

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra zahradnictví



**Vliv podmínek prostředí na vztah kultury hlívy ústříčné
(Pleurotus ostreatus), Trichoderma pleuroti a mikrobiota
v substrátu**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Lucie Wiesnerová

Vedoucí práce: Ing. Ivan Jablonský, CSc.

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Vliv podmínek prostředí na vztah kultury hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*), *Trichoderma pleuroti* a mikrobiota v substrátu" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 8.4.2016

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Ivanu Jablonskému, CSc. za vedení práce, rady, připomínky a poskytnutí pramenů, které byly nezbytné pro vznik této práce. Dále bych chtěla poděkovat svým rodičům za veškerou podporu během celého studia.

Vliv podmínek prostředí na vztah kultury hlívy ústřičné (*Pleurotus ostreatus*), *Trichoderma pleuroti* a mikrobiota v substrátu

Souhrn

Pěstování jedlých hub je ve světě stále populárnější. Lidé si stále více uvědomují jejich pozitivní účinky, a proto jsou houby využívány nejen v gastronomii, ale také stále častěji v humánní a veterinární medicíně. S jejich pěstováním se ale pojí také napadení pěstovaných kultur škůdci a chorobami. V pěstírnách se nejčastěji objevují zelené plísně rodu *Trichoderma*, které způsobují značné ztráty. Při pěstování hlívy ústřičné je největším problémem *Trichoderma pleuroti*, při pěstování žampionů je to *Trichoderma aggressivum*. Proto je výzkum ochrany proti těmto plísním důležitý a v posledních letech nabývá na významu.

Předložená práce se zabývá studiem tolerance vybraných kmenů *Pleurotus ostreatus* vůči *Trichoderma pleuroti* a různými tepelnými ošetřeními substrátu. V pokusech byl zjišťován vztah mezi *Pleurotus ostreatus*, *Trichoderma pleuroti* a *Bacillus subtilis*, dále různé formy tepelného ošetření substrátu a jeho obohacení. Pokusy byly statisticky vyhodnoceny metodou ANOVA.

V případě společného růstu *Trichoderma pleuroti* a *Bacillus subtilis* byl růst *Trichoderma pleuroti* značně omezen, zejména v případě plošné inokulace *Bacillus subtilis*. Také u společného růstu *Bacillus subtilis* a *Pleurotus ostreatus* byl růst *Pleurotus ostreatus* omezen, u plošné inokulace *Bacillus subtilis* bylo omezení růstu *Pleurotus ostreatus* výraznější.

V případě fermentace substrátu a jeho následného tepelného ošetření bylo zjištěno, že obohacení substrátu a jeho následná fermentace není vhodné ošetření pro růst mycelia *Pleurotus ostreatus*. V případě, že byl

substrát infikován *Trichoderma pleuroti*, se jako nejvhodnější ošetření ukázala fermentace substrátu a následné tepelné ošetření při 60 °C. Přidání prorostlého vyplozeného substrátu se neprojevovalo jako významné pro růst mycelia *Pleurotus ostreatus*.

Klíčová slova: hlíva ústříčná, substrát, *Trichoderma pleuroti*

Influence of environmental conditions on relation between *Pleurotus ostreatus*, *Trichoderma pleuroti* and microbiota in substrate

Summary

Cultivation of edible mushrooms in the world is becoming increasingly popular. People are increasingly aware of their positive effects and therefore are mushrooms used not only in restaurants but also increasingly in human and veterinary medicine. With their growing, but also associated infestation of cultivated cultures of mushrooms by pests and diseases. The farms are most often appear green mold of the genus *Trichoderma* which cause considerable losses. When growing oyster mushroom is the biggest problem *Trichoderma pleuroti*, the cultivation of *Agaricus* is a *Trichoderma aggressivum*. Therefore, the research of protection against these fungi and important in recent years, importance.

Presented work studies the tolerance selected strains of *Pleurotus ostreatus* against *Trichoderma pleuroti* and different heat treatments of the substrate. In experiments was examined relationship between *Pleurotus ostreatus*, *Trichoderma pleuroti* and *Bacillus subtilis*, as well as various forms of heat treatment of the substrate and its enrichment. The experiments were statistically analyzed using ANOVA.

In the case of a common growth *Trichoderma pleuroti* and *Bacillus subtilis* was *Trichoderma pleuroti* considerably restricted, especially in the case of surface inoculation of *Bacillus subtilis*. Also in a common growth of *Bacillus subtilis* and *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus ostreatus* growth was

limited by surface inoculation of *Bacillus subtilis* was to restrict the growth of *Pleurotus ostreatus* pronounced.

In the case of the fermentation substrate and subsequent heat treatment, it was found that the enrichment of the substrate and its subsequent fermentation treatment is not suitable for the growth of mycelia of *Pleurotus ostreatus*. In case the substrate has been infected *Trichoderma pleuroti* the most appropriate treatment showed fermentation substrate and subsequent heat treatment at 60 ° C. Adding mingled substrate is not proved crucial for the growth of mycelium *Pleurotus ostreatus*.

Keywords: oyster mushroom, substrate, *Trichoderma pleuroti*

Obsah

1 Úvod	10
2 Cíl práce	11
3 Literární rešerše	12
3.1 Rod <i>Trichoderma</i>	12
3.1.1 Taxonomické zařazení.....	12
3.1.2 Rod <i>Trichoderma</i>	12
3.1.3 Škodlivost rodu <i>Trichoderma</i>	15
3.2 Rod <i>Pleurotus</i>	16
3.2.1 Zařazení do systému.....	16
3.2.2 Ekologické požadavky <i>Pleurotus ostreatus</i>	17
3.2.3 Pěstování <i>Pleurotus ostreatus</i>	18
3.3 Rod <i>Bacillus</i>	25
3.3.1 Taxonomické zařazení.....	25
3.3.2 Rod <i>Bacillus</i>	25
4 Materiály a metody	30
4.1 Materiál.....	30
4.1.1 Agarová živná média	30
4.1.2 Pelety	31
4.1.3 Použité organismy.....	31
4.1.4 Propaňovací komora	31
4.2 Metody	32
4.2.1 Infekce substrátu z pelet <i>Trichoderma pleuroti</i>	32
4.2.2 Porovnání růstu a interakcí <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Trichoderma pleuroti</i> a <i>Bacillus subtilis</i> na 2 typech kultivačních medií	33
4.2.3 Fermentace obohaceného substrátu ošetřeného v různých teplotních režimech	34
4.2.4 Růst mycelia <i>Pleurotus ostreatus</i> na různě ošetřených substrátech ze slámy inokulovaných substrátem kontaminovaným <i>Trichoderma pleurotum</i>	35
4.2.5 Vliv přídavku vyplozeného substrátu do namočené slámy kontaminované <i>Trichoderma pleuroti</i> při různých teplotních ošetřeních	36
5 Výsledky	38
5.1 Infekce substrátu z pelet <i>Trichoderma pleuroti</i>	38
5.2 Porovnání růstu a interakcí <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Trichoderma pleuroti</i> a <i>Bacillus subtilis</i> na dvou typech kultivačních medií.....	40
5.3 Fermentace obohaceného substrátu ošetřeného v různých teplotních režimech	42

5.4	Růst mycelia <i>Pleurotus ostreatus</i> na různě ošetřených substrátech ze slámy inokulovaných substrátem kontaminovaným <i>Trichoderma pleuroti</i>	43
5.5	Vliv přídatku vyplozeného substrátu do namočené slámy kontaminované <i>Trichoderma pleuroti</i> při různých teplotních ošetřeních	46
6	Diskuze	48
7	Závěr	51
8	Literatura	53
9	Přílohy	58

1 Úvod

Pěstování jedlých hub je ve světě stále populárnější. Lidé si stále více uvědomují jejich pozitivní účinky, a proto jsou houby využívány nejen v gastronomii, ale také stále častěji v humánní a veterinární medicíně. Nejvíce pěstovanými zástupci hub jsou hlíva ústřičná (*Pleurotus ostreatus*), žampion dvouvýtrusý (*Agaricus bisporus*) a šupinovka nameko (*Pholiota nameko*). S jejich pěstováním se ale pojí také napadení pěstovaných kultur škůdci a chorobami. V pěstírnách se nejčastěji objevují zelené plísně rodu *Trichoderma*, které způsobují značné ztráty. Při pěstování hlívy ústřičné je největším problémem *Trichoderma pleuroti*, při pěstování žampionů je to *Trichoderma aggressivum*. Proto je výzkum ochrany proti těmto plísním důležitý a v posledních letech nabývá na významu.

2 Cíl práce

Cílem práce je zhodnotit vliv podmínek prostředí na vztah kultury *Pleurotus ostreatus* (hlívy ústříčné), *Trichoderma pleuroti* a mikrobiota v substrátu.

3 Literární rešerše

3.1 Rod *Trichoderma*

3.1.1 Taxonomické zařazení

Říše: Fungi (Houby)

Oddělení: Ascomycota (Vřeckovýtrusné)

Podkmen: Pezizomycotina

Třída: Sordariomycetes

Řád: Hypocreales (Masenkotvaré)

Čeleď: Hypocreaceae (Masenkovité)

Rod: *Hypocrea*

Anamorfa – *Trichoderma*

3.1.2 Rod *Trichoderma*

Rod *Trichoderma* je celosvětově rozšířený v půdách a rozkládajícím se dřevě a rostlinném materiálu. Druhy rodu *Trichoderma* jsou většinou převládajícími prvky v půdě v různorodých lokalitách. Jejich metabolické schopnosti jsou možnou příčinou agresivní povahy rodu *Trichoderma*. Přítomnost rodu *Trichoderma* je často spojována s chorobami rostlin a komerčním pěstováním hub (Gams, Bissett, 2002).

Druhy rodu *Trichoderma* se využívají také v biotechnologiích. Využití mají pro své schopnosti produkovat celulázy a omezování některých fytopatogenních hub (např. Supresivit nebo Trichodex – přípravky pro biologickou ochranu rostlin) (Kubátová et al., 2009).

Rod *Trichoderma* je studován již od 18. století, přesto se jeho studiu dostalo největšího zájmu v posledních desetiletích z důvodu problémů při pěstování jedlých hub a využití v biotechnologiích. Díky využití molekulárních metod jsou v současnosti popsány nové druhy (Kirk et al., 2008; Antonín, 2006).

Poznatky o rodu *Trichoderma* učinil už roku 1794 Persoon, dalšími kteří se zabývali studiem rodu *Trichoderma* byli Dingley, Rifaie, Bissett,

Kubicek či Samuels. Studium tohoto rodu bylo značně problematické, protože se fenotypové znaky mnohdy překrývají a jsou velice variabilní. V současnosti je známo více než 100 druhů, přičemž velká část byla popsána v posledních 10 letech (Samuels, 2006).

U rodu *Trichoderma* dochází k řazení teleomorfních stadií hub do rodu *Hypocrea*. Zástupci tohoto rodu se nacházejí jako saprofyti žijící v půdě, v rostlinném odpadu, na mrtvém dřevě a někdy parazitují na ostatních houbách. Pro svou výživu v tomto prostředí využívají celulolytické enzymy. Druhy rodu *Hypocrea* vytváří na povrchu substrátu stromata. Stromata jsou nepravidelně ohraničená nebo poduškovitá až rozptýlená. Mají světlou barevnou nebo černou barvu, uvnitř jsou stromata hyalinní a masitá. Ve stromatu je zanořené askoma, což je ostiolátní perithecium, kulovitého až vejčitého tvaru. Stěny askomat jsou tvořeny plochými protáhlými buňkami. Vřečka mají 8, někdy 16 spor a jsou unitunikátní, cylindrická. Askospory jsou dvoubuněčné. Buňky askospor jsou zaoblené, hluboce stažené v místě septa, často se dělí na skorokulovité buňky, hyalinní neb zelenavé. Anamorfní stadia rodu *Trichoderma* se řadí do rodů *Acremonium*, *Gliocladium*, *Trichoderma* a *Verticilium*

(<http://www.mycobank.org/MycoTaxo.aspx?Link=T&Rec=2432>).

V současnosti je rod *Trichoderma* dělen do 5 sekcí: *Hypocreanum*, *Longibrachiatum*, *Saturnisporum*, *Pachybasium* a *Trichoderma*.

Sekce *Hypocreanum*

Druhy této sekce se vyznačují stromkovitě větvenými konidiofory nepravidelného tvaru. Fialidy jsou protáhlé cylindrické až elipsovité nebo úzce lahvicovité. Konidiofory jsou nezakřivené a většinou nejsou nahloučené. Konidie mají bělavou nebo světlou barvu, mohou být variabilní tvarem a velikostí (Bisset, 1991).

Sekce *Longibrachiatum*

Zástupci sekce *Longibrachiatum* mají mycelium vzdušné, pavučinkovité až vločkovité. Kolonie mají přírůstky v průměru 6 – 9 cm za 4 dny při 20 °C. Konidie jsou rozptýlené nebo řídce chomáčovitě nahloučené.

Masa konidií je zelená. Chlamydiospory mohou nebo nemusí být přítomny. Konidiofory jsou omezeně rozvětvené. Primární větev konidioforů je dlouhá, sekundární větve jsou většinou krátké nebo ojediněle ještě jednou rozvětvené. Fialidy jsou samostatně, ojediněle ve větenech po 2 nebo po 3. Mají úzce až široce lahvicovitý nebo cylindrický tvar. Konidie jsou jednobuněčné, hladkostěnné, mají zelenou barvu a elipsoidní až obvejčitý tvar (Bisset, 1991).

Sekce *Saturnisporum*

Omezené mycelium je vzdušné, rozcuchané až vločkovité. Kolonie rostou v průmětu 4 – 7 cm za 4 dny při 20 °C. Konidie se obvykle tvoří v kompaktních shlucích a mají zelenou nebo šedavou barvu. Chlamydiospory jsou obvykle přítomny. Konidiofory s větvemi v párech vznikají v pravidelných intervalech. Větve konidioforů jsou poměrně široké a často prohnuté. Fialidy jsou obvykle v párech nebo přeslenech po 3. Konidie mají zelenou nebo šedou barvu, jsou hladkostěnné se zřetelnými prohnutími (Bisset, 1991).

Sekce *Pachybasium*

Vzdušné mycelium je zpravidla omezené, více nebo méně vločkovité. Kolonie rostou v průměru 2 – 9 cm za 4 dny při teplotě 20 °C. Konidie se tvoří rozptýleně, nahloučeně nebo v charakteristicky nahloučeně v kompaktních svazcích. Chlamydiospory jsou zpravidla přítomny. Konidiofory jsou mnohdy shloučené ve svazcích, které jsou komplexně a opakovaně větvené v pravidelných intervalech. U některých druhů jsou vrcholky konidioforů nevětvené. Mohou se vytvářet anastomózy mezi nedalekými konidiofory. Fialidy jsou v přeslenech po 2 – 7, mají úzce až široce lahvicovitý tvar. Konidie jsou jednobuněčné, mají elipsoidní, obvejčitý nebo široce kulovitý tvar. Barva konidií je bezbarvá až šedá, zelená nebo hnědá (Bisset, 1991).

Sekce *Trichoderma*

Vzdušné mycelium je zpravidla omezené, vločkovité až pavučinovité. Kolonie roste v průměru 5 – 9 cm za 4 dny při teplotě 20 °C. Konidie jsou

tvoreny rozptýleně, řidčeji nebo kompaktně nahloučeně. Masa konidií má zprvu bílou barvu, později zelenou nebo hnědou. Chlamydospory jsou přítomny. Konidiofory jsou úzké a zahnuté s primárními větvemi. Tyto větve vznikají v pravidelných intervalech a větve jsou párové nebo v přeslenech po 3. Konidie jsou jednobuněčné, hladkostěnné až výrazně drsné, mají zelenou až hnědou barvu. Tvar konidií je skoro kulovitý až obvejčitý nebo elipsoidní (Bisset, 1991).

3.1.3 Škodlivost rodu *Trichoderma*

V současné době je světová produkce hlívy ústříčné ohrožována zelenou plísní rodu *Trichoderma*. Výskyt zelených plísní v pěstírnách byl zaznamenán již před 10 lety v Severní Americe. Závažné případy napadení plísní byly zjištěny v Jižní Koreji, Itálii, Maďarsku a Rumunsku (Komon-Zelazowska et al., 2007).

V 80. letech byl zaznamenán výskyt *Trichoderma harzianum* v pěstírnách po celém světě. Tato plíseň způsobila škody v produkci hub v rozmezí 30 – 100% ztrát. V případě napadení dochází k destrukci mycelia žampionu. Později bylo zjištěno, že šlo o dva nové druhy rodu *Trichoderma*, a to *Trichoderma aggressivum* fsp. *europaeae* a *Trichoderma aggressivum* fsp. *aggressivum*. V pěstírnách žampionů způsobuje největší škody *Trichoderma harzianum*, v pěstírnách hlívy oproti tomu *Trichoderma pleuroti* S. H. Yu & M. S. Park a *Trichoderma pleuroticola* S. H. Yu & M. S. Park (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2886115/>).

