

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

Katedra zahradnictví



Vliv ošetření substrátu na růst a aktivitu mycelia vybraných dřevokazných hub

Influence of substrate treatment on the growth and mycelium activity
of some wood-inhabiting mushrooms.

Diplomová práce

Autor práce: **Bc. Petra Plicková**
Vedoucí práce: **Ing. Ivan Jablonský, CSc.**

2013

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce panu Ing. Ivanu Jablonskému, CSc. za odborné vedení práce na téma Vliv ošetření substrátu na růst a aktivitu mycelia vybraných dřevokazných hub a za poskytnutí literatury potřebné k tomuto tématu. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Evě Jablonské za pomoc v mikrobiologické laboratoři a také RNDr. Petru Baldriánovi, PhD., za konzultace výsledků a poskytnutí laboratoře k mikrobiologickým zkouškám.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci na téma **Vliv ošetření substrátu na růst a aktivitu mycelia vybraných dřevokazných hub** vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a použila pouze podklady uvedené v příloženém seznamu bibliografie. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 10. 4. 2013

.....

Bc. Petra Plicková – autor práce

Vliv ošetření substrátu na růst a aktivitu mycelia vybraných dřevokazných hub

Influence of substrate treatment on the growth and mycelium activity of some wood-inhabiting mushrooms

Souhrn

Tato diplomová práce je zaměřena na prorůstání mycelia dřevokazných hub v substrátech ošetřených různými koncentracemi peroxidu vodíku, který by mohl být využíván jako chemický sterilizační přípravek. Vybranými dřevokaznými houbami jsou outkovka pestrá (*Trametes versicolor*) a hlíva ústříčná (*Pleurotus ostreatus*). Tyto houby mají významné léčivé účinky a jsou tedy využívány v prevenci i v samotném léčení vážnějších civilizačních nemocí.

Hlavním cílem bylo založit několik pokusů a porovnat u vybraných hub aktivitu a schopnost kolonizovat různě ošetřené substráty. Základní složkou substrátů byly pelety z pšeničné slámy, které byly ošetřeny studenou, horkou a destilovanou vodou, 1%, 3% a 4% roztoky peroxidu vodíku a v jednom pokusu také sterilizací samotných pelet v sušárně. Práci tvoří 6 pokusů. Ve čtyřech pokusech byla porovnáována aktivita růstu mycelia obou vybraných hub ve výše uvedených substrátech. V jednom z pokusů byla zjišťována vhodná teplota pro kolonizaci mycelia outkovky pestré na substrátech ošetřených 3% a 4% roztokem H₂O₂. Ve zbývajícím pokusu byl porovnáván růst mycelia outkovky pestré v 1,5 kilogramových blocích, na kterých byla vyzkoušena i schopnost této houby fruktifikovat v laboratorních podmínkách. Výsledky těchto pokusů byly statisticky vyhodnoceny. Dalším cílem bylo stanovit aktivitu celulolytických a lignolytických enzymů v myceliem prorostlých substrátech a určit zda tato aktivita byla ovlivněna přidáním peroxidu vodíku.

Bylo prokázáno, že koncentrace peroxidu vodíku v substrátu více prospívá outkovce pestré. Mycelium outkovky prokazovalo růst ve všech peroxidem ošetřených substrátech. Substráty s 3% a 4% roztokem peroxidu outkovka kolonizovala pomaleji než substráty ošetřené 1% roztokem peroxidu a horkou vodou. Substrát ošetřený studenou vodou mycelium outkovky nekolonizovalo téměř vůbec. Naopak mycelium hlívy prokazovalo velmi rychlý růst v substrátech ošetřených studenou a horkou vodou. Velmi podobné výsledky prokazovalo i na substrátu

s 1% roztokem peroxidu. Substráty ošetřené roztoky 3% a 4% peroxidu kolonizovalo velmi špatně a pomalu. Na substrátech ošetřených sterilizací pelet si mycelium v některých případech udrželo aktivitu růstu déle než na substrátech bez sterilizace pelet. I přesto však byly výsledky u obou hub podobné na substrátech se sterilními i nesterilními peletami.

Měřením aktivity lignolytických a celulólytických enzymů nebyly zjištěny žádné významné rozdíly mezi pokusnými variantami. Při porovnání aktivity lakázy a Mn peroxidázy mělo výrazně vyšší aktivitu mladší mycelium, tedy mycelium, které bylo odebráno 27. a 30. den od naočkování, oproti myceliu odebraném 14. a 15. den od naočkování.

Klíčová slova: *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, mycelium, celulólytické a lignolytické enzymy, peroxid vodíku, ošetření substrátu

Summary

This diploma thesis is aimed at mycelium growth of wood-inhabiting mushrooms in substrates treated by various concentrations of hydrogen peroxide which potentially would be used as a chemical sterilization preparation. As a representative sample of wood-inhabiting mushrooms, Turkey tail (*Trametes versicolor*) and Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) were selected. These mushrooms have very significant curing effects and thus they are used for various diseases prevention and cure.

The main goal was to perform several experiments to compare the activity and ability of selected mushrooms to colonize variously treated substrates. The base of substrates were pellets made from wheat straw which were treated by cold, hot, and distilled water, 1%, 3% a 4% hydrogen peroxide solutions, and also by sterilization of pellets themselves in a dryer. This work contains 6 experiments. During four of them, the activity of both selected mushrooms in above-mentioned substrates was observed. During one experiment, the ideal temperature for colonization of mycelium of Turkey tail on substrates treated by 3% and 4% hydrogen peroxide solutions was determined. In the last experiment, growth activity of Turkey tail mycelium in 1.5 kg blocks was observed. Also, ability of this mushroom to fructify in lab environment was tested. The measured values were statistically evaluated. The next goal was to determine activity of celulolytic and lignolytic enzymes in substrates and decide whether this activity was affected by adding the hydrogen peroxide.

