity

Obrázek č. 12: Použité chemikálie – pufry

Obrázek č. 13 a 14: Příklady mikrotitračních destiček se zabarvením vzorků při měření enzymatické aktivity lakázy

Obrázek č. 15 a 16: Příklady mikrotitračních destiček se zabarvením vzorků při měření enzymatické aktivity Mn – dependentní peroxidázy

Obrázek č. 17 a 18: Baňky s Kirkovo mediem a se shluky mycelia *Pleurotus ostreatus*

Obrázek č. 19: Rozrušení shluků mycelia pomocí laboratorního mixéru a aplikace pomocí jednokanálové pipety na substrát

Příloha č. 2: Tabulky

Tabulka č. 1 – 7: Přírůstky mycelia v pokusu č. 1

Tabulka č. 8 – 21: Přírůstky mycelia v pokusu č. 2

Tabulka č. 22 – 34: Přírůstky mycelia v pokusu č. 3

Tabulka č. 35 – 47: Přírůstky mycelia v pokusu č. 4

Tabulka č. 48 – 56: Přírůstky mycelia v pokusu č. 5

Příloha č. 3: Grafy

3. 1. : Grafy měření růstu mycelia

Graf č. 1 – 3: Aktivita růstu mycelia

3. 2. : Grafy statistického vyhodnocení

Graf č. 4 – 8: Statistické vyhodnocení pokusu č. 1

Graf č. 9 – 10: Statistické vyhodnocení pokusu č. 2

Graf č. 11 – 15: Statistické vyhodnocení pokusu č. 3

Graf č. 16 – 20: Statistické vyhodnocení pokusu č. 4

Graf č. 21 – 24: Statistické vyhodnocení pokusu č. 5