K ochraně a prevenci proti napadení *Trichoderma aggressivum* je důležitá její determinace. Pro odlišení od podobné *Trichoderma harzianum* je nutné využít molekulární metody, jako jsou např. sekvence ITS rDNA, TEF-1av, metoda RAPD-PCR či PCR s druhově specifickými primery (Chen et al. 1999a, b; Szczech et al., 2008).

Trichoderma pleuroti se vyskytuje pouze v pěstírnách hlívy a není známa z jiných substrátů. Oproti tomu *Trichoderma pleuroticola* je rozšířena kosmopolitně. Vyskytuje se v půdě, rostlinných zbytcích a kmeny *Trichoderma pleuroticola* jsou díky svým mykoparazitním schopnostem

používány při biologické ochraně rostlin proti houbovým parazitům. Do pěstíren se *Trichoderma pleurotica* dostala pravděpodobně prostřednictvím kontaminovaného substrátem z rostlinných zbytků (Hatvani et al., 2007).

Pro pěstování hub jsou vhodné podmínky zdroje uhlíku a dusíku, vyšší teploty a vyšší relativní vzdušná vlhkost. Pokud dojde ke kolísání těchto parametrů a jsou horší světelné podmínky během plození, jsou toto ideální podmínky pro rozvoj *Trichoderma pleuroti*. Při těchto podmínkách roste tato konkurenční houba velmi rychle. *Trichoderma pleuroti* má schopnost produkovat toxické sekundární metabolity, extracelulární enzymy a také těkavé organické sloučeniny. Tyto produkty mohou mít za následek snížení výnosů nebo likvidaci celé kultury (Hatvani, 2008).

3.2 Rod Pleurotus

3.2.1 Zařazení do systému

Říše: Fungi (Houby)

Oddělení: Basidiomycota (Houby stopkovýtrusné)

Podkmen: Agaricomycotina

Třída: Basidiomycetes (Stopkovýtrusné)

Podtřída: Agaricomycetidae (Houby rouškaté)

Řád: Agaricales (Pečárkotvaré)

Čeleď: Pleurotaceae (Lupenotvaré)

Rod: *Pleurotus* (Hlíva)

Hlíva ústříčná

Hlíva ústříčná se řadí mezi gymnokarpní druhy kloboukatých hub. V průběhu vývoje plodnic nejsou lamely nikdy kryty obalem. Již mladé plodnice uvolňují spory z postupně zrajících lamel, výjimkou je *Pleurotus calyptratus* (hlíva čepičatá). Hlíva čepičatá má v mládí lupeny kryté částečným obalem (Jablonský a Šašek, 2006).

Klobouky hlívy ústříčné jsou 5 - 15 cm velké a masité. Pokožka klobouku je hladká, lysá a lesklá, ocelově šedé nebo modrošedé barvy, často může být také olivová nebo nahnědlá. Lupeny houby jsou bělavé nebo

krémové barvy, sbíhavé, husté a často navzájem srostlé. Podlouhlé výtrusy mají elipsoidní tvar a dosahují velikosti 8 - 12 x 3 - 4 μm . Třeň je válcovitý, bělavé barvy, na bázi často plstnatý. Třeňe hlívy ústříčné jsou 6 - 12 cm dlouhé a 1 - 3 cm silné, obvykle jsou asymetricky přirostlé ke klobouku. (Kothe, 2012)

3.2.2 Ekologické požadavky *Pleurotus ostreatus*

V přírodě většinou hlíva ústříčná roste na odumřelém dřevě. Rostoucí mycelium hlívy ústříčné dokáže rozložit 5 liber dřeva na polovinu hmotnosti během několika měsíců. Meziprodukty tohoto rozkladu jsou voda, oxid uhličitý, enzymy, uhlovodíky a další látky, které slouží jako výživa dalších živých organismů. Dále hlívy rostou na organických odpadech například na slámě, kukuřičných vřetenech, hrachovině, pazdeři, vojtěškovém seně nebo papíru. Tyto suroviny obsahují ligninocelulózové odpady, a to lignin, celulózu a hemicelulózu. Aby tyto suroviny mohly být použity pro pěstování hlívy, musí být teplotně ošetřeny (pasterace, sterilizace) (Jablonský a Šašek, 2006; Stamets, 1993).

Teplota

Optimální teplotou pro klíčení spor a růst mycelia je 28 °C. Pokud je teplota okolo 20 °C dochází ke zpomalení růstu mycelia a ten může být znevýhodněn oproti jiným mikroorganismům. Při teplotě 5 °C dochází k zastavení růstu, ani při mrazu nedochází k poškození mycelia. Pokud je substrát kolonizován myceliem může být vystaven teplotám pod nulou a při zvýšení teploty se růst mycelia obnoví a vytváří se plodnice. V letním období při intenzivním pěstování je problémem přehřívání substrátu. Toto přehřívání je způsobeno zvýšenou aktivitou mycelia houby. V závislosti na vlhkosti substrátu mycelium odumírá při vystavení teplotám vyšším než 32 - 35 °C (Jablonský a Šašek, 2006).

Různé druhy hlív mají v průběhu tvorby plodnic svá teplotní maxima. Pokud je maximum překročeno znemožní se nasazování plodnic. Optimální teplotou pro nasazování zárodků plodnic je teplota 8 - 12 °C. Nasazování se zcela zastavuje při teplotách nad 15 °C. V případě hlívy ústříčné lze

dosáhnout nasazení plodnic i při teplotách nad 15 °C pokud je kultura vystavena tzv. chladovému šoku, kdy je substrát po dobu několika dnů v teplotě 5 °C (Jablonský a Šašek, 2006).

pH

Při růstu podhoubí hlívy ústříčné je vhodné pH v rozmezí 5,5 - 6,5, u hlívy máčkové je to pH 5 - 6. Mimo tyto hodnoty je růst mycelia pomalejší. K úpravě substrátu na vhodné hodnoty pH lze použít přídavek vápence. pH se v průběhu růstu mycelia mění, v povrchové vrstvě je hodnota pH nižší než ve vnitřních vrstvách (Jablonský a Šašek, 2006).

Světlo

V průběhu kolonizace substrátu myceliem hlívy není potřeba osvětlení. Během nasazování a vývoje plodnic je nutná určitá intenzita osvětlení 100-400 luxů po dobu 12 hodin za den. Při vyšších teplotách je potřeba zvýšit intenzitu osvětlení až na 400 luxů, hlíva roste rychleji než při nižších teplotách. V případě nedostatečného osvětlení se vyskytují protáhlé třeně a zakrnělý klobouk. Optimální intenzita osvětlení ovlivňuje vybarvení klobouku, při nižší intenzitě jsou plodnice světlé barvy (Jablonský a Šašek, 2006).

3.2.3 Pěstování *Pleurotus ostreatus*

Volně rostoucí plodnice hlívy lze nalézt v období léta a podzimu, vyrůstající na kmenech a pařezech v trsech nebo jednotlivě. Rod *Pleurotus* se vyskytuje na obou polokoulích ve všech zeměpisných šířkách a vegetačních pásích. Osidluje většinou listnaté dřevo stromů.

Pro pěstování se používá velké spektrum druhů hlívy, teplomilné, chladnomilné i tropické druhy. Nejčastěji pěstovaným druhem je hlíva ústříčná, která je chladnomilná, dále její kultivar Florida a vzájemní kříženci. Dalšími pěstovanými druhy je hlíva miskovitá (*Pleurotus cornucopiae*), hlíva máčková (*Pleurotus eryngii*), hlíva plicní (*Pleurotus pulmonarius*), *Pleurotus*

sajor-caju, Pleurotus flabellatus, Pleurotus djamor, Pleurotus cystidiosus a Pleurotus tuber-regium (Jablonský a Šašek, 2006).

Historie pěstování

Historie pěstování hlívy začala již před staletími, kdy si lidé odnášeli domů hlívu i se substrátem. Dřevo bylo umístěno na vlhké místo a lidé zde sbírali houbu po několik let. Produkční pěstování bylo zahájeno v Maďarsku v polovině 60. let. Maďarští mykologové zakládali v Podunajské nížině plantáže naočkovaných špalků. Nevýhodami této produkce byly pouze jedna sklizeň o roka, nevýznamné hospodářské výsledky, nedostatek topolového dřeva a kolísavá jakost produkce. Tato metoda je nicméně vhodná pro amatérské pěstování, kdy si pěstitelé mohou vypěstovat řadu dřevokazných hub v domácích podmínkách (Jablonský a Šašek, 2006).

Na počátku 70. let se začala hlíva pěstovat i v Itálii, kde hlívu pěstovali na pšeničné slámě a kukuřičných vřetenech. Substrát byl připravován v napařovacích tunelech, které sloužily k přípravě žampionového substrátu.

V 80. letech se pěstování hlívy rozšířilo i do Asie (Indie, Malajsie, jihovýchodní Asie), a to díky pěstování tropických druhů hlív na různých rostlinných odpadech. V roce 2000 se největším producentem hlívy stala Čína. Ve světě se vypěstovalo 1 300 000 tun hlívy. K největším producentům v Evropě patří Itálie, Francie, Maďarsko a Polsko (Jablonský a Šašek, 2006).

V Československu vyvinula technologický postup pro výrobu sadby a pěstování RNDr. Anastázia Ginterová z Bratislavy. Koncem 60. let byla v ČR vysazena první velkoplantáž špalků naočkovaných myceliem hlívy, a to v JZD Liptál u Vsetína. V tomto JZD byl později také použit způsob pěstování na slámě a kukuřičných vřetenech. Roku 1975 byl zahájen provoz pěstírny v JZD v Kojátkách, kde se poprvé uplatnil systém plodících stěn ve velkých paletách. V 80. letech došlo k rozvoji dalších podniků, kde se substrát pro pěstování ošetřoval v propařovacích tunelech a osázený se plnil do pytlů. Po roce 1989 bylo mnoho podniků zrušeno, protože došlo k zastavení zpracovatelského průmyslu, na který byl odbyt produkce hlívy hlavně orientován. V současné době se zájem o hlívu zvýšil, a to díky novým poznatkům o jejich léčivých vlastnostech (Jablonský a Šašek, 2006).

3.2.3.1 Substráty pro pěstování hlívy ústříčné

Pro přípravu substrátu na pěstování hlívy je základní surovinou sláma obilnin, kukuřice nebo kukuřičná vřetena, piliny, bavlníkové odpady, banánovníkové odpady a také zbytky ze sójových bobů. Po přidání malého podílu ječné slámy k pšeničné dochází k rychlejší kolonizaci substrátu a plodnice se objevují o 5 - 7 dnů dříve než při použití pouze pšeničné slámy (Jablonský a Šašek, 2006).

Na růst podhoubí a výnos má vliv nejen druh použité slámy, ale také sklizeň a její skladování. Vhodná vlhkost skladované slámy by měla být 13 - 15%. Sláma, která opakovaně zmokla a vyschla, je pro použití na výrobu substrátu nevhodná. Z tohoto důvodu se na slámě množí konkurenční plísňe snižující její výživovou hodnotu, a nelze je dokonale odstranit ani při teplotním ošetření slámy. Vhodná sláma pro výrobu substrátu je suchá a má žlutou barvu. Pokud je sláma šedá, černá, plesnivá či se na ní objevují černá místa, je nepoužitelná (Jablonský a Šašek, 2006).

Studie provedené na National Pingtung University of Science and Technology na Taiwanu porovnávala efekt růstu mycelia *Pleurotus ostreatus* a *Pleurotus cystidiosus* na různých substrátech zahrnujících piliny, kukuřičné klasy, vylisovanou cukrovou třtinu a jejich směsi v poměru 80:20 a 50:50. Výsledky ukázaly, že substráty ze 100% kukuřičných klasů a vylisované cukrové třtiny byly nejvhodnější pro růst hlívy z hlediska průměru klobouku, tloušťky třeně, hmotnosti houby a jejích obsahových látek. Nicméně u substrátu složeného pouze z vylisované cukrové třtiny trvalo nejdéle, než došlo k první sklizni (46 dnů) (Ha Thi Hoa et al., 2015).

Pokus provedený v Polsku zkoumal růst mycelia hlívy ústříčné na substrátech z pilin, obilné a rýžové slámy a meziproduktů textilního průmyslu (len a konopí). Z testovaných substrátů se jako nejvhodnější pro růst podhoubí ukázaly obilná a rýžová sláma a pazdeří lnu (Sobieralski et al, 2011).

Příprava substrátu

Pro použití slámy, jako substrátu pro pěstování hlívy ústřičné, je třeba ji nejprve namočit a poté teplotně ošetřit. Před namočením je sláma nařezána na stébla o délce 2 - 6 cm. Balíky slámy je možno nařezat na vertikálních nebo horizontálních rezačkách. Pokud je sláma nařezána na příliš drobné kousky, saje mnoho vody a substrát z ní není strukturní. Během namáčení je nutné, aby voda pronikla i do mezibuněčných prostor slámky a ne pouze na její povrch. Při máčení v mělkých bazéncích se sláma ponoří na 24 hodin do čisté vody. V bazénku se sláma nasytí vodou a vyplaví se z ní rozpustné látky, jako jsou cukry. Tyto cukry by se posléze mohly stát živinou pro ostatní konkurenční plísně. Pro použití bazénů i v zimním období je nutné, aby byly chráněny před mrazem. K máčení slámy je také možné použít betonové plochy, kde je sláma skrápěna vodou po dobu 48 - 72 hodin za stálého přehazování. Pokud je použita teplá voda, čas namáčení se zkrátí. Teplota vody by při máčení několik dnů neměla překročit 60 °C, protože by v této době mohly narůst některé konkurenční mikroorganismy. Vlhkost slámy vhodná k teplotnímu ošetření je 70 - 76% vody (Jablonský a Šašek, 2006).

Dalším procesem při přípravě substrátu pro hlívu ústřičnou je likvidace zárodků ostatních konkurenčních hub. K této likvidaci se ve světě používá několik typů teplotních ošetření a to, sterilizace, semistrerilizace, pasterizace a řízená fermentace (Jablonský a Šašek, 2006).

Při sterilizaci je nutné dosáhnout teploty 110 – 115 °C, aby došlo ke zničení vegetativních i klidových stádií konkurenčních hub ve všech částech substrátu. Doba sterilizace se liší podle množství a druhu materiálů. Během sterilizace nedochází ke ztrátám sušiny a proces trvá pouze několik hodin. Nevýhodou sterilizace je potřeba tlakových nádob (autoklávů) a energetická náročnost. Tato metoda se používá v asijských zemích pro sterilizaci substrátu v malých polypropylenových sáčcích (Jablonský a Šašek, 2006).

Metoda pasterizace probíhá v tunelech vybavených přívodem páry. Při plnění tunelů je důležité vytvořit vrstvu všude stejně vysokou, aby vzduch neunikal nižší vrstvou substrátu. Ke spolehlivému průběhu pasterizace je

nutné, aby měl substrát ve všech místech stejnou vlhkost, protože vzduch proniká sušším substrátem než vlhčím (Jablonský a Šašek, 2006).

Rozdílem mezi pasterizací a semisterilizací je podle použité teploty a doby trvání. Při pasterizaci dochází k ošetření po dobu 24 - 48 hodin při 60 - 70 °C. Semisterilizace probíhá při 80 - 100 °C po dobu 2 hodin. Pokud jsou tyto hodnoty dodrženy, dochází ke spolehlivému zničení vegetativních forem konkurenčních hub a likvidaci větší části spor (Jablonský a Šašek, 2006).

V praxi se uplatňují dvě metody pasterizace substrátu. Při takzvané „rychlé“ pasterizaci je substrát zahříván na teplotu 58 - 60 °C po dobu 18 - 21 hodin. K zahřátí na výslednou teplotu by mělo dojít během 5 - 6 hodin, je proto důležité tomu přizpůsobit výběr vhodného zařízení. Po ukončení pasterizace se substrát nechá přirozeně zchladnout na 43 °C. Po dosažení této teploty se substrát prudce zchladí na 25 °C. Celková doba tohoto ošetření trvá 4 dny. Druhá metoda je kombinace pasterizace s „kondicionací“. Při použití této metody se substrát zahřeje na teplotu 60 °C po dobu 8 - 10 hodin, poté se teplota sníží na 48 - 52 °C. Při této teplotě je podpořen rozvoj termotolerantních hub a aktinomycet, které spotřebují všechny rozpustné cukry, a tím je vytvořen substrát, který je lépe chráněn před rozvojem konkurenčních plísní. V době rozvoje těchto hub je nutné větrat a dodávat kyslík a podle potřeby udržovat teplotu v žádaném rozmezí regulovaným přívodem páry (Jablonský a Šašek, 2006).