It was proven that hydrogen peroxide concentration in substrate has more positive affect on Turkey tail. Mycelium of Turkey tail grows more significantly in all peroxide treated substrates. In substrates with 3% and 4% solutions, Turkey tail was growing slower than in substrates treated by 1% peroxide solution or by a hot water. On the other hand, there was no significant activity observed in substrate treated by a cold water. In comparison, mycelium of Oyster Mushroom showed rapid growth in both cold and hot water treated substrates. Almost the same results were in 1% peroxide treated substrate, while in case of 3% and 4% solutions not. In some cases, mycelia were active longer in substrates with sterilized pellets, although the results were almost identical in both sterilized and non-sterilized substrates.

There was no significant differences among all tested variants in case of measurement of lignolytic and celulolytic enzymes activity. When comparing activity of laccase and Mn-peroxidase, the significantly higher activity was observed on younger mycelium that was extracted on the 27th and 30th day after inoculating, compared to mycelia extracted on the 14th and 15th day after inoculating.

Keywords: *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, mycelium, celulolytic and lignolytic enzymes, hydrogen peroxide, treatment of the substrate

Seznam příloh

Příloha č. 1: Fotodokumentace

- Obrázek č. 1: *Trametes versicolor* (outkovka pestrá); zdroj:
<http://www.houbareni.cz/houba.php?id=148>
- Obrázek č. 2: *Pleurotus ostreatus* (hlíva ústříčná); zdroj:
<http://www.biolib.cz/cz/image/id107293/>
- Obrázek č. 3 a 4: Příklady označování sklenic jednotlivých variant.
- Obrázek č. 5: Substrát prorostlý myceliem *Trametes versicolor* po skončení pokusu č. 2.
- Obrázek č. 6: Substrát prorostlý myceliem *Pleurotus ostreatus* po skončení pokusu č. 2.
- Obrázek č. 7: Substrát prorostlý myceliem *Trametes versicolor* po skončení pokusu č. 4.
- Obrázek č. 8: Substrát prorostlý myceliem *Pleurotus ostreatus* po skončení pokusu č. 4.
- Obrázek č. 9: Substrát prorostlý myceliem *Trametes versicolor* po skončení pokusu č. 3.
- Obrázek č. 10: Nesterilní substrát prorostlý myceliem *Trametes versicolor* a *Pleurotus ostreatus* po skončení pokusu č. 6.
- Obrázek č. 11: Sterilní substrát prorostlý myceliem *Trametes versicolor* a *Pleurotus ostreatus* po skončení pokusu č. 6.
- Obrázek č. 12: Sterilní substrát ošetřený destilovanou vodou a prorostlý myceliem *T. versicolor* a *P. ostreatus* po skončení pokusu č. 6.
- Obrázek č. 13: Sterilní a nesterilní substrát ošetřený 1% roztokem H₂O₂ a prorostlý myceliem *T. versicolor* a *P. ostreatus* po skončení pokusu č. 6.
- Obrázek č. 14: Sterilní a nesterilní substrát ošetřený 3% roztokem H₂O₂ a prorostlý myceliem *T. versicolor* a *P. ostreatus* po skončení pokusu č. 6.

- Obrázek č. 15: Sterilní a nesterilní substrát ošetřený 4% roztokem H₂O₂ a prorostlý myceliem *T. versicolor* a *P. ostreatus* po skončení pokusu č. 6.
- Obrázek č. 16: Primordia outkovky pestré po 21. dnech v podmínkách pro fruktifikaci.
- Obrázek č. 17: Detail primordia outkovky pestré.
- Obrázek č. 18: Uložení 1,5 kilogramových bloků v podmínkách pro fruktifikaci v klimatizovaném boxu.
- Obrázek č. 19: Vzorky pro stanovení enzymatické aktivity (v pozadí třepačka).
- Obrázek č. 20 a 21: Příklady použití jednokanálových i vícekanálových automatických pipet.
- Obrázek č. 22: Příklad zbarvení vzorků při měření enzymatické aktivity lakázy.
- Obrázek č. 23: Příklad zbarvení vzorků při měření enzymatické aktivity Mn-dependentní peroxidázy.

Příloha č. 2: Tabulky s přírůstky mycelia z pokusu č. 1

Příloha č. 3: Tabulky s přírůstky mycelia z pokusu č. 2

Příloha č. 4: Tabulky s přírůstky mycelia z pokusu č. 3

Příloha č. 5: Tabulky s přírůstky mycelia z pokusu č. 4

Příloha č. 6: Tabulky s přírůstky mycelia z pokusu č. 6

Obsah

OBSAH	10
1 ÚVOD	12
2 CÍL PRÁCE A HYPOTÉZA	13
2.1 VLIV OŠETŘENÍ SUBSTRÁTU RŮZNOU KONCENTRACÍ PEROXIDU VODÍKU NA PRORŮSTÁNÍ MYCELIA <i>TRAMETES VERSICOLOR</i>	13
2.2 STANOVENÍ AKTIVITY CELULOLYTICKÝCH A LIGNOLYTICKÝCH ENZYMŮ V PROROSTLÉM SUBSTRÁTU	13
2.3 HYPOTÉZA	13
3 LITERÁRNÍ REŠERŠE	14
3.1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA HUB	14
3.2 OUTKOVKA PESTRÁ	15
3.2.1 <i>Používané názvy</i>	15
3.2.2 <i>Systematika</i>	15
3.2.3 <i>Charakteristika</i>	15
3.2.4 <i>Pěstování a fyziologické požadavky</i>	17
3.2.5 <i>Léčivé účinky</i>	18
3.3 HLÍVA ÚSTRÍČNÁ	21
3.3.1 <i>Používané názvy</i>	21
3.3.2 <i>Systematika</i>	21
3.3.3 <i>Charakteristika</i>	21
3.3.4 <i>Pěstování a fyziologické požadavky</i>	22
3.3.5 <i>Léčivé účinky</i>	23
3.4 VLIV ENZYMŮ	25
3.4.1 <i>Enzymy</i>	26
3.4.2 <i>Celulolytické enzymy</i>	26
3.4.2.1 <i>Celulózy</i>	27
3.4.2.2 <i>Xylanázy</i>	28
3.4.3 <i>Lignolytické enzymy</i>	28
3.4.3.1 <i>Lakáza</i>	29
3.4.3.2 <i>Mangan- dependentní peroxidáza</i>	30
3.4.3.3 <i>Ligninperoxidáza</i>	30
3.5 PEROXID VODÍKU V PĚSTOVÁNÍ HUB	32
4 METODIKA	34
4.1 RŮSTOVÉ ZKOUŠKY MYCELIA <i>TRAMETES VERSICOLOR</i> PŘI OŠETŘENÍ SUBSTRÁTU RŮZNOU KONCENTRACÍ PEROXIDU VODÍKU	34
4.1.1 <i>Harmonogram pokusů</i>	34
4.1.2 <i>Pokus č. 1</i>	37
4.1.3 <i>Pokus č. 2</i>	38
4.1.4 <i>Pokus č. 3</i>	38

4.1.5	<i>Pokus č. 4</i>	39
4.1.6	<i>Pokus č. 5</i>	39
4.1.7	<i>Pokus č. 6</i>	40
4.2	STANOVENÍ AKTIVITY CELULOLYTICKÝCH A LIGNOLITICKÝCH ENZYMŮ V PROROSTLÉM SUBSTRÁTU	42
4.2.1	<i>Měření aktivity celulolytických a lignolytických enzymů</i>	42
5	VÝSLEDKY	47
5.1	RŮSTOVÉ ZKOUŠKY MYCELIA	47
5.1.1	<i>Pokus č. 1</i>	47
5.1.2	<i>Pokus č. 2</i>	49
5.1.3	<i>Pokus č. 3</i>	53
5.1.4	<i>Pokus č. 4</i>	56
5.1.5	<i>Pokus č. 5</i>	59
5.1.6	<i>Pokus č. 6</i>	62
5.2	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ	66
5.3	STANOVENÍ AKTIVITY CELULOLYTICKÝCH A LIGNOLYTICKÝCH ENZYMŮ	70
5.3.1	<i>Měření č. 1</i>	70
5.3.2	<i>Měření č. 2</i>	72
6	DISKUSE	75
7	ZÁVĚR	81
8	SEZNAM LITERATURY	82
9	PŘÍLOHY	86

1 Úvod

V dnešní době vzbuzují některé dřevokazné houby v lidech nezájem, možná i strach z jejich konzumace. Je málo známo, že většina jedlých dřevokazných hub je výbornou kulinářskou záležitostí a jsou tedy významnou potravinou v české i zahraniční kuchyni. Je také mnoho dřevokazných hub (i nejedlých), které svůj význam získaly díky nespočtu léčivých účinků, které jsou výborným doplňkem v léčbě některých civilizačních onemocnění. Dřevokazné saprotrofní houby rostou většinou na zbytcích odumřelého dřeva v různých fázích rozkladu (spadlé stromy a větve, pařezy apod.). Působením na těchto organických zbytcích získávají živiny sami pro svůj vývoj, a mají význam v koloběhu života.

Vybranými dřevokaznými houbami v této práci jsou *Trametes versicolor* (outkovka pestrá) a *Pleurotus ostreatus* (hlíva ústříčná). Outkovka pestrá je nejedlá houba s významnými léčivými účinky. Tato houba se podává ve formě tablet či kapslí vyrobených z mycelia napěstovaném na obilných zrnech nebo z pomletých plodnic. Plodnice outkovky se také používají k vyluhování při přípravě čajů, polévek a tinktur přidávaných do dalších pokrmů. Využívá se jako doplněk stravy v léčbě nádorových onemocnění, jako je například rakovina žaludku, dále jako antivirotikum při léčbě HIV, nebo jako imunomodulační přípravek ke zvyšování obranyschopnosti organismu.

Hlíva ústříčná je velmi známá jedlá houba, která je běžně k dostání na českém trhu jako potravinu vhodná k přípravě různých pokrmů. Pěstební bloky substrátu naočkované touto houbou jsou k dostání také v hobby prodejnách a zajišťují snadné vypěstování hlívy i v domácích podmínkách. Plodnice hlívy ústříčné jsou oblíbeným doplňkem salátů, polévek a omáček, ale připravují se také jako minutky a slouží jako suroviny pro přípravu samostatných jídel. Především v obchodech se zdravou výživou jsou k dostání doplňky stravy vyrobené z plodnic hlívy ve formě tablet a kapslí, extraktů nebo směsí s jinými surovinami. Léčivých účinků hlívy se využívá zejména při léčbě nádorových onemocnění, ke snižování cholesterolu, ke zvyšování aktivity imunitního systému, při prevenci před onemocněním AIDS a Alzheimerovou chorobou a dalších nemocí.