Sadba a prorůstání substrátu

K intenzivnímu pěstování hlívy ústříčné se používá sadba narostlá na zrnech pšenice, prosa a žita. Sadba k inokulaci musí být čerstvá. Skladování hotové sadby probíhá při 2 - 4 °C po dobu maximálně 2 týdnů. Při stárnutí sadby dochází ke ztrátě aktivity, která je podstatná pro rychlou kolonizaci substrátu. U výběru sadby je důležité přihlédnout k výběru kmene hlívy. Kmeny hlívy mají různé požadavky na pěstování, optimální podmínky pro tvorbu plodnic, vzhled plodnic a jiné. Optimální teplota pro inokulaci substrátu je v rozmezí 22 - 24 °C. Obvyklá dávka sadby je 2 - 3% hmotnosti hotového substrátu. Pokud je sadby přidáno více, dochází ke zvýšené aktivitě substrátu a hrozí přehřátí substrátu. Při sázení je nutné sadbu

rovnoměrně promíchat se substrátem. Podniky používají různá zařízení k osázení substrátu, jeho promíchání a zhutnění (Jablonský a Šašek, 2006).

Po naplnění pytlů a bloků je třeba folii, ve které je substrát umístěn, perforovat. Množství otvorů činí 0,5 - 1,8 % z celkové plochy bloků. Pokud je počet otvorů menší, dochází k tvorbě větších trsů. V případě, že jsou otvory příliš malé, vytvářejí se plodnice deformované. Při teplotě 24 - 28 °C prorůstá mycelium substrátem 14 - 17 dnů. Během inkubace v pěstírně má být teplota o několik stupňů nižší (18 - 20 °C). Tato nižší teplota v pěstírně zajistí, aby byla teplota substrátu ve vhodném rozmezí. Teplota substrátu nesmí překročit 30 °C. Bloky nebo pytle by se v pěstírně neměly dotýkat, jinak může dojít k přehřátí substrátu v důsledku špatné cirkulace vzduchu. Ve fázi prorůstání je nejaktivnější mycelium mezi 6.- 9. dnem (Jablonský a Šašek, 2006).

Iniciace tvorby plodnic

K zahájení tvorby primordií je třeba, aby mycelium určitou dobu zrálo. Během této doby dochází k přemístění vody a živin do vnější vrstvy substrátu. Při tomto procesu je třeba, aby došlo ke snížení teploty. Při nižší teplotě dosahují plodnice větší kvality. Do doby, než se začnou objevovat zárodky plodnic, se relativní vlhkost udržuje v rozmezí 70 - 75% a během vývoje plodnic se zvýší na 85 - 90%. Před sklizní se u zrajících plodnic snižuje vlhkost na 80%. Příliš velká vlhkost v době sklizně způsobuje slizké a vlhké plodnice, které mají kratší dobu trvanlivosti. Ve vlhkém prostředí také může dojít k rozvoji bakteriózy (*Pseudomonas* sp.), která způsobuje oranžové až hnědé skvrny na plodnicích. Naopak nízká vlhkost způsobuje praskání okrajů hub a zasychání zárodků. Vlhkost lze zvýšit různými typy zvlhčovačů, které se umístí do rozvodů vzduchu. U lépe vybavených pěstíren se používá automatická regulace vlhkosti, která za pomoci čidel ovládá vlhkost vzduchu (Jablonský a Šašek, 2006).

Při pěstování hlívy je důležitá i koncentrace CO₂. V období sklizně by koncentrace CO₂ neměla být vyšší než 800 ppm. Pokud je koncentrace 1500 -1800 ppm tvoří se deformované zárodky, které se dále nevyvíjejí. Intenzita výměny vzduchu je závislá na množství substrátu v kóji, teplotě a vývojové

fázi houby. Pokud je teplota vyšší, intenzivnější dýchání mycelia vyžaduje větší výměnu vzduchu. Kvalita plodnic je také ovlivňována rychlostí proudění vzduchu. Při vyšší vlhkosti vzduchu je možné rychlejší proudění vzduchu v pěstírně. Při hodnotě 85% vlhkosti vzduchu by rychlost proudění na povrchu plodnice neměla překročit 6 - 8 cm za sekundu (Jablonský a Šašek, 2006).

V průběhu nasazování plodnic je důležité nastavit optimální intenzitu osvětlení. Osvětlení by mělo být v pěstírně umístěno minimálně 90 - 100 cm nad poslední vrstvou substrátu. Na 4 m² se instaluje jedna zářivka o výkonu 40 W. Doba osvětlení, by neměla být kratší než 12 hodin za den (Jablonský a Šašek, 2006).

Plodnice rostou a sklízí se v trsech rostoucích taškovitě nad sebou. Jejich velikost závisí na počtu otvorů v bloku nebo pytli. Při menším počtu je velikost větší a naopak. Sklízí se ve vlnách. První sklizeň probíhá po 12 dnech od nasazení primordií. Plodnice se sbírají podle jejich vzhledu, a ne podle velikosti. Plodnice vhodné ke sklizni mají podvinutý okraj klobouku. Pokud jsou plodnice přezrálé, klobouk má nálevkovitý tvar a bývá porostlý bílým myceliem. Sklizeň probíhá většinou ve dvou vlnách a poté se substrát využívá k dalším účelům. Výnos druhé vlny bývá oproti první vlně menší. Pouze pokud byly podmínky během fruktifikace horší během první vlny, výnos druhé vlny je vyšší (Jablonský a Šašek, 2006).

3.3 Rod *Bacillus*

3.3.1 Taxonomické zařazení

Říše:	Bakteria
Kmen:	Firmicutes
Třída:	Bacilli
Řád:	Bacillales
Čeleď:	Bacillaceae
Rod:	<i>Bacillus</i>

(Ehrenberg, 1835; Cohn, 1872)

3.3.2 Rod *Bacillus*

Rod *Bacillus* je rozsáhlý a jeho druhy jsou v přírodě velmi rozšířeny. Druhy rodu *Bacillus* díky produkci enzymů dobře rozkládají nejrůznější organické sloučeniny. Většina druhů má amylolytické enzymy štěpící škrob. Mnohé druhy mají pektolytické enzymy, které štěpí rostlinné pektiny. Většina druhů rodu *Bacillus* má velmi aktivní proteolytické enzymy, které se uplatňují při aerobním a anaerobním rozkladu bílkovin. Některé druhy produkují polypeptidová antibiotika, z nichž některá se díky těmto bakteriím vyrábějí průmyslově. Jiné druhy vytvářejí slizovitá pouzdra polysacharidové povahy, které způsobují nitkovitost pečiva, která je nežádoucí. Některé druhy rodu *Bacillus* se využívají pro průmyslovou výrobu enzymů. Bakteriální amylasy, které jsou získané z *Bacillus subtilis*, se používají v pivovarnictví. V textilním průmyslu se využívají proteínasy, a to zejména do pracích prostředků (Demain, A. L., Vanishav, P., 2009).

Rod *Bacillus* je grampozitivní, někdy může vykazovat reakci gramnegativní nebo proměnlivou. Vegetativní buňky jsou aerobní, peritrichní tyčinky, které jsou rovné a mají oblé nebo hranaté zakončení. Velikost je 0,5 x 10² μm až 2,5 x 10 μm. Buňky jsou jednotlivé nebo tvořící řetízky o počtu až stovek buněk. V cytoplazmě jsou zřetelné globule kyseliny polyhydroxymáselné. Spory mají většinou cylindrický, elipsoidní nebo

sférický tvar, některé kmeny jsou ledvinovité. Každý druh má typické umístění spory ve sporangiu, a také je pro každý druh typické zda je sporangium zduřelé (Demain, A. L., Vanishav, P., 2009).

Do rodu *Bacillus* patří *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, Druh *Bacillus marcescens*, *Bacillus subtilis* a *Bacillus thuringiensis* (Demain, A. L.; Vanishnav, P., 2009).

3.3.2.1 Bacillus subtilis

Bacillus subtilis je grampozitivní aerobní bakterie, která sporuluje. Nachází se v půdě, potravinách a vodě. *Bacillus subtilis* je nepatogenní. Tvoří tyčinky a jeho spory jsou oválné nezduřující buňky. Velikost buňky 2 – 3 x 0,7 – 0,8 μm. *Bacillus subtilis* má chemoorganotrofní výživu. Nejvhodnější teplota pro kultivaci je 30 °C (Demanin, A. L.; Vanishnav, P., 2009).

Bacillus subtilis je bakterie odolná extrémním teplotám, díky tomu zvládne vysoké teplotní úpravy. Je předpokládáno, že tato všudypřítomná bakterie se v prostředí nachází neaktivně ve formě spor. Aktivní bakterie produkuje řadu enzymů. Jeden z těchto enzymů se podílí na degradaci lignocelulózního materiálu. V současné době se používá jako fungicidní přípravek pro okrasné rostliny a semena, a také v zemědělství (Kirk, 2009).

Bacillus subtilis také podporuje růst rostlin. Tato bakterie vytváří hrubé biofilmy, které jsou organické komunity na rozhraní vzduchu a vody. Biofilmy, které *Bacillus subtilis* tvoří, umožňují kontrolu infekcí rostlinných patogenů. Tato bakterie preemptivně kolonizuje substrát, což zabraňuje jiným patogenům v jeho napadení (Larsen, 2013).

Dále se *Bacillus subtilis* využívá v biologické ochraně rostlin, která snižuje zátěž životního prostředí na základě využití biologických antagonistických preparátů, jako je např. Ibefugin (Hýsek a kol., 2008).

3.3.2.2 Bacillus licheniformis

Bacillus licheniformis je gram pozitivní bakterie tyčinkového tvaru. Tato bakterie je fakultativně anaerobní, nachází se nejčastěji v půdě a to ve formě spor (http://web.mst.edu/~microbio/BIO221_2005/B_licheniformis.htm).

Velikost bakterie je 1,5 – 3,0 x 0,6 – 0,8 μm . Spory jsou eliptické nebo cylindrické, centrální, paracentrální nebo subterminální, tobolka není přítomna. Vhodná teplota je od 15 – 55 °C. Kolonie jsou kruhové až nepravidelné s okraji vlnitými až vláknitými. Barva kolonie je bílá až hnědá (<http://www.tgw1916.net/Bacillus/licheniformis.html>).

Bacillus licheniformis se využívá k biologické ochraně rostlin před houbovými patogeny. Bakterie produkuje antibiotika, která působí proti plísním. *Bacillus licheniformis* se využívá proti chorobám způsobujícím listové skvrnitosti. Nedoporučuje se jeho použití, pokud je rostlina dále využita jako krmivo pro zvířata nebo jako potravina (http://web.mst.edu/~microbio/BIO221_2005/B_lichenformis.htm).

Bakterie se využívá v průmyslové výrobě enzymů, a to zejména alfa – amyláz a proteáz. Enzymy jsou vyráběny za pomoci fermentace. Tyto enzymy se přidávají do čisticích prostředků s cílem zvýšit jejich účinnost. Enzymy získané z *Bacillus licheniformis* mají oproti jiným výhodu, že velmi dobře fungují v teplém alkalickém prostředí, které u pracích prostředků je. Dále se *Bacillus licheniformis* využívá k výrobě polypeptidového antibiotika bacitracin. Bacitracin je účinný zejména proti gram pozitivním bakterií a využívá se při léčbě drobných poranění, aby bylo zabráněno rozvoji infekcí (http://web.mst.edu/~microbio/BIO221_2005/B_lichenformis.htm).

3.3.2.3 **Bacillus macerans - Paenibacillus macerans**

Taxonomické zařazení

Říše:	Bakteria
Kmen:	Firmicutes
Třída:	Bacilli
Řád:	Bacillales
Čeleď:	Paenibacillaceae
Rod:	Paenibacillus Ash et al. 1994
Druh :	Paenibacillus macerans

Paenibacillus macerans je gram variabilní tyčinka, která má peritrichní bičíky. Velikost bakterie je 2,5 – 5 µm x 0,5 – 0,7 µm. Spory *Paenibacillus macerans* jsou subterminální, terminální a elipsoidní. Tobolka se nevyskytuje. Optimální teplotou pro růst je 30 °C. Bakterie je přítomna v půdě a rostlinných materiálech. Spory mohou přetrvávat v půdě po mnoho let. Produkce velkého množství histaminu může u lidí způsobovat alergické reakce (<http://www.tgw1916.net/Bacillus/macerans.html>).

3.3.2.4 **Využití bakterií při pěstování jedlých hub**

Při pěstování jedlých hub může být v různých fázích využito bakterií. V pokusech bylo zjištěno, že po přidání *Pseudomonas* spp. při pěstování *Pleurotus ostreatus* byla podpořena tvorba primordií (Cho et al., 2002).

V laboratorních podmínkách bylo zjištěno, že *Bacillus subtilis* a *Bacillus amyloliquefaciens* jsou antagonistické k *Trichoderma pleuroti* a zároveň nebyl negativně ovlivněn růst *Pleurotus ostreatus* (Nagy et al., 2012).

Pleurotus ostreatus je nejčastěji pěstován na slámových substrátech, které jsou fermentované při teplotě 50 – 55 °C po dobu 2 dnů. U takto připravených substrátů jsou přítomny termofilní bakterie rodu *Bacillus*. Pokud byla doba fermentace prodloužena na 4 – 7 dnů byl substrát osídlen termofilními aktinomycety, které rozkládají celulózu. U substrátů s vlhkostí

vyšší než 72% byl počet bakterií vyšší a počet plísní nižší, než u substrátů s nižší vlhkostí. Při přidání *Bacillus macerans* před fermentací kontaminovaného plísněmi se počet plísní snížil a výnos *Pleurotus ostreatus* zvýšil (Staněk a Bisko, 1982).

Velazquez-Cedeño et al. (2008) zkoumali v laboratorních podmínkách roli *Bacillus* spp. jako antagonisty mezi *Pleurotus ostreatus* a *Trichoderma harzianum* na tepelně ošetřeném substrátu ze slámy. *Bacillus* spp. inhiboval svou zvýšenou enzymatickou aktivitou *Trichoderma harzianum* a stimuloval obranyschopnost *Pleurotus ostreatus*.

Antagonistický účinek vůči patogenům (*Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma viridescens*) byl zkoumán u 20 izolátů *Bacillus* ssp., které byly získány ze statkových hnojiv. Kvůli existenci možnosti, že *Bacillus* ssp. může ovlivňovat růst některých hub, byl zkoumán antagonismus i mezi těmito druhy (*Flammulina vultipes*, *Lentilnula edodes* a *Pleurotus ostreatus*). Z 20 izolátů *Bacillus* ssp. dva inhibovaly růst *Trichoderma harzianum*, sedm *Trichoderma koningii* a osm *Trichoderma viridescens*. Izoláty M27 a RM29 silně inhibovaly růst mycelia všech *Trichoderma* ssp.. Posléze byl izolát M27 označen jako nejúčinnější při omezování růstu mycelia všech zkoumaných druhů *Trichoderma*. Dále bylo zjištěno, že většina izolátů *Bacillus* ssp., kromě 5T33, přinejmenším z části inhibuje růst mycelia některého ze tří druhů zkoumaných hub. Inhibice růstu se měnila v závislosti na druhu houby, což poukazuje na roli druhu hub při mechanismu inhibice. Izoláty M27 a RM29 byly určeny jako druhy s největším antagonismem vůči *Trichoderma* ssp. a také vůči všem třem houbám. Tento výzkum naznačil, že izoláty *Bacillus* ssp. a jejich antagonismus vůči *Trichoderma* ssp. by měly být dále zkoumány pro jejich praktické využití v biologické kontrole zelených plísní při pěstování jedlých hub (Kim et al., 2008).

4 Materiály a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Agarová živná média

Pro pokusy byl jako kultivační médium použitý sladínový a slámový agar, nalitý do Petriho misek.

Sladínový agar 2%

20 g agar

20 g sladina

1000 ml destilovaná voda

Úprava pH na hodnoty 7,0 a 8,0

Sterilizace média 20 minut při teplotě 110 °C

Slámový agar

20 g agar

20 g slámový extrakt

1000 ml destilovaná voda

Úprava pH na hodnoty 7,0 a 8,0

Sterilizace média 20 minut při teplotě 110 °C

Medium 10 - BACILLUS MEDIUM

5 g Peptone

3 g Beef extract

0,01 g MnSO₄.H₂O

20 g Agar

1000 ml Destilovaná voda

Úprava pH na hodnotu 7,0

Sterilizace média 20 minut při teplotě 110 °C

4.1.2 Pelety

Při pokusech byly použity slaměné tlakem lisované pelety používané pro pěstování hub rodu *Pleurotus*.