2 Cíl práce a Hypotéza

2.1 VLIV OŠETŘENÍ SUBSTRÁTU RŮZNOU KONCENTRACÍ PEROXIDU VODÍKU NA PRORŮSTÁNÍ MYCELIA *TRAMETES VERSICOLOR*

Prvním cílem této diplomové práce na téma Vliv ošetření substrátu na růst a aktivitu mycelia vybraných dřevokazných hub bylo založit několik pokusů, při kterých bude sledována schopnost mycelia houby *Trametes versicolor* osídlit substrát ošetřený různými koncentracemi peroxidu vodíku jako alternativního způsobu desinfekce substrátu. Jako kontroly bylo použito kultury *Pleurotus ostreatus*.

2.2 STANOVENÍ AKTIVITY CELULOLYTICKÝCH A LIGNOLYTICKÝCH ENZYMŮ V PROROSTLÉM SUBSTRÁTU

Druhým cílem práce je stanovit aktivitu celulolytických a lignolytických enzymů v prorostlém substrátu myceliem hub *Trametes versicolor* a *Pleurotus ostreatus* a určit, zda tato enzymatická aktivita byla nějakým způsobem ovlivněna přidavkem peroxidu vodíku.

2.3 HYPOTÉZA

Různé koncentrace peroxidu vodíku průkazně ovlivní schopnost mycelia houby *Trametes versicolor* kolonizovat pěstební substrát a sníží jeho kontaminaci.

3 Literární rešerše

3.1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA HUB

Houby tvoří samostatnou říši, protože jejich znaky se významně liší od znaků rostlin a nemohou být tedy řazeny do stejné říše jako rostliny. Věda, která se zabývá studiem hub, se nazývá mykologie. Z morfologického hlediska lze houby charakterizovat jako stélkaté, jednobuněčné a mnohobuněčné organismy. Houby patří mezi eukaryotní organismy, protože na rozdíl od bakterií a sinic mají jádro a jadernou membránu. Většinou vláknitá stélka má jednoduchou stavbu a není rozlišena jako u rostlin na kořen, stonek, list a pravá pletiva. Společnými znaky hub a živočichů je, že buněčnou stěnu stélky tvoří nejčastěji chitin (např. skelet u hmyzu) a obsah rezervních látek (glykogen) v buňkách. Rozmnožování hub je zajištěno výtrusy vzniklými pohlavním i nepohlavním způsobem. Výtrusy jsou odlišné od semen rostlin tím, že nemají embryo (Klán 1989).

Z ekologického hlediska lze houby charakterizovat jako heterotrofní organismy, které neobsahují chlorofyl a jsou tedy odkázány na příjem organických uhlíkatých látek. Způsob výživy charakteristický pro saprotrofy je rozklad odumřelých organických látek na jednodušší látky pomocí enzymů. Tyto jednoduché látky pak absorbují ve vodných roztocích. Mykorhizní houby jsou houby žijící v symbióze se zelenými rostlinami. Parazitické houby se vyživují na živé rostlině nebo živočichovi.

Počet existujících hub je kolem 300 000 druhů na celém světě. Všechny druhy lze rozdělit na mikromycety a makromycety. Mikromycety jsou houby, které mají většinou mikroskopické rozměry. Makromycety tvoří plodnice okem rozeznatelné.

3.2 OUTKOVKA PESTRÁ

3.2.1 Používané názvy

<u>Latinský název:</u>	<i>Trametes versicolor</i> (L.:Fr.) Pilat
<u>Anglický název:</u>	Turkey tail, Many-Colored Polypore, Cloud Mushroom
<u>Čínský název:</u>	Yun Zhi
<u>Japonský název:</u>	Kawaratake

Synonyma: *Polyporus versicolor*
Coriolus versicolor
Boletus versicolor

(Stamets, 2000)

3.2.2 Systematika

<u>Říše:</u>	Houby – <i>Fungi</i>
<u>Oddělení:</u>	houby stopkovýtrusné – <i>Basidiomycota</i>
<u>Třída:</u>	stopkovýtrusné – <i>Basidiomycetes</i>
<u>Podtřída:</u>	houby rouškaté – <i>Agaricomycetidae</i>
<u>Řád:</u>	chorošotvaré – <i>Polyporales</i>
<u>Čeleď:</u>	chorošovité – <i>polyporaceae</i>
<u>Rod:</u>	outkovka – <i>Trametes</i>

(Kalina, Váňa, 2005)

3.2.3 Charakteristika

Stamets (2000) uvádí, že outkovka pestrá je nejvíce rozšířená a nejsnadněji rozpoznatelná houba z čeledi chorošovitých. Tento vícebarevný choroš má dlouhou historii použití a je uznáván na celém světě. Antonín a spol. (v tisku) uvádějí, že outkovka je široce rozšířeným druhem v Evropě, Asii, Severní Americe, Austrálii a v tropické Africe.

Trametes versicolor byla dříve známá také jako *Polyporus versicolor*, později také jako *Coriolus versicolor*. Tato houba patří mezi nejlépe prozkoumané a neúčinnější houby z hlediska jejich léčivých účinků. Podle tvaru plodnic je také nazývána Turkey Tail – krocaní ocas. Outkovka je velmi přizpůsobivý druh, který se vyskytuje ve velmi širokém sortimentu v tropických, subtropických a mírných pásmech celé zeměkoule. Outkovka často vytváří kolonie plodnic od jara do podzimu, zejména na polenech tvrdého dřeva a na pařezech poražených listnatých a méně často i jehličnatých stromů. Nejčastěji ji lze nalézt v listnatých lesích na dubech, olších, osikách, jilmech a na eukalyptu. Jako jedna z mála dobře roste i na dřevě jabloní, třešní a dalších ovocných stromů. Měkčí dřevo je touto houbou rychleji spotřebováváno, což vede k jeho rychlejšímu rozkladu. V jehličnatých lesích lze outkovku nalézt zvláště na jedli, smrku, borovici, modřinu, jalovci a cypřiši. Kmeny houby jsou v kultuře obvykle velmi agresivní. V subtropických oblastech je outkovka běžným konkurentem divokých kmenů shiitake (houževnatec jedlý). Je to houba s mnohem menším obsahem vody než většina ostatních hub. Obsahuje 75 – 80 % vody. Ze dvoukilového bloku pilin je průměrný výnos 100 – 200 g suchých hub (Stamets, 2000).

Plodnice outkovky často tvoří vějíře s mírně chlupatým a obvykle zvlněným vnějším okrajem. Jsou velmi tvrdé, ale poddajné. Do pletiva lze proniknout pouze mimořádně ostrým nožem. Plodnice jsou velmi proměnlivé v barvě. Odstíny barev jsou bohaté na zemité tóny šedé a hnědé, často s modrými, zelenými, načervenalými nebo bělavými zónami. Spodní část plodnice je pokryta bělavými póry. Třeň u outkovky chybí. Pokud nějaký má, tak je úzký a krátký (Stamets, 2005).

Antonín a spol. (v tisku) píše, že jednoleté plodnice jsou kloboukaté a většinou střečovitě uspořádané nad sebou. Klobouk bývá široký 20 – 80 mm, plochý, ledvinovitý až vějířovitý, hedvábně lesklý, plstnatý, ale ve stáří téměř olysávající. Barevně má outkovka klobouk obvykle velmi rozmanitý. Bývá šedě, okrově, hnědě, červenohnědě, modravě nebo černě pásovaný, v mládí na okraji bělavý až okrový, ve stáří až černý. Rourky jsou vysoké 0,5 – 2 mm. Nešednouce póry jsou drobné, široké 0,15 – 0,3 mm, bílé až krémové, ve stáří však slámově žluté. Dužnina outkovky je velmi tuhá, tlustá 1 – 2 mm, od plsti oddělená na povrchu klobouku tmavou zónou. Bezbarvé výtrusy měří 5 – 6 × 1,5 – 2,2 μm, jsou tenkostěnné, válcovité a prohnuté.

3.2.4 Pěstování a fyziologické požadavky

Podle Stametse (2005) je nejjednodušším způsobem rozšiřování mycelia přenesení jeho části na další substrát (dřevo). K úspěšnému přenosu podhoubí na nové místo je lepší použít mladé mycelium, které má vyšší aktivitu. Pokud je mladé podhoubí zaočkováno do správné směsi materiálu, bude jeho růst na novém místě rychlý a úspěšný. Důležité je na novém místě vytvořit ekosystém, který bude stejný nebo alespoň podobný tomu, ze kterého bylo podhoubí odebráno pro další kolonizaci. Vytvoření stejného prostředí je snazší pro houby saprotrofní než pro mykorrhizní.

Stamets (2000) uvádí, že neefektivnější je používat sadbu na dřevěných kolíčkách, obilných zrnech, pilinách nebo dřevěných klínech. Outkovku lze také pěstovat na polenech nebo v květináčích. Sadba na obilných zrnech musí být použita včas, aby mycelium nerozložilo nosné medium a nevzniklo husté podhoubí, které by značně ztížilo oddělení zrn od sebe a očkování. Mycelium na obilných zrnech lze očkovat přímo do polen tvrdého dřeva, pilin nebo hoblin. Piliny jsou podhoubím rychle rozkládány až do stádia, kdy dřevo ztratí zcela svou strukturu. Podle Antonína a spol. (v tisku) lze outkovku pěstovat jako surovinu pro výrobu doplňků stravy buď z plodnic houby, mycelia prorostlého pevnými substráty, nebo také ze submerzně kultivovaného mycelia v živných roztocích. Pro získání plodnic lze tuto houbu pěstovat tradičně na špalcích dřeva, na pařezech nebo na sypkých substrátech. Nejvhodnějšími sypkými substráty pro pěstování outkovky jsou piliny listnatých stromů s přidavkem pšeničných otrub nebo semen různých plodin (kukuřice, lnu, slunečnice). Sypký substrát lze připravit i z pilin smíchaných s jemně drcenou slámou. Tuto směs je potřeba doplnit vodou na 66 – 68 % vlhkosti, naplnit do sáčků, které jsou odolné vůči vysokým teplotám a takto v sáčcích substrát vysterilizovat při teplotě 121 °C.

Stamets (2000) píše, že ideální inkubační teplota pro prorůstání mycelia outkovky je 24 – 29 °C. Antonín a spol. (v tisku) uvádějí, že ve sterilním substrátu naočkovaném myceliem houby se udržuje teplota 20 – 24 °C, při které podhoubí roste nejrychleji. Podle Stametse (2000) je pro kolonizaci podhoubí třeba zajistit prostředí bez světla, s koncentrací CO₂ menší než 5 000 ppm a relativní vzdušnou vlhkost 90 – 100 %. Výměna čerstvého vzduchu je ideální jednou za hodinu. Při zajištění ideálních podmínek trvá prorůstání mycelia outkovky 14 – 21 dní

v závislosti na druhu a velikosti kolonizovaného media. Antonín a spol. (v tisku) doplňují, že kolonizace podhoubí v blocích substrátu trvá přibližně 40 dní. Rychlost prorůstání mycelia outkovky lze srovnat s rychlostí mycelia hlívy.