Pelety byly zality teplou vodou, promíchány a ponechány k nasáknutí. Po zchladnutí byly plněny do PE rukávů, Omnia sklenic, zkumavek a kbelíků.

4.1.3 Použité organismy

Pleurotus ostreatus P35

Pleurotus eryngii

Trichoderma pleuroti

Bacillus subtilis

4.1.4 Propařovací komora

Propařovací komora je zhotoven z PUR panelů o síle 70 mm. Vnitřní plocha komory je z nerezového plechu. Jednotlivé panely komory jsou spojeny L profily. Komora je opatřena kolečky. Uvnitř komory se nachází konstrukce s výstupky, na kterých je umístěno 7 podlažek ze sítě umožňující přístup páry mezi podlažími. Do jednoho podlaží je možné umístit 12 kbelíků se substrátech o obsahu 3500 ml. Celkový počet kbelíků, které se dají do komory umístit je 96 po 3 kg. Celkové množství substrátu, které je možno ošetřit je 288 kg.

Komora je uzavřena deskou s panty a celý prostor okolo dveří je parotěsně uzavřen. Do komory je zaveden přívod páry z vyvíječe. Shora je do komory umístěn rotor ventilátoru, který zajišťuje promíchávání vzduchu uvnitř komory.

K zajištění teploty uvnitř propařovací komory je použit zdroj o výkonu 12 kW.

4.2 Metody

V diplomové práci Studium tolerance vybraných kmenů *Pleurotus ostreatus* vůči *Trichoderma pleuroti* bylo provedeno 5 pokusů, které se zabývaly problematikou vlivu *Pleurotus ostreatus* na kolonizaci substrátu *Trichoderma pleuroti*.

Reinfekce substrátu z pelet *Trichoderma pleuroti*

Porovnání růstu a interakcí *Pleurotus ostreatus*, *Trichoderma pleuroti* a *Bacillus subtilis* na 2 typech kultivačních medií

Fermentace obohaceného substrátu ošetřeného v různých teplotních režimech

Inokulace různě teplotně ošetřených substrátů ze slámy

Vliv přídatku vyplozeného substrátu do namočené slámy kontaminované *Trichoderma pleuroti* při různých teplotních ošetřeních

4.2.1 Infekce substrátu z pelet houbou *Trichoderma pleuroti*

Cílem pokusu bylo zjistit, jak reaguje mycelium hlívy v substrátu infikovaném sporami *Trichoderma pleuroti* na různé teplotní ošetření.

Nesterilizované slaměné pelety byly navázeny v poměru 1 : 2,5 s vlažnou vodou. Vzniklý substrát byl naplněn do tlačenkových rukávů a umístěn do termostatu při teplotě 30 °C po dobu 3 dnů.

Substrát byl rozdělen do následujících variant:

1. Kontrolní varianta bez fermentace
2. Kontrolní varianta fermentovaná
3. Pokusná varianta s koncentrací spor *Trichoderma pleuroti*:
 - $3,68 \cdot 10^2$
 - $3,68 \cdot 10^3$
 - $3,68 \cdot 10^4$

Substrát těchto variant byl naplněn od každé varianty do 32 zkumavek (celkem 160 zkumavek). Z každé varianty bylo 16 kusů ošetřeno při teplotě 70 °C a 16 kusů při teplotě 65 °C. Po 24 hodinách bylo vyjmuto 8 zkumavek z každé varianty a zbytek byl ponechán k teplotnímu ošetření ještě dalších

24 hodin (48 hodin celkem). Po ukončení teplotního ošetření bylo 80 zkumavek inokulováno sadbou *Pleurotus ostreatus* a 80 zkumavek *Pleurotus eryngii* na povrch substrátu.

Hodnocení růstu bylo provedeno každý týden a bylo skončeno, jakmile mycelium v první zkumavce dosáhlo dna zkumavky. U *Pleurotus ostreatus* bylo provedeno měření 3 krát, u *Pleurotus eryngii* bylo provedeno měření 5 krát.

4.2.2 Porovnání růstu a interakcí *Pleurotus ostreatus*, *Trichoderma pleuroti* a *Bacillus subtilis* na 2 typech kultivačních médií v podmínkách *in vitro*

Cílem pokusu bylo porovnat růst a následné interakce *Pleurotus ostreatus*, *Bacillus subtilis* a *Trichoderma pleuroti* na sladovém agaru a agaru slámovém, který je přirozenější jejich fyziologickým požadavkům. U obou kultivačních médií bylo upraveno pH na hodnoty 7,0 a 8,0. Zmíněné organismy byly proti sobě inokulovány bodově a v případě variant s *Bacillus subtilis*, byl *Bacillus subtilis* naočkován také plošně. Jako kontrola byly hodnoceny misky s kultivačními médii s jednotlivými organismy. Misky byly umístěny v teplotě 30 °C ve tmě. Hodnoceny byly přírůstky a interakce mezi organismy. Od každé varianty bylo inokulováno 5 Petriho misek s médii.

Složení kultivačních médií:

Sladinový agar:

20 g agar

20 g sladového výtažku (Diamalt)

1000 ml voda

Slámový agar

20 g agar

20 g slámového extraktu

1000 ml vody

Varianty:

1. *Pleurotus ostreatus* bodově
2. *Trichoderma pleuroti* bodově
3. *Bacillus subtilis* bodově
4. *Bacillus subtilis* plošně
5. *Bacillus subtilis* plošně + *Trichoderma pleuroti* bodově
6. *Bacillus subtilis* bodově + *Trichoderma pleuroti* bodově
7. *Bacillus subtilis* bodově + *Pleurotus ostreatus* bodově
8. *Bacillus subtilis* plošně + *Pleurotus ostreatus* bodově
9. *Trichoderma pleuroti* + *Pleurotus ostreatus*

4.2.3 Fermentace obohaceného substrátu ošetřeného v různých teplotních režimech

Cílem pokusu bylo ověřit případný efekt fermentace substrátu (slaměných pelet) na rychlost růstu podhoubí *Pleurotus ostreatus*. K přípravě byly použity slaměné pelety, pšeničné otruby a voda. Varianty substrátu byly rozděleny na polovinu, jedna polovina byla podrobena fermentaci při 30 °C po dobu 3 dnů, druhá polovina zůstala nefermentovaná. Dále byly všechny varianty ošetřeny při 90 °C. Po teplotním ošetření byl substrát plněn do Omnia sklenic a 2500 ml kbelíků. Od každé varianty bylo naplněno 5 kbelíků a 5 Omnia sklenic. Hodnoceny byly přírůstky mycelia za týden, měření bylo provedeno dvakrát. Byla také stanovena sušina u substrátů a průběh teploty fermentace pomocí datalogerů.

Složení substrátu:**Kontrolní varianta:**

40% slaměné pelety

60% voda

Pokusná varianta:

27% slaměné pelety

13% pšeničné otruby

60% voda

4.2.4 Růst mycelia *Pleurotus ostreatus* na různě ošetřených substrátech ze slámy inokulovaných substrátem kontaminovaným *Trichoderma pleuroti*

V pokusu s kultivací *Pleurotus ostreatus* byla použita sláma namočená na 75% vlhkost za přídavku 10% substrátu kontaminovaného *Trichoderma pleuroti*. Jako kontrola byla použita sláma neinfikovaná *Trichoderma pleuroti*.

Varianty:

A: Namočená a nařezaná sláma byla smíchána s 10% substrátu inokulovaného *Trichoderma pleuroti* a podrobena fermentaci. Fermentace proběhla při 30 °C po dobu 3 dnů. Po ukončení fermentace byl substrát plněn do kbelíků o obsahu 450g s víčkem. Celkem bylo naplněno 40 kbelíků, ty byly rozděleny po 10 kusech a byly podrobeny teplotnímu ošetření na 60 °C, 65 °C a 70 °C. Dále byla naplněna kontrolní varianta, která nebyla podrobena teplotnímu ošetření.

B: Substrát ze slámy a kontaminovaného substrátu nebyl podroben fermentaci. Bylo plněno 40 plastových kbelíků o obsahu 850g s víčkem. Kbelíky byly rozděleny po 10 kusech a podrobeny teplotnímu ošetření jako varianta A.

C: Substrát nebyl inokulován *Trichoderma pleuroti*. Po naplnění do kbelíků o obsahu 850g byl podroben stejnému teplotnímu ošetření jako varianty A a B.

Po teplotním ošetření byla polovina kbelíků (5 ks od každé varianty) osázena na povrch sadbou *Pleurotus ostreatus*. Druhá polovina kbelíků zůstala bez osázení. Vše bylo inkubováno při teplotě 24 °C světelného režimu

12 hodin tma a 12 hodin světlo. Po 7 a 14 dnech byl vyhodnocen růst mycelia *Pleurotus ostreatus* a případný výskyt *Trichoderma pleuroti*.

Po vyhodnocení růstu mycelia *Pleurotus ostreatus* bylo několik stébel (4 – 5 ks) přeneseno na Petriho misky se sladinovým agarovým médiem (z 1 kbelíku 3 misky). Po týdnu kultivace ve 24 °C ve tmě byla vyhodnocena přítomnost hub, případně bakterií.

4.2.5 Vliv přídavku vyplozeného substrátu do namočené slámy kontaminované *Trichoderma pleuroti* při různých teplotních ošetřeních

Cílem pokusu bylo zjistit vliv přídavku vyplozeného substrátu do namočené slámy kontaminované *Trichoderma pleuroti*. K čisté namočené slámě byl přidán substrát kontaminovaný *Trichoderma pleuroti* v množství 5 váhových %. Všechny varianty pokusu byly plněny do plastových kbelíků o objemu 2500 ml. Od každé varianty bylo plněno 5 kbelíků. Hodnoceny byly přírůstky mycelia hlívy ústříčné a případný výskyt kolonií *Trichoderma pleuroti*. Po skončení kolonizace substrátů myceliem *Pleurotus ostreatus*, byly ze všech variant odebrány slámky, které byly přeneseny na agarové kultivační médium. Z každého kbelíku byly odebrány slámky z prorostlé (2 misky) a neprorostlé (2 misky) části substrátu.

Varianty:

1: K namočené slámě byl přidán kontaminovaný substrát *Trichoderma pleuroti* (5 váhových %) a poté byl substrát fermentován při 30 °C po dobu 4 dnů. Po fermentaci proběhlo teplotní ošetření při 70 °C po dobu 24 hodin.

2: K namočené slámě byl přidán substrát kontaminovaný *Trichoderma pleuroti* (5 váhových %) a substrát byl podroben fermentaci při 30 °C po dobu 4 dnů. Po fermentaci byl přidán vyplozený substrát hlívy ústříčné. Poté byl substrát podroben teplotnímu ošetření při 70 °C po dobu 24 hodin.

3: K namočené slámě byl přidán výluh z kontaminovaného substrátu *Trichoderma pleuroti* (5 váhových %). Substrát byl fermentován při 30 °C po

dobu 4 dnů. Po fermentaci byl substrát podroben teplotnímu ošetření při 70 °C po dobu 24 hodin.

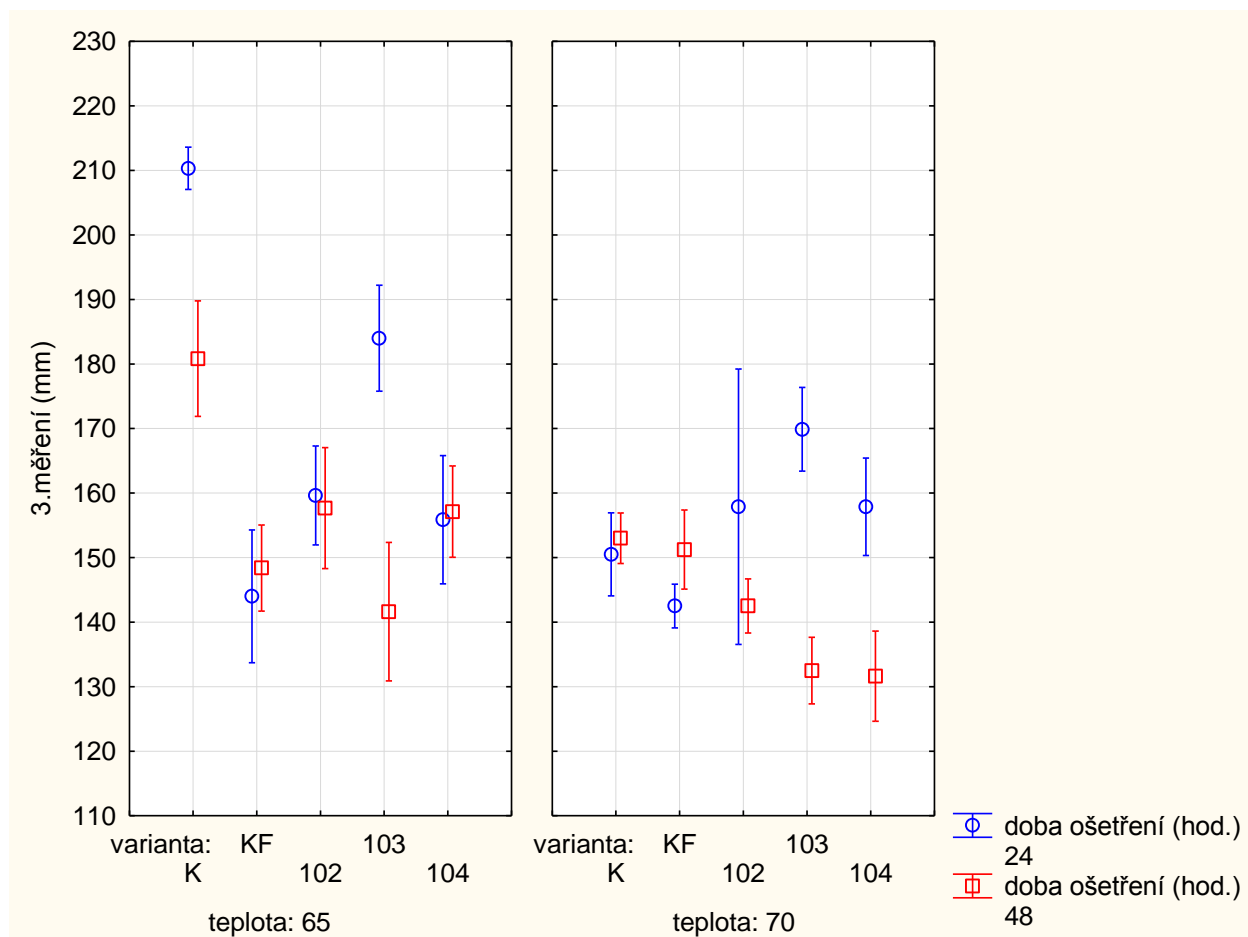
4: K namočené slámě byl přidán vyplozený substrát hlívy ústříčné (5 váhových %) a substrát kontaminovaný *Trichoderma pleuroti* (5 váhových %). Substrát nebyl dále fermentován, ale byl podroben teplotnímu ošetření při 70 °C po dobu 24 hodin.

5: Kontrola – fermentovaná sláma bez teplotního ošetření.

Všechny varianty byly po teplotním ošetření inokulovány sadbou hlívy ústříčné (kmen 35) na povrch substrátu.