Na počátku tvorby primordií je ideální teplota 10 – 24 °C, primordia jsou schopna růstu i při teplotě maximálně 27°C. V tomto období je třeba zajistit světelné podmínky 500 – 2 000 luxů, relativní vzdušnou vlhkost 95 – 100 % a koncentraci CO₂ 400 – 800 ppm, tedy výrazně nižší než při inkubaci. Výměnu vzduchu je nejlépe provádět 5 – 7 krát za hodinu. Stádium vývoje primordií outkovky je při zajištění ideálních podmínek 7 – 14 dní. Vývoj plodnic outkovky probíhá při teplotách 18 – 24 °C a při relativní vzdušné vlhkosti 85 – 90 %, popřípadě až 95 % (Stamets, 2000). Antonín a spol. (v tisku) píše, že vývoj plodnic probíhá při teplotě 20 – 24 °C a relativní vzdušné vlhkosti 85 – 90 %. Plodnice se vytvářejí v průběhu 2 – 3 týdnů po proříznutí otvorů v boku sáčku s prorostlým substrátem. Stamets (2000) doplňuje, že koncentraci CO₂ je třeba mít v tomto stádiu růstu v rozmezí 500 – 1000 ppm. Požadavky na světlo a výměnu čerstvého vzduchu jsou stejné jako ve stádiu tvorby primordií, tedy intenzita světla 500 – 2000 luxů a výměna vzduchu 5 – 7 krát za hodinu. Vývoj plodnic trvá 45 – 70 dní, kdy je třeba postupně provést 2 – 3 sklizňové vlny.

3.2.5 Léčivé účinky

Ačkoliv není outkovka (*Trametes versicolor*) jedlou houbou, díky svým léčivým účinkům patří k těm nejuznávanějším léčivým houbám.

Významnou léčivou látkou obsaženou v outkovce je PSK, běžně známá jako Krestin. Tento glykoprotein je v Asii schválen jako lék proti rakovině. Bylo zjištěno, že PSK snižuje vývoj metastáz u pacientů s rakovinou. V klinických studiích s pacienty postiženými rakovinou žaludku bylo prokázáno, že u těch, kteří podstoupili léčbu chemoterapií v kombinaci s přípravkem obsahujícím PSK, došlo ke snížení recidivy a nárůstu přežití pacientů. Bylo také zjištěno, že PSK je silné antibiotikum působící proti *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* a dalším mikrobům patogenním pro člověka (Stamets, 2000).

Antonín a spol. (v tisku) píše, že látka PSK byla poprvé izolována v roce 1987 japonskou firmou Kureha pro léčbu nádorového onemocnění žaludku. Outkovka se ukázala jako nejvhodnější z více než 200 druhů sledovaných hub. V Japonsku se látka PSK, neboli Krestin, stala významným farmaceutickým protirakovinovým přípravkem zaujímajícím 25,2 % trhu. Glykoprotein Krestin je tvořen z 62 % polysacharidem a z 38 % bílkovinou. Získává se z vyšlechtěného kmene *Trametes versicolor* CM-101. V Asii, především v Číně a Japonsku je Krestin povolen k podpůrné terapii nádorových onemocnění. V západní Evropě tato látka jako lék není povolena, protože je PSK sice účinná látka, ale je to komplexní sloučenina. Podle Evropské legislativy může být povolen pouze lék s definovanou účinnou látkou a s popsáním mechanismem účinku.

Další látkou izolovanou z *Trametes versicolor* je podle Stametse (2000) ve vodě dobře rozpustný polysacharopeptid PSP, který prokazuje účinky jako antivirotikum při léčbě HIV. Z několika studií bylo zjištěno, že různé formy tohoto polysacharopeptidu působí příznivě také proti šíření lidské leukémie HL-60, podporují obnovu buněk následující po záření gama a až pětinasobně zvyšují aktivitu NK buněk. Tyto velké buňky imunitního systému jsou schopné zabít nádorové buňky či buňky napadené virem.

Antonín a spol. (v tisku) uvádějí, že látka PSP je známá jako glykoprotein Coriolan, izolovaný z vyšlechtěného kmene houby COV-1. Coriolan je tvořen polysacharidem z 90 % a peptidy z 10 %. Od Krestinu se liší složením cukrů. Vyznačuje se protinádorovými, hepatoprotektivními, protivirovými vlastnostmi a imunomodulačními schopnostmi. V outkovce je také obsažena řada sterolů – ergosterol (provitamin D2), fungisterol a β -sitosterol.

Outkovka je už po staletí používána jako lék přírodní medicíny. Látky se z robustních a kožených plodnic extrahují ve vodě tím, že se vaří v polévkách nebo jako čaje. Z plodnic v práškové formě se vyrábějí tobolky jako doplněk stravy nebo přísady do čajů a polévek. Většina léčivých přípravků, které jsou na trhu, jsou vyrobeny z mycelia této houby (Stamets, 2000).

Podle Antonína a spol. (v tisku) je outkovka studována také jako modelový organismus rozkládající lignin. V západní Evropě lze spatřit kusy dřeva s plodnicemi outkovky v interiérech jako součást aranží floristů.