5 Výsledky

5.1 Infekce substrátu z pelet houbou *Trichoderma pleuroti*



Graf: Přirůstky mycelia *Pleurotus ostreatus* v závislosti na teplotě a koncentraci spor *Trichoderma pleuroti*

Legenda:

K: kontrola

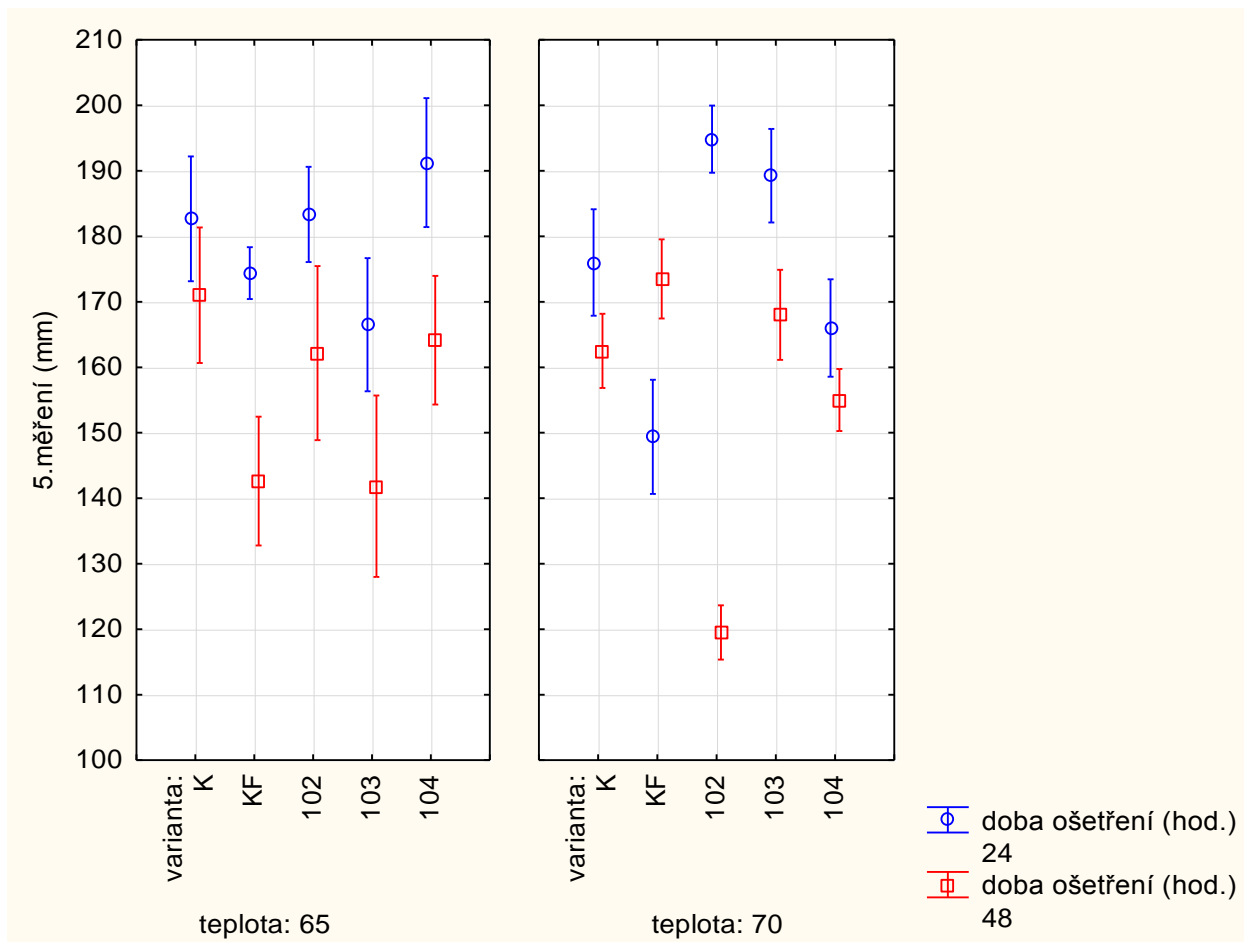
KF: kontrola fermentovaná

10²: nejnižší koncentrace spor

10³: střední koncentrace spor

10⁴: nejvyšší koncentrace spor

Z výsledků pokusu vyplývá, že největších přírůstků dosáhlo mycelium hlívy ústříčné v kontrolní variantě při ošetření 65 °C po dobu 24 hodin. Nejmenších přírůstků dosáhlo mycelium hlívy ústříčné u kontrolní varianty fermentované při všech variantách teplotního ošetření.



Graf: Přírůstky mycelia *Pleurotus eryngii* v závislosti na teplotě a koncentraci spor *Trichoderma pleuroti*

Legenda:

K: kontrola

KF: kontrola fermentovaná

10²: nejnižší koncentrace spor

10³: střední koncentrace spor

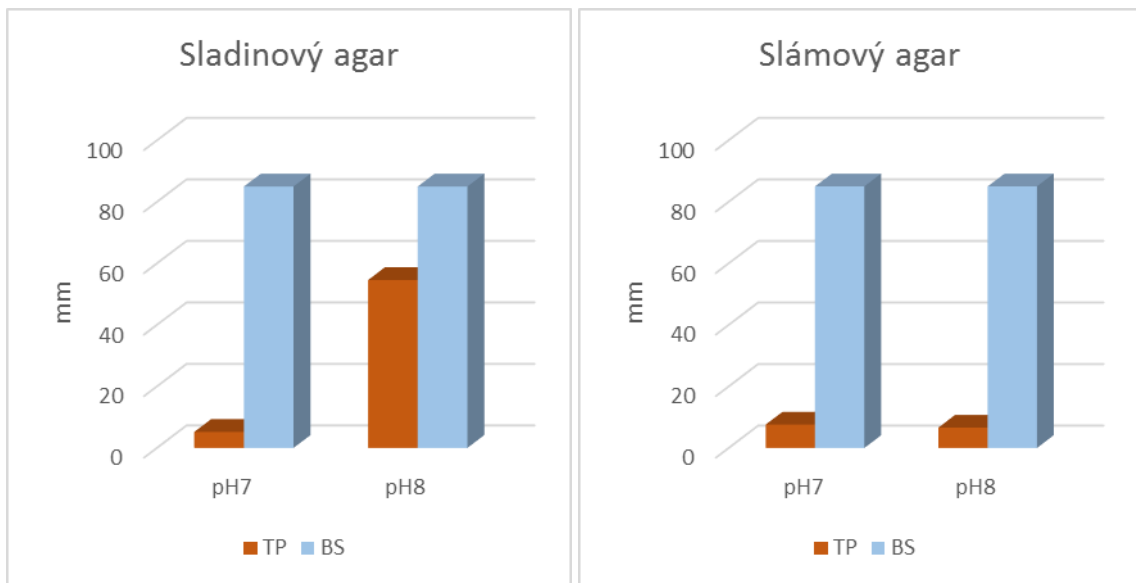
10⁴: nejvyšší koncentrace spor

V případě vyhodnocení růstu mycelia hlívy královské dosáhlo největšího přírůstku u varianty s nejnižší koncentrací spor *Trichoderma pleuroti* ošetřené při 70 °C po dobu 24 hodin. Ve většině variant byl větší přírůstek u ošetření po dobu 24 hodin než 48 hodin.

5.2 Porovnání růstu a interakcí *Pleurotus ostreatus*, *Trichoderma pleuroti* a *Bacillus subtilis* na dvou typech kultivačních médií v podmínkách *in vitro*

Z uvedeného pokusu vyplynulo, že u bodově naočkovaného *Bacillus subtilis* dosahovali kolonie většího průměru na sladínovém než na slámovém agaru. Kolonie byly větší při pH 7,0 než při hodnotě pH 8,0. V případě *Pleurotus ostreatus* byl větší nárůst kolonií na sladínovém agaru a také při pH 7,0. Kolonie *Trichoderma pleuroti* dorostly k okrajům Petriho misky v některých případech již při prvním měření. U varianty plošné inokulace *Bacillus subtilis* a bodového naočkování *Trichoderma pleuroti* rostla *Trichoderma pleuroti* pomaleji než při samostatném růstu. Na sladínovém agaru byly kolonie větší než na slámovém agaru, a také při pH 7,0 rostly kolonie *Trichoderma pleuroti* rychleji než při pH 8,0. Při bodové inokulaci *Trichoderma pleuroti* a *Bacillus subtilis* proti sobě došlo k tvorbě baráží mezi jednotlivými organismy, po 7 dnech *Trichoderma pleuroti* přerostla *Bacillus subtilis*. U varianty plošné inokulace kulturou *Bacillus subtilis* a bodového naočkování *Pleurotus ostreatus* byl růst hlívy pomalejší než při samostatném růstu. Větších kolonií dosáhla kultura *Pleurotus ostreatus* na sladínovém agaru a také při pH 7,0. Při bodové inokulaci *Pleurotus ostreatus* a *Bacillus subtilis* přerostla kolonie hlívy *Bacillus subtilis*. U varianty bodové inokulace *Trichoderma pleurotus* a *Pleurotus ostreatus* došlo k tvorbě baráží mezi kulturami, po 7 dnech přerostla *Trichoderma pleuroti* kolonie hlívy.

Z celkového pohledu vyplývá, že na sladínovém agaru dosahovaly jednotlivé kultury většího průměru kolonií než na slámovém agaru. Také bylo vidět, že kolonie dosahovaly větších přírůstků při pH 7,0 než při hodnotě pH 8,0.

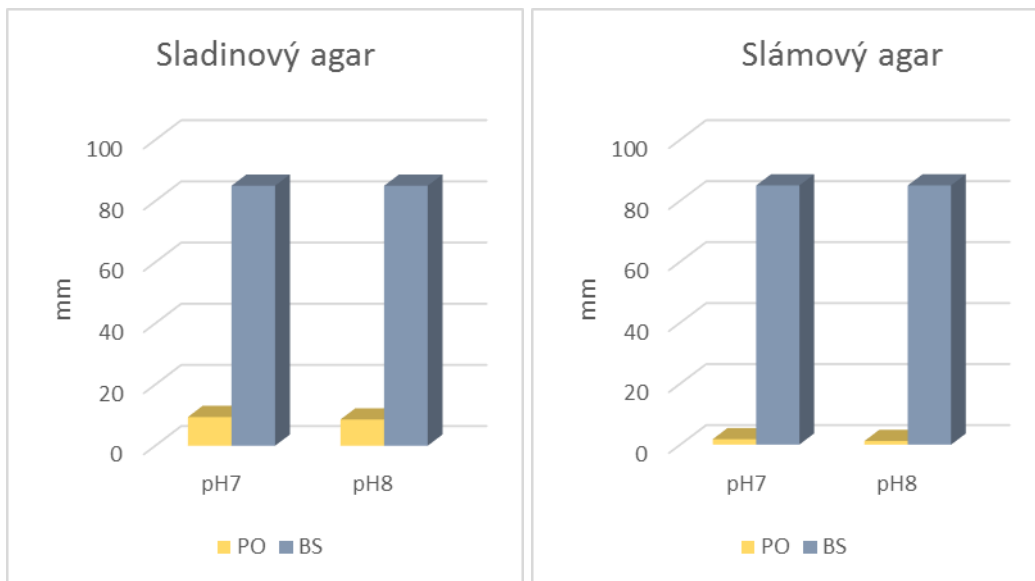


Graf: Příkladky u plošně inokulovaného *Bacillus subtilis* a bodově inokulované *Trichoderma pleuroti* na dvou kultivačních médiích

Legenda:

TP: *Trichoderma pleuroti*

BS: *Bacillus subtilis*



Graf: Příkladky u plošně inokulovaného *Bacillus subtilis* a bodově inokulované *Pleurotus ostreatus* na dvou kultivačních médiích

Legenda:

PO: *Pleurotus ostreatus*

BS: *Bacillus subtilis*

V grafech je vidět, že přítomnost plošně inokulovaného *Bacillus subtilis* výrazně zpomalila růst *Trichoderma pleuroti*, ale také *Pleurotus ostreatus*, Oproti tomu kontrolní varianty jednotlivých organismů dosahovali větších

přírůstků a také varianty inokulované proti sobě bodově dosahovaly větších přírůstků, než varianty s plošnou inokulací *Bacillus subtilis*.

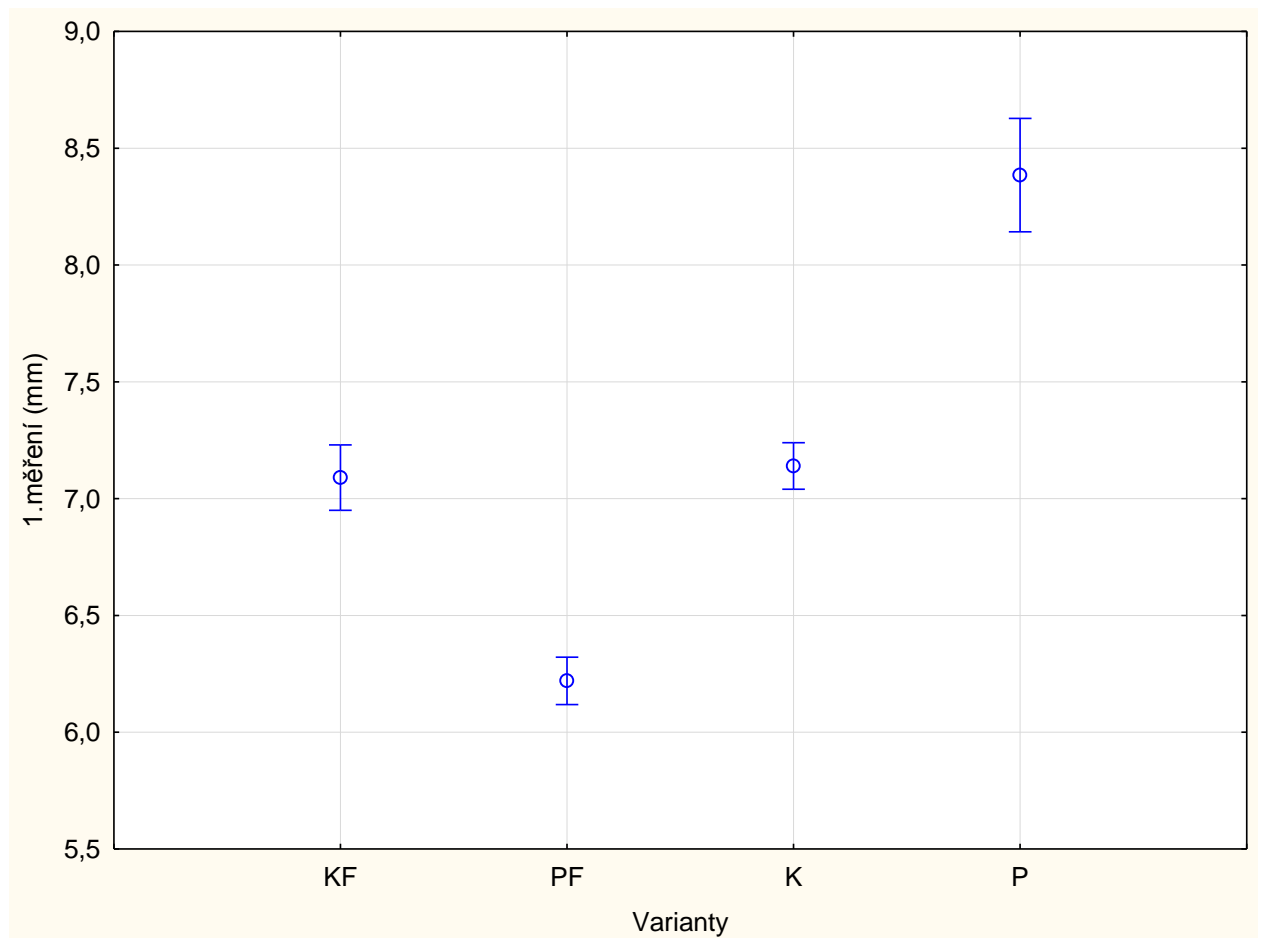
5.3 Fermentace obohaceného substrátu ošetřeného v různých teplotních režimech

Nejvyšších přírůstků bylo dosaženo u obohaceného nefermentovaného substrátu. Nejpomalejší růst mycelia byl zaznamenán u obohaceného fermentovaného substrátu. Přírůstky mycelia na kontrolním fermentovaném a kontrolním nefermentovaném (neobohaceném) substrátu byly na stejné úrovni.

Před fermentací bylo zjištěno procento vody u obohaceného a neobohaceného substrátu.

Obohacený substrát: 69,5 % vody

Neobohacený substrát: 66,1 % vody



Graf: Přírůstky mycelia *Pleurotus ostreatus* při různých variantách ošetření obohaceného a neobohaceného substrátu

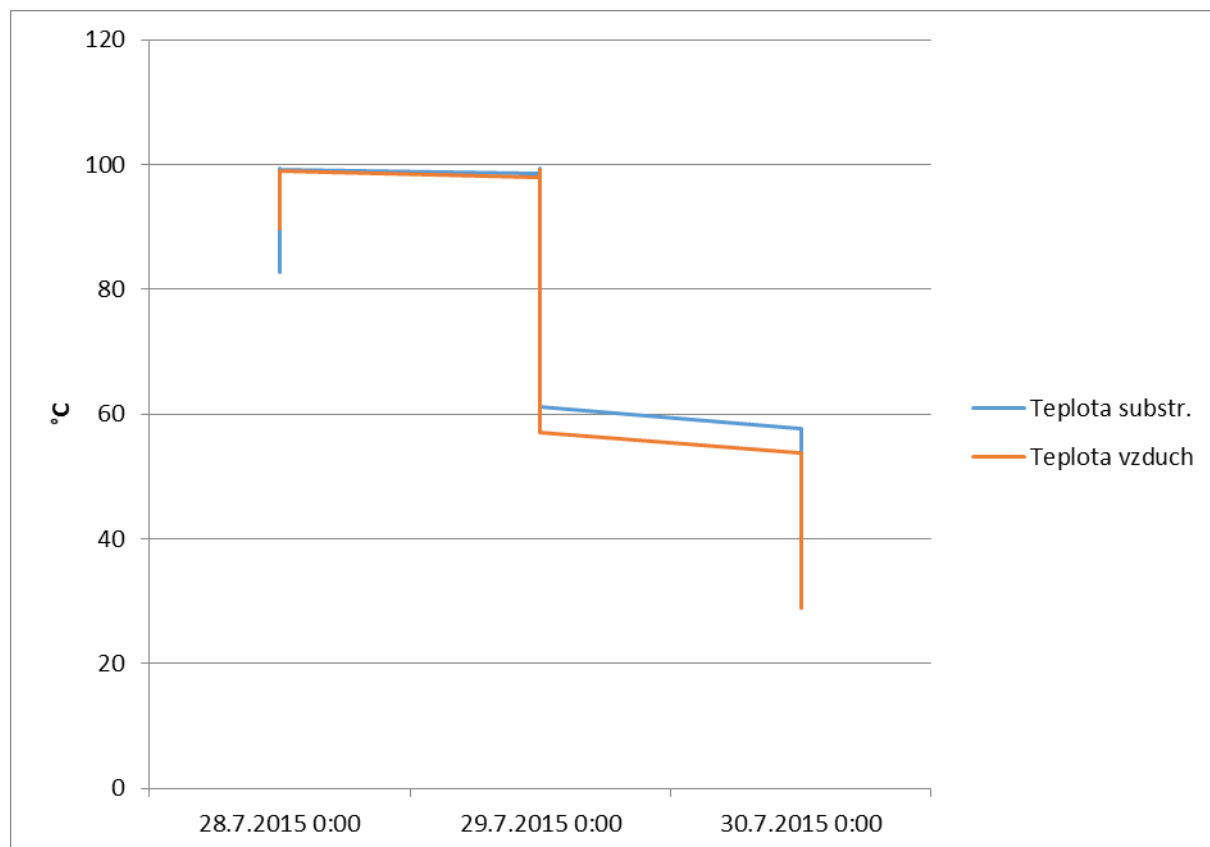
Legenda:

KF: neobohacený fermentovaný substrát

PF: obohacený fermentovaný substrát

K: neobohacený nefermentovaný substrát

P: obohacený nefermentovaný substrát

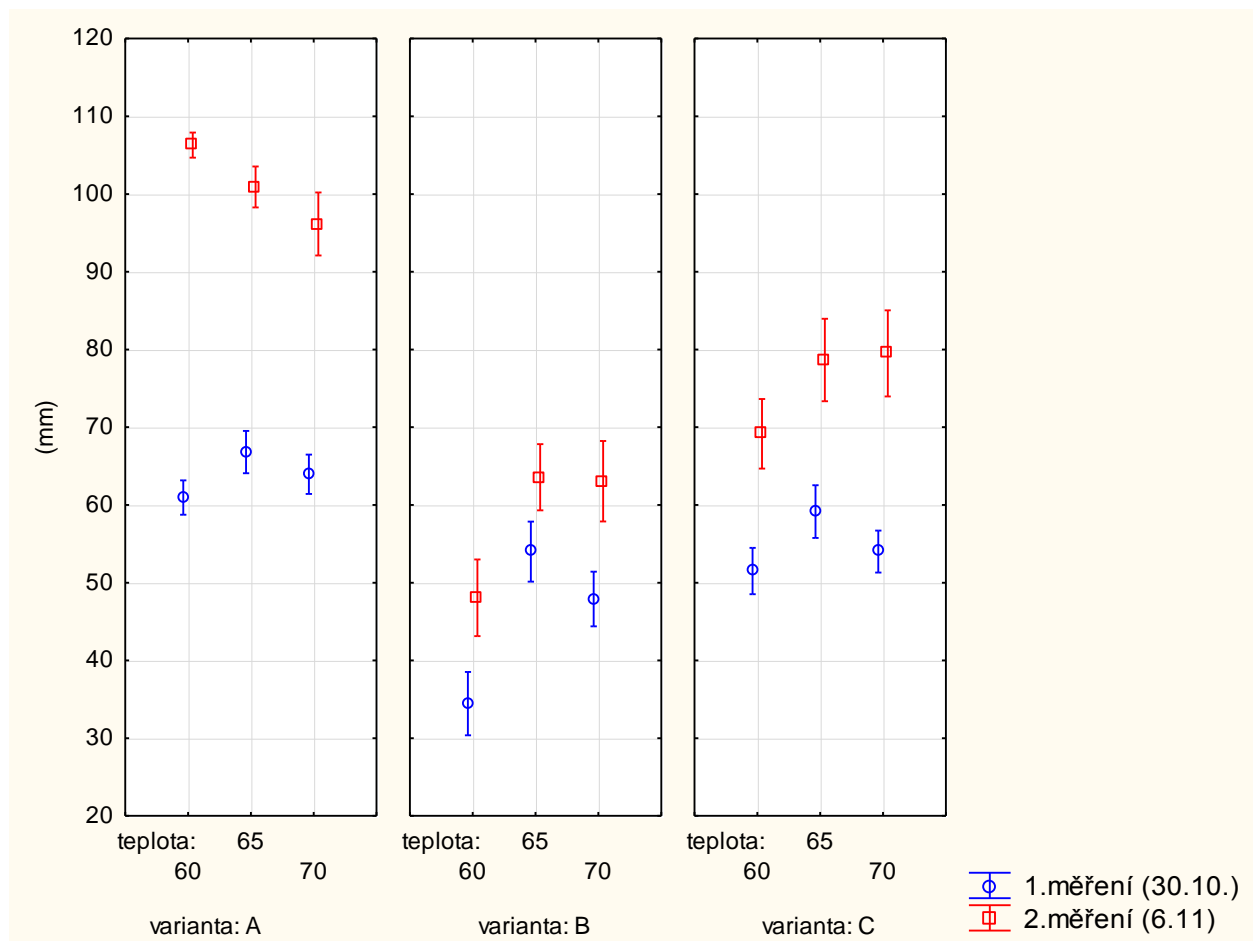


Graf: průběh teploty během teplotního ošetření

5.4 Růst mycelia *Pleurotus ostreatus* na různě ošetřených substrátech ze slámy inokulovaných substrátem kontaminovaným *Trichoderma pleuroti*

Bylo zjištěno, že nejvyšších přírůstků dosáhla hlíva ve fermentovaném substrátu, přičemž nejrychlejší růst byl zaznamenán při ošetření teplotou 60 °C. Nefermentovaným substrátem ošetřeným jednou ze tří zvýšených teplot (60 °C, 65 °C a 70 °C) prorůstalo mycelium nejpomaleji, protože v průběhu kolonizace se projevila přítomnost *Trichoderma pleuroti*. Výsledky

dokázaly, že u všech teplotních ošetření byla *Trichoderma pleuroti* přítomna. V kontrolní neinfikované a nefermentované variantě nedosáhlo mycelium hlívy takové rychlosti růstu jako ve fermentovaném substrátu. Z grafu vyplývá, že největší přírůstky měla varianta fermentovaná oproti nefermentované a kontrole. Největšího přírůstku dosáhlo mycelium *Pleurotus ostreatus* u varianty fermentované a následně ošetřené při teplotě 60 °C. Z výsledků druhého měření u nefermentované kontaminované varianty je vidět, že po týdnu růstu mycelia *Pleurotus ostreatus* došlo k rozvoji *Trichoderma pleuroti* a tím pádem ke zpomalení růstu mycelia *Pleurotus ostreatus*.



Graf: Přírůstek mycelia *Pleurotus ostreatus* při různém ošetření substrátu

Legenda:

A - fermentovaný infikovaný substrát ošetřený při 60 °C, 65 °C a 70 °C

B - nefermentovaný infikovaný substrát ošetřený při 60 °C, 65 °C a 70 °C

C - kontrolní substrát ošetřený při 60 °C, 65 °C a 70 °C

INOKULOVANÝ SUBSTRÁT

Výskyt kolonií na fermentovaném substrátu inokulovaném *Trichoderma pleuroti* a po teplotním ošetření zaočkovaném *Pleurotus ostreatus*

	Trichoderma	Penicillium	Rhizopus	Aspergillus	Bacteria	Kvasinka	larvy	Humicola
60°C	x	x	x					
65°C	x	x	x	x				
70°C	x	x	x	x	x			

Výskyt kolonií na nefermentovaném substrátu inokulovaném *Trichoderma pleuroti* a po teplotním ošetření zaočkovaném *Pleurotus ostreatus*

	Trichoderma	Penicillium	Rhizopus	Aspergillus	Bacteria	Kvasinka	larvy	Humicola
60°C	x		x			x	x	
65°C	x		x					
70°C			x		x			

Výskyt kolonií na nefermentovaném kontrolním neinokulovaném substrátu a po teplotním ošetření zaočkovaném *P. ostreatus*

	Trichoderma	Penicillium	Rhizopus	Aspergillus	Bacteria	Kvasinka	larvy	Humicola
60°C	x		x			x	x	
65°C	x	x	x					x
70°C	x				x			

NEINOKULOVANÝ KONTROLNÍ SUBSTRÁT

Výskyt kolonií na fermentovaném substrátu inokulovaném *Trichoderma pleuroti* a po teplotním ošetření nezaočkovaném *Pleurotus ostreatus*

	Trichoderma	Penicillium	Rhizopus	Aspergillus	Bacteria	Kvasinka	Humicola	Fusarium	Doratomyces
60°C	x		x		x			x	
65°C	x		x	x	x		x	x	
70°C		x	x		x		x		

Výskyt kolonií na nefermentovaném substrátu inokulovaném *Trichoderma pleuroti* a po teplotním ošetření nezaočkovaném *Pleurotus ostreatus*

	Trichoderma	Penicillium	Rhizopus	Aspergillus	Bacteria	Kvasinka	Humicola	Fusarium	Doratomyces
60°C		x	x				x		x
65°C		x					x		x
70°C		x	x	x	x		x		x

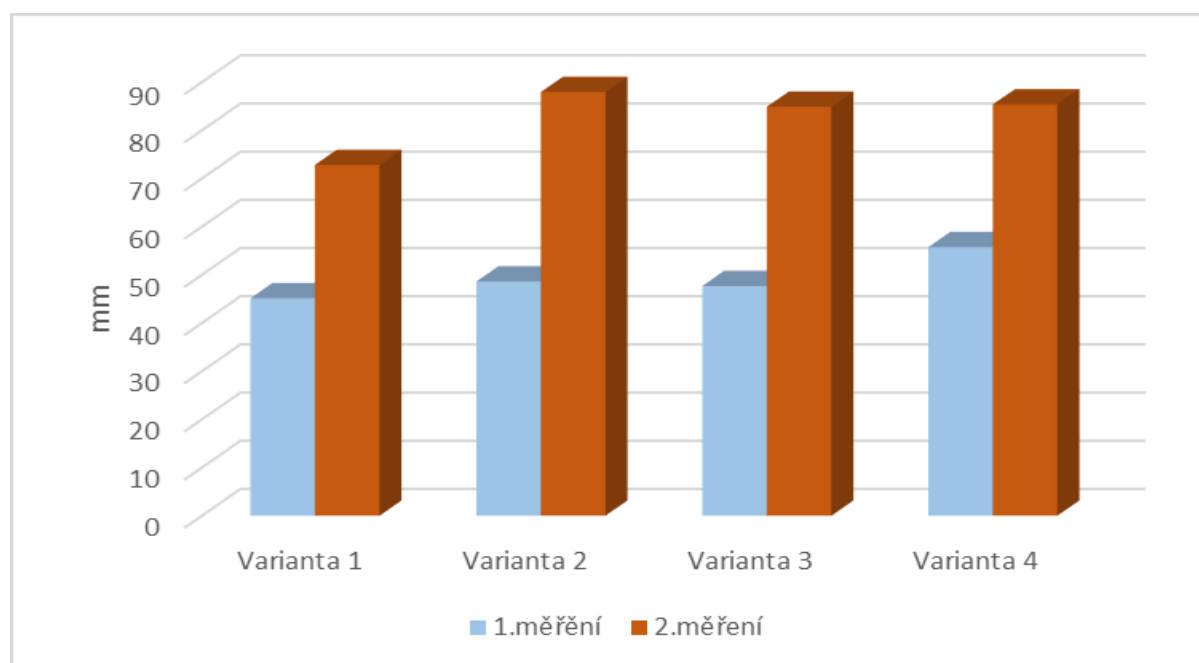
Výskyt kolonií na nefermentovaném kontrolním neinokulovaném substrátu a po teplotním ošetření nezaočkovaném *Pleurotus ostreatus*

	Trichoderma	Penicillium	Rhizopus	Aspergillus	Bacteria	Kvasinka	Humicola	Fusarium	Doratomyces
60°C		X			X		X		
65°C							X		
70°C		X	X				X		

Z vyhodnocení misek je vidět, že přítomnost hlívy podněcovala růst *Trichoderma*. Na kontrolních variantách bez hlívy *Trichoderma pleuroti* nerostla.

5.5 Vliv přídavku vyplozeného substrátu do namočené slámy kontaminované *Trichoderma pleuroti* při různých teplotních ošetřeních

Z uvedeného grafu vyplývá, že varianty 2, 3 a 4 dosáhly téměř stejných přírůstků. Nejmenšího přírůstku dosáhlo mycelium *Pleurotus ostreatus* infikovaného *Trichoderma pleuroti* bez přídavku vyplozeného substrátu.



Legenda:

Varianta 1: sláma + substrát s *Trichoderma*

Varianta 2: sláma + substrát s *Trichoderma* + vyplozený substrát

Varianta 3: sláma + výluh s *Trichoderma*

Varianta 4: sláma + vyplozený substrát + substrát s *Trichoderma*
NEFERMENTOVANÝ

Vyhodnocení organismů přítomných v substrátu

Prorostlý substrát

Varianta	Trichoderma	Penicillium	Rhizopus	Bacteria	Kvasinka	Humicola	Doratomyces
1	X						
2	X					x	
3			x			x	
4		X				X	
kontrola							

Neprorostlý substrát

Varianta	Trichoderma	Penicillium	Rhizopus	Bacteria	Kvasinka	Humicola	Doratomyces
1	X					X	
2	X					x	
3				X		x	
4			X	X		X	
kontrola						x	

Při vyhodnocení misek byla zjištěna největší přítomnost *Trichoderma pleuroti* u varianty 1 (sláma a sláma infikovaná *Trichoderma pleuroti*). U všech variant byla zjištěna přítomnost *Humicola*.

6 Diskuze

Při testování vlivu koncentrace spor *Trichoderma pleuroti*, teploty a délky ošetření substrátu bylo zjištěno, že při teplotním ošetření 65 °C nebyl významný rozdíl přírůstku mycelia v závislosti na délce ošetření a koncentraci spor. U variant, které byly ošetřeny při 70 °C byl přírůstek mycelia menší při ošetření 48 hodin. Toto zjištění naznačuje, že při delším teplotním ošetření mohou být postiženy také organismy příznivé pro růst *Pleurotus ostreatus*. V žádné variantě se neprojevila infekce *Trichoderma pleuroti*. Zadrobilová (2015) uvádí, že letální teplota pro přežití některých kmenů *Trichoderma pleuroti* je 60 °C až 65 °C, což tento pokus potvrzuje.

Komon – Zelazowska (2007) uvádí, že *Trichoderma pleuroti* je značně antagonistická vůči *Pleurotus ostreatus*, tvoří se inhibiční zóny a *Trichoderma pleuroti* je schopná přerůst kolonie *Pleurotus ostreatus*. V mém pokusu došlo také po 4 dnech kultivace k tvorbě baráží mezi organismy a po 7 dnech *Trichoderma pleuroti* přerostla kolonie *Pleurotus ostreatus*. V tomto pokusu se potvrdil antagonistický vztah mezi *Trichoderma pleuroti* a *Pleurotus ostreatus*, jak Komon – Zelazowska (2007) uvádí. Jak uvádí Zadrobilová (2015) *Pleurotus ostreatus* se projevil jako lépe rostoucí oproti *Bacillus subtilis*. Při bodové inokulaci *Bacillus subtilis* a *Pleurotus ostreatus* po 7 dnech kultivace přerostla kolonie *Pleurotus ostreatus* kolonii *Bacillus subtilis*. U varianty s plošnou inokulací *Bacillus subtilis* a bodovou inokulací *Pleurotus ostreatus* byl růst houby značně omezen. Oproti tomu *Bacillus subtilis* kolonizoval po 7 dnech celý substrát. Toto omezení růstu může být způsobeno rychlejší kolonizací substrátu bakterií a zamezení přístupu k živinám pro *Pleurotus ostreatus*, která roste pomaleji. V případě vztahu mezi *Bacillus subtilis* a *Trichoderma pleuroti* záleží na způsobu inokulace obou organismů. U varianty s bodovou inokulací obou organismů byl růst *Trichoderma pleuroti* agresivní a po 4 dnech kultivace došlo k tvorbě baráží mezi organismy a po 7 dnech kolonie *Trichoderma pleuroti* přerostla kolonii bakterie. V případě varianty s plošnou inokulací *Bacillus subtilis* a bodovou inokulací *Trichoderma pleuroti* byl růst vláknité houby značně omezen a její

kolonie nedosáhla takové velikosti jako v případě samotného růstu bez *Bacillus subtilis*. Toto zpomalení růstu může být způsobeno antagonistickým vztahem *Bacillus subtilis* a *Trichoderma pleuroti* jak uvádí Nagy et al. (2012). Zadrobilová (2015) se domnívá, že je toto omezení růstu způsobeno rychlejší kolonizací substrátu bakterií, která poté znepřístupní živiny pro *Trichoderma pleuroti*.