Stamets (2005) poukazuje na to, že 100 g *Trametes versicolor* obsahuje 369 kalorií; 10,97 g bílkovin; 1,51 g tuků – z toho 0,27 g polynenasycených tuků,

0,32 g celkem nenasycených tuků a 0,06 g nasycený tuků; 77,96 g sacharidů – z toho 76,06 g komplexních sacharidů a 1,90 g cukrů; 71,30 g vlákniny. Dále obsahuje thiamin B1 0,07 mg; kyselinu pantotenovou B5 1,70 mg; vitamín D 62 IU*; vápník 34 mg; měď 0,65 mg; železo 8,7 mg; draslík 570 mg; niacin 9,30 mg; riboflavin 1,06 mg; selen 0,007 mg a sodík 6 mg. Obsah vody v plodnicích je 8,00 g a popelovin 1,56 g. Cholesterol, vitamin A a vitamín C měly nulové hodnoty.

Podle Antonína a spol. (v tisku) jsou na trhu k dostání doplňky stravy z outkovky pestré. Doplňky stravy mají podobu tablet nebo kapslí plněných usušeným a pomletým myceliem houby napěstované na zrnech obilovin. Produkce mycelia outkovky pro extrakci účinných látek probíhá převážně submerzně v tekuté živné půdě v biotechnologických provozech.

* IU: *International Unit* – mezinárodní jednotka, používaná ve farmakologii a v lékařství.



Trametes versicolor (outkovka pestrá)

zdroj:

<http://www.houbareni.cz/disc.php?start=830>



Pleurotus ostreatus (hlíva ústříčná)

zdroj:

http://www.terezia.eu/cz/produkt/hliva_ustricna_v_kapslich

3.3 HLÍVA ÚSTŘIČNÁ

3.3.1 Používané názvy

<u>Latinský název:</u>	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.:Fr.) Kumm.
<u>Anglický název:</u>	The Oyster Mushroom, Tree Oyster, Oyster Shelf
<u>Japonský název:</u>	Hiratake (j.), Tamogitake Hiratake (j.), Tamogitake

(Poslušná, 2012)

3.3.2 Systematika

<u>Říše:</u>	Houby – <i>Fungi</i>
<u>Oddělení:</u>	houby stopkovýtrusné – <i>Basidiomycota</i>
<u>Třída:</u>	stopkovýtrusné – <i>Basidiomycetes</i>
<u>Podtřída:</u>	houby rouškaté – <i>Agaricomycetidae</i>
<u>Řád:</u>	lupenotvaré – <i>Agaricales</i>
<u>Čeleď:</u>	hlívovité – <i>Pleurotaceae</i>
<u>Rod:</u>	hlíva – <i>Pleurotus</i>

(Kalina, Váňa, 2005)

3.3.3 Charakteristika

Jablonský a Šašek (2006) uvádí, že hlívu ústřičnou lze běžně nalézt v létě a na podzim v lesích na kmenech a pařezech. Její plodnice vyrůstají nad sebou střešovité, v trsech nebo jednotlivě. Její podhoubí osidluje většinou listnaté stromy ve všech vegetačních pásech a zeměpisných šířkách obou polokoulí. Výjimkou, která osidluje listnaté i jehličnaté stromy, je hlíva holubí (*Pleurotus ostreatus* var. *columbinus*).

Mycelium hlívy způsobuje bělavé trouchnivění dřeva. Pro živé stromy však není příliš nebezpečná, protože mycelium naočkované na zdravé stromy se dále nešíří. Pouze u stromů silně oslabených byl pozorován kalamitní výskyt hlívy.

Jablonský a Šašek (1997) píše, že plodnice hlívy ústříčné mají klobouk masitý v průměru až 150 mm, úzce podvinutý na okrajích v mládí, později rozložený. Na povrchu je hladký a suchý. Barvu má šedou až hnědou, někdy modročernou. Poměrně tlustá dužnina je bělavá s příjemnou vůní a chutí. Dosti řídké, bělavé lupeny jsou celokrajné a sbíhají se na třeň. Až 50 mm dlouhý třeň je obvykle excentrický až postranní, tlustý asi 20 mm, na povrchu podélně rýhovaný nebo hladký. Hladké bezbarvé výtrusy jsou válcovitého tvaru.

3.3.4 Pěstování a fyziologické požadavky

Hlíva ústříčná je houba pěstovaná na lignocelulózových odpadech, které obsahují lignin, celulózu a hemicelulózu. V přírodě roste především na odumřelém dřevě. Rychlý růst má také na různých organických odpadech – na slámě, kukuřičných větenech, hrachovině, pazdeří, vojtěškovém seně nebo i na papíře. Pro pěstování na těchto surovinách se předpokládá jejich předchozí tepelné ošetření.

Optimální teplota pro vyklíčení spor je 28 °C. Při této teplotě dosahuje hlíva také maximálního růstu mycelia. Růst mycelia je značně zpomalen při teplotě 20 °C, což má za následek znevýhodnění hlívy oproti některým kompetičním mikroorganismům. Mycelium růst zcela zastaví při teplotě 5 °C, ale mrazem poškozeno není. Po zvýšení teploty začíná opět růst a kultura může vytvářet plodnice. Větší problémy činí letní teploty, kdy je prorůstající substrát vystaven přehřívání v důsledku zvýšené aktivity mycelia. V závislosti na vlhkosti mycelium odumírá při teplotě nad 32 – 35 °C. Optimální teploty pro nasazování z árodků plodnic jsou v rozmezí 8 – 12 °C. Pokud je prorostlý substrát vystavený tzv. chladovému šoku, může hlíva ústříčná vytvářet plodnice i při teplotě nad 15 °C. V opačném případě se při teplotě nad 15 °C tvorba plodnic zcela zastavuje. V současné době byly vyšlechtěny hybridy pěstovaných hlív, které vznikly křížením hlívy ústříčné s některými teplomilnými kmeny hlív, a tak není třeba teplotního šoku a kultury houby vytvářejí plodnice i při vyšších teplotách (17 – 22 °C).