V dalších pokusech byl zjišťován vliv fermentace a následného teplotního ošetření substrátu. Balíková (2015) uvádí, že při fermentaci při 30 °C nedošlo ke zničení spor *Trichoderma pleuroti* a následně se v substrátu projevila infekce. Při zvýšení teploty na 50 °C k objevení *Trichoderma pleuroti* nedošlo. U pokusů v naší práci se infekce *Trichoderma pleuroti* při fermentaci při 30 °C a následném teplotním ošetření projevila také. Z vyhodnocení mikroorganismů přítomných v substrátu inokulovaném a neinokulovaném *Pleurotus ostreatus* bylo zjištěno, že přítomnost *Pleurotus ostreatus* podněcuje růst *Trichoderma pleuroti*, protože v nezaočkovaném substrátu se *T. pleuroti* neobjevila, což potvrzuje zkušenost z pěstírny R. Ryznera v Kojátkách (Jablonský, 2015).

U pokusu s obohacením substrátu pšeničnými otrubami bylo zjištěno, že pokud je substrát obohacen a následně fermentován je růst mycelia *Pleurotus ostreatus* značně zpomalen. Toto zpomalení může být způsobeno tím, že během fermentace jsou živiny ze substrátu využity jinými organismy a později nejsou přístupné pro mycelium *Pleurotus ostreatus*. Pokusy provedené Zadrobilovou (2015) prokázaly, že *Trichoderma pleuroti* se projevuje jako velmi agresivní a přeroste kolonii mycelia *Pleurotus ostreatus*. V tomto pokusu se infekce *Trichoderma pleuroti* projevila, ale nekolonizovala celý substrát a mycelium *Pleurotus ostreatus* v substrátu podrobeném fermentaci rostlo i přes infekci plísní. Po identifikaci organismů přítomných v substrátu bylo zjištěno, že *Trichoderma pleuroti* se vyskytovala i na slámě neinfikované při provádění pokusu, což vede k závěru, že použitá sláma byla již infikována u zdroje.

Jablonský a Šašek (2006) uvádějí, že ke zničení spor *Trichoderma pleuroti* se využívá pasterizace při 60 – 70 °C po dobu 20 – 48 hodin. V pokusech v této práci byla využita teplota ošetření 60 °C, 65 °C a 70 °C po

dobu 24 hodin a infekce *Trichoderma pleuroti* se přesto projevila. Nicméně pokud byl substrát podroben fermentaci, byl růst mycelia *Pleurotus ostreatus* větší, než pokud k fermentaci nedošlo. Po přidání prorostlého vyplozeného substrátu nebyl zjištěn vliv na rychlost růstu mycelia *Pleurotus ostreatus*.

7 Závěr

Předložená práce se zabývala vztahem *Pleurotus ostreatus*, konkurenční houby *Trichoderma pleuroti* a mikrobiota v substrátu.

V případě infekce substrátu konkurenční houbou *Trichoderma pleuroti* v různých koncentracích nebyl zjištěn podstatný vliv koncentrace na růst mycelia *Pleurotus ostreatus*. Větší vliv na růst mycelia měla doba a teplota ošetření substrátu. Bylo zjištěno, že doba ošetření 24 hodin je vhodnější než teplotní ošetření po dobu 48 hodin.

Při společném růstu *Bacillus subtilis* a *Trichoderma pleuroti* v in vitro podmínkách došlo k omezení růstu *Trichoderma pleuroti*. V případě plošné inokulace *Bacillus subtilis* bylo omezení růstu *Trichoderma pleuroti* výraznější než při bodové inokulaci.

Při společném růstu *Bacillus subtilis* a *Pleurotus ostreatus* v in vitro podmínkách bylo zjištěno, že *Bacillus subtilis* omezuje růst *Pleurotus ostreatus* a v případě plošné inokulace *Bacillus subtilis* je růst *Pleurotus ostreatus* téměř zastaven.

V případě fermentace obohaceného substrátu o pšeničné otruby byl růst mycelia *Pleurotus ostreatus* značně zpomalen oproti fermentovanému substrátu, který nebyl obohacen. Jako nejvhodnější ošetření se ukázalo fermentování neobohaceného substrátu a to v případě substrátu infikovaného i neinfikovaného *Trichoderma pleuroti*.

Po vyhodnocení organismů přítomných v inokulovaném a neinokulovaném substrátu *Pleurotus ostreatus* se *Trichoderma pleuroti* vyskytla nejvíce v substrátu inokulovaném *Pleurotus ostreatus*, což naznačuje, že přítomnost mycelia *Pleurotus ostreatus* podněcuje růst *Trichoderma pleuroti*.

Přítomnost *Trichoderma pleuroti* byla zjištěna také na substrátu, který nebyl infikován *Trichoderma pleuroti*, což ukazuje na skutečnost, že sláma byla infikována již u zdroje.

Cílem práce bylo zhodnotit vliv prostředí na kulturu hlívy ústříčné, *Trichoderma pleuroti* a mikrobiota v substrátu. Bylo zjištěno, že pokud je zvolen vhodný druh tepelného ošetření substrátu je mycelium *Pleurotus*

ostreatus schopno odolat *Trichoderma pleuroti* a pokračovat v růstu. Cíl práce byl proto naplněn.

8 Literatura

Antonín, V. 2006. Encyklopedie hub a lišejníků. Academia Praha. 472 s. ISBN: 80-200-1476-4.

Bissett J. 1991. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany*. 69 (11). 2357-2372.

Demain, L.A., Vaishnav, P. 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology advances*. 27(3):297-306

Hatvani L., Antal Z., Manczinger L., Szekeres A., Druzhinina I. S., Kubicek C. P., Nagy A., Nagy E., Vágvölgyi C., Kredics L. 2007. Green mold diseases of *Agaricus* and *Pleurotus* spp. are caused by related but phylogenetically different *Trichoderma* species. *Phytopathology*. 97. 532-537.

Ha Thi, H, Chun-Li, W, & Chong-Ho, W 2015, 'The Effects of Different Substrates on the Growth, Yield, and Nutritional Composition of Two Oyster Mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*)', *Mycobiology*, 43, 4, pp. 423-434.

Hýsek, J. Vach, M. Javůrek, M. 2008. Biologická ochrana obilnin proti houbovým fytopatogenům. Výzkumný ústav rostlinné výroby. Praha. 20 s. ISBN: 978-80-87011-56-0

Chen X., Romaine C. P., Tan Q., Schlagnhauser B., Ospina-Giraldo M. D., Royse D. J., Huff D. R. 1999. A PCR-based genotyping of epidemic and preepidemic *Trichoderma* isolates associated with green mold of *Agaricus bisporus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65. 2674-2678.

Cho Y.S., Kim J.S., Crowley D.E., Cho B.G. 2002. Growth promotion of the edible fungus *Pleurotus ostreatus* by fluorescent pseudomonads. *FEMS Microbiology Letters* 218 (2003) 271-276.

Jablonský, I., Šašek, V. 2006. *Jedlé a léčivé houby, pěstování a využití*. Brázda. Praha. 264 s. + 16 přílohy. ISBN: 80-209-0341-0.

Kim W.G., Weon H.Y., Seok S.J., Lee K.H. 2008. In Vitro Antagonistic Characteristics of Bacilli Isolates against *Trichoderma* spp. and Three Species of Mushrooms. *Mycobiology*. 36 (4) 266-269.

Kirk P. M., Cannon P.F., Minter D.W. and Staplers J.A.. 2008. *Dictionary of The Fungi*. CAB International Wallingford. p. 624. ISBN: 978 0 85199 826 8.

Komoń-Zelazowska M., Bissett J., Zafari D., Hatvani L., Manczinger L., Woo S., Lorito M., Kredics L., Kubicek C. P., Druzhinina I. S. 2007. Genetically closely related but 92 phenotypically divergent *Trichoderma* species cause green mold disease in oyster mushroom farms worldwide. *Applied and Environmental Microbiology*. 73 (22). 7415 - 7426.

Kothe H. 2012. *Houby*. Euromedia Group, k. s. – Knižní klub. 256 s. ISBN 978-80-242-3523-3.

Kubátová A., Kolařík M., Jablonský I. 2009. *Trichoderma aggressivum* – první nález v České republice. *Mykologické listy*. 109. 18-24.

Nagy A., Manczinger L., Tombácz D., Hatvani L., Györfi J., Antal Z., Sajben E., Vágvölgyi C., Kredics L. 2012. Biological control of oyster mushroom green mould disease by antagonistic *Bacillus* species . *Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens IOBC-WPRS Bulletin*. 78. 289-293.

Park M. S., Bae K. S. and Yu S. H.. 2006. Two New Species of Trichoderma Associated with Green Mold of Oyster Mushroom Cultivation in Korea. *Micobiology*. 34 (3). 111 -113.

Samuels G. J. 2006. Trichoderma: Systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology*. 96 (2). 195-206.

Sobieralski, K, Siwulski, M, Sas-Golak, I, Mańkowski, J, & Kotlińska, T 2011, 'Mycelium growth and yield of wild strains of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Quel. cultivated on waste materials from the textile industry', *Folia Horticulturae*, 23, 1, Academic Search Complete, pp. 67-71.

Stamets, P. 1993. Growing gourmet and medicinal mushrooms. Ten Speed Press. p. 586. ISBN: 0-89815-608-4.

Staněk M., Bisko N.A. 1982. Regulace mikrobiologických procesů v substrátech pro pěstování houby hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*). *Sborník VÚTIZ – Zahradnictví* . 9 (3) 221 – 233.

Szczech M., Staniaszek M., Habdas H., Ulinski Z., Szymański J. 2008. Trichoderma spp. – the cause of green mold on Polish mushroom farms. *Vegetable Crops Research Bulletin*. 69. 105-114.

Velazquez-Cedeno M., Farnet A.M., Mata G., Savoie J.M. 2008. Role of *Bacillus* spp. in antagonism between *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma harzianum* in heat-treated wheatstraw substrates. *BIORESOURCE TECHNOLOGY*. 99(15) 6966-6973

Diplomové práce

Balíková, E. 2015. Diplomová práce. Ošetření substrátu pro pěstování hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*) vybranými bakteriemi. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Praha. 101 s.

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

Elektronické zdroje

Anonym. *Bacillus licheniformis* [online]. ?. [cit. 2016-3-01]. Dostupné z <<http://www.tgw1916.net/Bacillus/licheniformis.html>>.

Hatvani, L. Mushroom pathogenic *Trichoderma* species: occurrence, biodiversity, diagnosis and extracellular enzyme production. [online]. Department of Microbiology. Faculty of Science and Informatics. University of Szeged. 2008. 109 p. [cit. 2016-3-3]. Dostupné z <http://www2.sci.u-szeged.hu/fokozatok/PDF/Hatvani_Lorant/dissertation_Hatvani_L.pdf>.

Larsen, R. Pogliano, K. *Bacillus subtilis*. [online]. Microbewiki. 5 March 2013. [cit. 2016-1-14]
Dostupné z <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bacillus_subtilis>.

Kirk, E. *Bacillus subtilis*. [online]. Microbiology at Missouri. 2009. [cit. 2016-3-2]. Dostupné z <http://web.mst.edu/~microbio/BIO221_2009/B_subtilis.html>.

Pringle, E. Bacillus lichenformis [online] 22.1.2005. [cit. 2016-2-25].

Dostupné z

<http://web.mst.edu/~microbio/BIO221_2005/B_lichenformis.htm>.

Osobní sdělení

Jablonský, I. 2015. osobní sdělení

9 Přílohy

9.1 Infekce substrátu z pelet houbou *Trichoderma pleuroti*

dobu ošetření (hod.)	varianta	Teplota [°C]	1.měření (Průměr) [mm]	2.měření (Průměr) [mm]	3.měření (Průměr) [mm]
24	K	65	79,7	149,8	210,3
24	K	70	51,9	105,1	150,5
24	KF	65	52,4	98,9	144,0
24	KF	70	60,2	100,5	142,5
24	102	65	61,5	118,6	159,6
24	102	70	61,3	125,4	157,9
24	103	65	68,5	134,1	184,0
24	103	70	61,9	118,5	169,9
24	104	65	52,0	107,4	155,9
24	104	70	57,9	111,3	157,9
48	K	65	74,0	133,2	180,8
48	K	70	63,6	112,5	153,0
48	KF	65	57,4	106,4	148,4
48	KF	70	61,0	105,4	151,3
48	102	65	61,7	103,3	157,7
48	102	70	56,9	110,1	142,5
48	103	65	54,0	98,6	141,6
48	103	70	47,5	94,6	132,5
48	104	65	56,0	108,8	157,1
48	104	70	56,9	100,0	131,6

Tabulka 1: Přírůstek mycelia *Pleurotus ostreatus* při různých variantách ošetření

doba ošetření (hod.)	varianta	Teplota [°C]	1.měření (Průměr) [mm]	2.měření (Průměr) [mm]	3.měření (Průměr) [mm]	4.měření (Průměr) [mm]	5.měření (Průměr) [mm]
24	K	65	49,50000	84,33333	116,0000	161,0000	182,6667
24	K	70	43,37500	79,75000	107,3750	150,8750	176,0000
24	KF	65	42,00000	74,75000	106,7500	149,1250	174,3750
24	KF	70	46,12500	67,50000	95,0000	126,8750	149,3750
24	102	65	40,00000	83,33333	116,0000	158,1667	183,3333
24	102	70	47,50000	86,16667	117,1667	158,1667	194,8333
24	103	65	39,66667	76,16667	103,6667	143,6667	166,5000
24	103	70	45,75000	84,50000	114,8750	163,5000	189,2500
24	104	65	40,00000	81,12500	113,6250	163,0000	191,2500
24	104	70	34,62500	68,62500	92,8750	137,0000	166,0000
48	K	65	49,75000	86,87500	113,5000	149,3750	171,0000
48	K	70	41,33333	73,83333	103,0000	142,1667	162,5000
48	KF	65	32,25000	56,75000	78,1250	115,3750	142,6250
48	KF	70	48,50000	82,12500	114,0000	143,0000	173,5000
48	102	65	40,50000	70,33333	96,8333	137,5000	162,1667
48	102	70	36,00000	59,50000	77,0000	103,7500	119,5000
48	103	65	34,33333	60,83333	81,6667	119,0000	141,8333
48	103	70	44,75000	78,87500	105,6250	146,0000	168,0000
48	104	65	39,00000	71,62500	105,1250	142,0000	164,1250
48	104	70	36,00000	71,00000	97,7500	133,0000	155,0000

Tabulka 2: Přírůstek mycelia *Pleurotus eryngii* při různých variantách ošetření



Foto 1: *Pleurotus eryngii*: Ošetření 24 hodin 70 °C, zprava: kontrola fermentovaná, kontrola, nejnižší koncentrace spor, střední koncentrace spor, nejvyšší koncentrace spor



Foto 2: *Pleurotus eryngii*: Ošetření 24 hodin 65 °C, zprava: kontrola, kontrola fermentovaná, nejnižší koncentrace spor, střední koncentrace spor, nejvyšší koncentrace spor



Foto 3: : *Pleurotus eryngii*: Ošetření 48 hodin 70 °C, zprava: kontrola fermentovaná, kontrola, nejnižší koncentrace spor, střední koncentrace spor, nejvyšší koncentrace spor



Foto 4: *Pleurotus eryngii*: Ošetření 48 hodin 65 °C, zprava: kontrola fermentovaná, kontrola, nejnižší koncentrace spor, střední koncentrace spor, nejvyšší koncentrace spor



Foto 5: *Pleurotus ostreatus*: Ošetření 48 hodin 65 °C, zprava: kontrola fermentovaná, kontrola, nejnižší koncentrace spor, střední koncentrace spor, nejvyšší koncentrace spor



Foto 6: *Pleurotus ostreatus*: Ošetření 48 hodin 70 °C, zprava: kontrola fermentovaná, kontrola, nejnižší koncentrace spor, střední koncentrace spor, nejvyšší koncentrace spor



Foto 7: *Pleurotus ostreatus*: Ošetření 24 hodin 65 °C, zprava: kontrola fermentovaná, kontrola, nejnižší koncentrace spor, střední koncentrace spor, nejvyšší koncentrace spor



Foto 8: *Pleurotus ostreatus*: Ošetření 24 hodin 70 °C, zprava: kontrola fermentovaná, kontrola, nejnižší koncentrace spor, střední koncentrace spor, nejvyšší koncentrace spor

9.2 Porovnání růstu a interakcí *Pleurotus ostreatus*, *Trichoderma pleuroti* a *Bacillus subtilis* v podmínkách *in vitro*

Sladinový agar		přírůstek po 7 dnech (mm)	
		pH7	pH8
V1	<i>Pleurotus o.</i>	44	82
V2	<i>Trichoderma p.</i>	85	85
V3	<i>Bacillus s.</i>	79,6	84,6
V4	<i>Bacillus s.</i>	85	85
V5	<i>Trichoderma p.</i>	5,2	54,6
V5	<i>Bacillus s.</i>	85	85
V6	<i>Trichoderma p.</i>	85	63,6
V6	<i>Bacillus s.</i>	44,2	50,8
V7	<i>Pleurotus o.</i>	66,6	54,6
V7	<i>Bacillus s.</i>	43,2	85
V8	<i>Pleurotus o.</i>	9,4	8,6
V8	<i>Bacillus s.</i>	85	85
V9	<i>Pleurotus o.</i>	27,8	30,2
V9	<i>Trichoderma p.</i>	63,2	54,2

Tabulka 3: Přírůstky organismů na sladinovém agaru

Slámový agar		přírůstek po 7 dnech [mm]	
		pH7	pH8
V1	<i>Pleurotus o.</i>	59,6	44,4
V2	<i>Trichoderma p.</i>	85	85
V3	<i>Bacillus s.</i>	73,8	72,8
V4	<i>Bacillus s.</i>	85	85
V5	<i>Trichoderma p.</i>	7,6	6,6
V5	<i>Bacillus s.</i>	85	85
V6	<i>Trichoderma p.</i>	47	44,2
V6	<i>Bacillus s.</i>	44,2	46,4
V7	<i>Pleurotus o.</i>	38,4	50,8
V7	<i>Bacillus s.</i>	45,8	44
V8	<i>Pleurotus o.</i>	1,8	1,2
V8	<i>Bacillus s.</i>	85	85
V9	<i>Pleurotus o.</i>	31,8	31
V9	<i>Trichoderma p.</i>	53,2	57,4

Tabulka 4: Přírůstky organismů na slámovém agaru

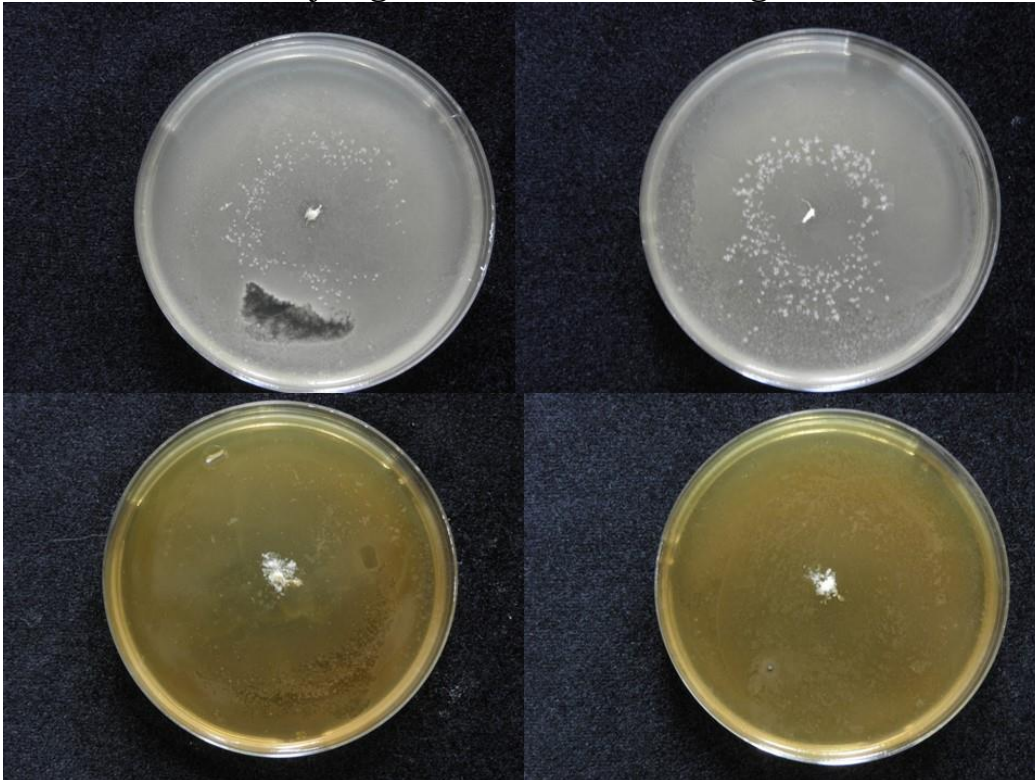


Foto 9: Plošná inokulace *Bacillus subtilis*, bodově *Trichoderma pleuroti* po 7 dnech kultivace. Nahore zleva: sladínový agar pH 7, sladínový agar pH 8
Dole zleva: slámový agar pH 7, slámový agar pH 8

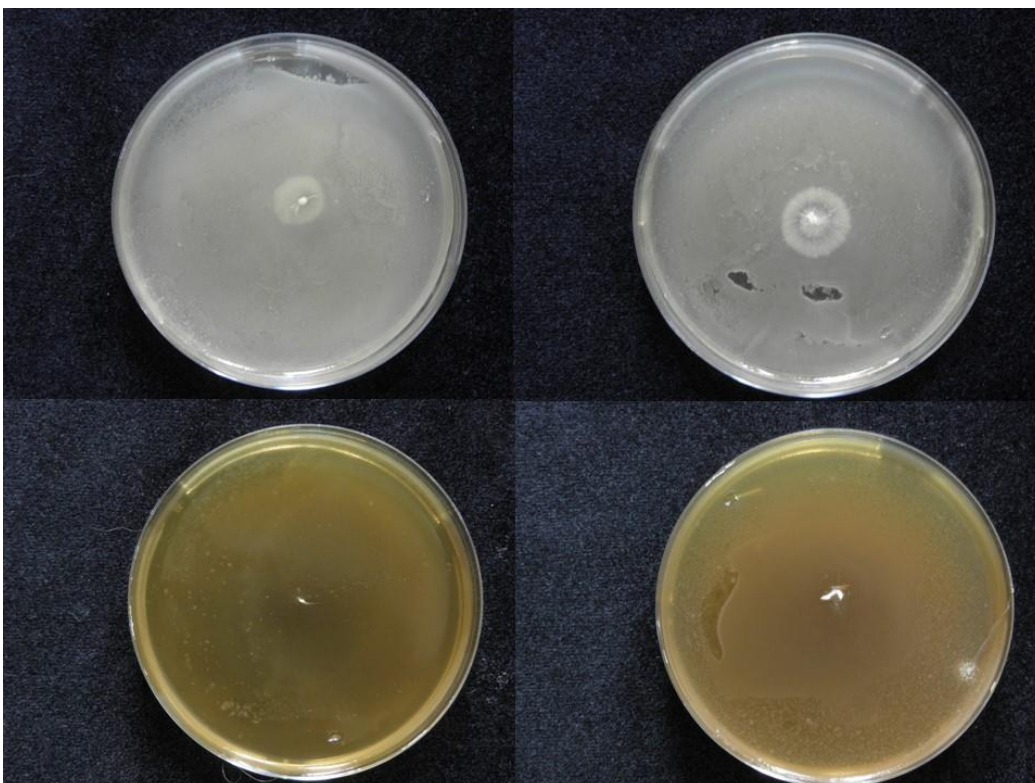


Foto 10: Plošná inokulace *Bacillus subtilis*, bodově *Pleurotus ostreatus* po 7 dnech kultivace. Nahore zleva: sladínový agar pH 7, sladínový agar pH 8

Dole zleva: slámový agar pH 7, slámový agar pH 8

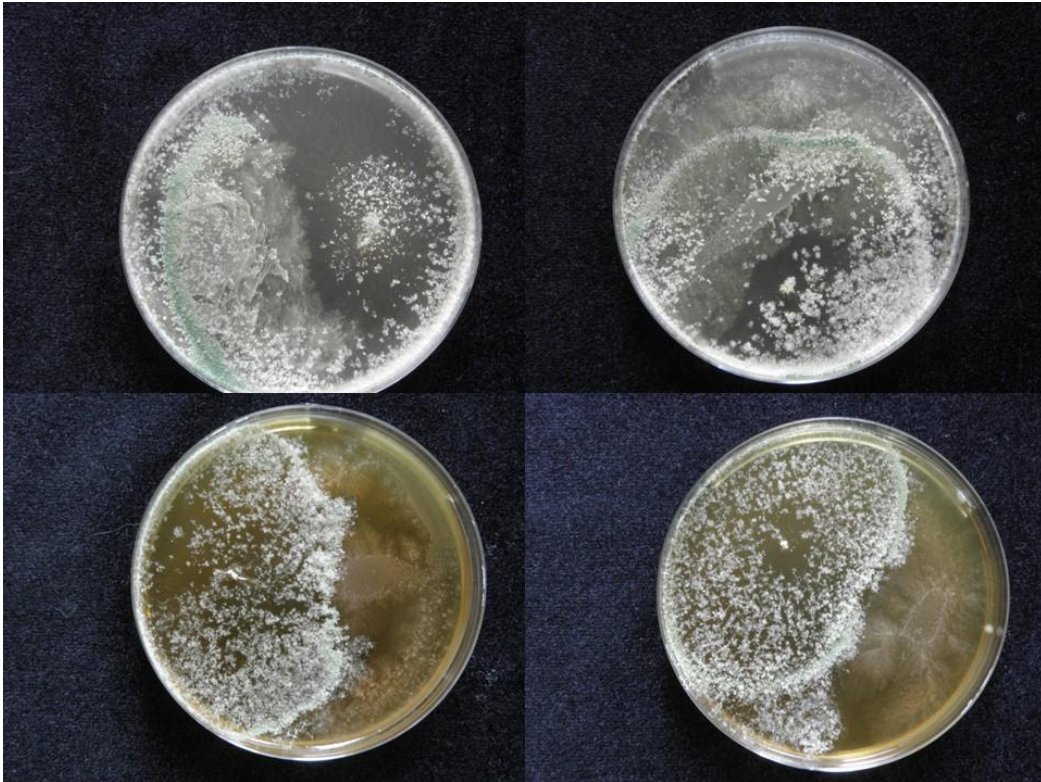


Foto 11: Bodová inokulace *Bacillus subtilis*, a *Trichoderma pleuroti* po 7 dnech kultivace. Nahore zleva: sladínový agar pH 7, sladínový agar pH 8
Dole zleva: slámový agar pH 7, slámový agar pH 8

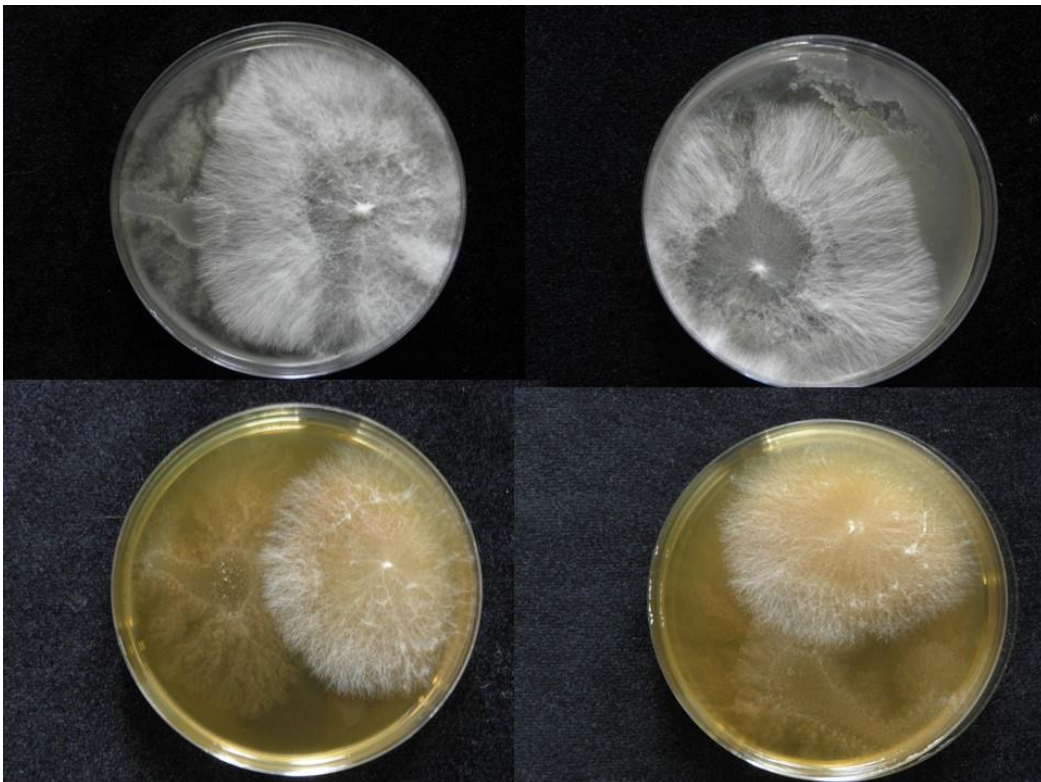


Foto 12: Bodová inokulace *Bacillus subtilis* a *Pleurotus ostreatus* po 7 dnech kultivace. Nahore zleva: sladínový agar pH 7, sladínový agar pH 8

Dole zleva: slámový agar pH 7, slámový agar pH 8

9.3 Fermentace obohaceného substrátu ošetřeného v různých teplotních režimech

Označení	1.měření (Průměr) [mm]
fermentovaný substrát	7,090
obohacený fermentovaný substrát	6,220
kontrola	7,140
bohacený nefermentovaný substrát	8,385

Tabulka 5: Příklad mycelia *Pleurotus ostreatus* po 7 dnech

9.4 Růst mycelia *Pleurotus ostreatus* na různě ošetřených substrátech ze slámy inokulovaných substrátem kontaminovaným *Trichoderma pleuroti*

varianta	Teplota [°C]	1.měření (30.10.) (Průměr) [mm]	2.měření (6.11) (Průměr) [mm]
A	60	60,95000	106,3000
A	65	66,80000	100,9000
A	70	63,95000	96,1500
B	60	34,43750	48,0625
B	65	54,00000	63,5625
B	70	47,90000	63,0500
C	60	51,50000	69,1500
C	65	59,15000	78,6500
C	70	54,00000	79,5000

Tabulka 6: Příklad mycelia na různě ošetřených substrátech

Varianta A: Fermentovaný inokulovaný substrát

Varianta B: Nefermentovaný inokulovaný substrát

Varianta C: Kontrola



Foto 13: Příklad mycelia *Pleurotus ostreatus* a infekce *Trichoderma pleuroti* Ošetřené při 60 °C. Zleva: A, B, C



Foto 14: Příklad mycelia *Pleurotus ostreatus* a infekce *Trichoderma pleuroti* Ošetřené při 65 °C. Zleva: A, B, C



Foto 15: Příklad mycelia *Pleurotus ostreatus* a infekce *Trichoderma pleuroti* Ošetřené při 70 °C. Zleva: A, B, C

9.5 Vliv přídavku vyplozeného substrátu do namočené slámy kontaminované *Trichoderma pleuroti* při různých teplotních ošetřeních

	1.měření [mm]	2.měření [mm]
Varianta 1	45,125	72,8125
Varianta 2	48,625	87,9375
Varianta 3	47,6875	84,875
Varianta 4	55,75	85,375

Tabulka 7: Přírůstek mycelia v substrátu s přídavkem vyplozeného substrátu kontaminovaného *Trichoderma pleuroti*

Varianta 1: sláma + substrát s *Trichoderma*

Varianta 2: sláma + substrát s *Trichoderma* + vyplozený substrát

Varianta 3: sláma + výluh s *Trichoderma*

Varianta 4: sláma + vyplozený substrát + substrát s *Trichoderma*
NEFERMENTOVANÝ



Foto 16: Kbelíky prorostlé myceliém *Pleurotus ostreatus* a infikované *Trichoderma pleuroti*. Zleva: varianta 1, varianta 2



Foto 17: Kbelíky prorostlé myceliém *Pleurotus ostreatus* a infikované *Trichoderma pleuroti*. Zleva: varianta 3, varianta 4