Optimální hodnoty pH se pohybují pro růst podhoubí v rozmezí 5,5 – 6,5. Jiné hodnoty pH růst mycelia zpomalují. Hodnoty pH se během prorůstání mycelia v substrátu mění. Ve vnitřních vrstvách je pH podstatně vyšší než v povrchové vrstvě, kde se nasazují plodnice. Na povrchu substrátu se hodnoty

pH pohybují v rozmezí 4 – 4,5. Vliv světla je u hlívy ústříčné důležitý především při nasazování a vývoji plodnic. Při kolonizaci substrátu hlíva osvětlení nevyžaduje vůbec. Naopak pro normální vývoj plodnic je třeba 12 hodin denně osvětlení o intenzitě 100 – 400 luxů. Větší nároky na osvětlení má hlíva při vyšších teplotách, kdy plodnice rostou rychleji než při teplotách nižších. Při nedostatku osvětlení plodnice tvoří protáhlý třeň a zakrnělý klobouk světlejší barvy. Hlíva ústříčná se vyznačuje odlišnými nároky na koncentraci oxidu uhličitého v prostředí v jednotlivých fázích vývoje. Při prorůstání substrátu má mycelium nejvyšší intenzitu růstu, jestliže koncentrace CO_2 v substrátu je 2 000 – 3 000 ppm. Pokud je v substrátu udržena vysoká koncentrace CO_2 , je potlačen růst konkurenčních zelených plísní. Z důvodu udržení vyšší koncentrace se pěstební bloky či pytle perforují jen částečně. Na koncentraci CO_2 během vývoje plodnic reagují jednotlivé kmeny hlívy rozdílně. Citlivější kmeny mají nižší výnos již při koncentraci 800 ppm, naopak tolerantnější kmeny vykazují snížení výnosu až při koncentraci 1 500 ppm. Optimální koncentrace CO_2 pro nasazování a vývoj plodnic je 400 – 600 ppm. Při vyšší koncentraci se tvoří deformované plodnice. Nejčastěji se vlivem vysoké koncentrace CO_2 tvoří šroubovitě stočené a protáhlé třeně, zakrnělý klobouk a měkká dužnina. Silně ztlustlé třeně a zakrnělé klobouky nálevkovitého tvaru je další možnost deformace vlivem vysoké koncentrace CO_2 . Aby se předešlo těmto deformacím, je třeba včas reagovat a v pěstírnách intenzivně větrat. Z toho plyne, že proces prorůstání mycelia je semiaerobní (za částečného přístupu vzduchu) a vývoj plodnic je aerobní (za přístupu vzduchu) (Jablonský a Šašek, 2006).

3.3.5 Léčivé účinky

Hlívy obsahují četné léčivé látky. Jablonský a Šašek (2006) popisují velmi významnou léčivou látku obsaženou v hlívě, kterou je jeden z glukánů, nazývaný pleuran. Glukany mají vliv na zvyšování aktivity imunitního systému a projevují protivirové a protizánětlivé vlastnosti. Mimo těchto léčivých účinků přispívají glukany ke snižování cholesterolu. Maršálek (2000) doplňuje, že tato látka byla popsána poprvé na přelomu 20. století. Podle Nováka (2007) je β -glukan významný pro své fyziologické účinky. Je to látka, která se označuje také jako modifikátor biologické

odpovědi. Pleuran (HA-glucan) obsažený v hlívě ústřední u hostitele vykazuje zvýšení rezistence vůči virovým, fungálním, parazitárním a bakteriálním infekcím. Vykazuje také protinádorový efekt, radioprotektivní účinky a prevenci karcinogeneze. Je prokázáno i využití glukanu při profylaxi v následku použití biologických zbraní, například při nákaze antraxem. Kromě snižování hladiny sérového cholesterolu pleuran snižuje hladinu jaterního lipoproteinu, což vede ke snižování rizika onemocnění srdce a aterosklerózy (kornatění tepen). β -glukany také aktivují v centrálním nervovém systému mikrogliové buňky, které jsou významné při ochraně před onemocněním AIDS a Alzheimerovou chorobou.

Další skupinou látek mající léčivé účinky jsou podle Jablonského a Šaška (2006) terpeny. Významnou látkou z této skupiny je pleurotin, který je i uměle syntetizovaný. Terpeny se vyznačují antibiotickou a protirakovinnou aktivitou. Imura (2005) píše, že pleurotin poprvé izoloval Robbinsen a kol. v roce 1947, ale až v roce 1981 byla potvrzena jeho struktura pomocí rentgenové krystalografie. Významná je také biologická aktivita pleurotinu proti rychle rostoucím nádorům, Ehrlichova karcinomu a L-1210 lymfoidní leukémii, dále pak proti pomalu rostoucímu spontánnímu nádoru prsu a také proti grampozitivním bakteriím.

Aktivní látkou k odbourávání cholesterolu je mimo jiné lovastatin (monakolin-K), který se řadí do skupiny statinů. Také dietetická vláknina má vliv na snižování cholesterolu, a to především chitin a z něj vznikající chitosan (Jablonský a Šašek, 2006). Lüllmann et al. (2004) doplňuje, že užíváním lovastatinu je snižován výskyt kostních zlomenin u starších lidí.

Podle Jablonského a Šaška (2006) mají plodnice hlívy také antibiotické a antifungální vlastnosti, které zajišťují glykopeptidy, zvané lektiny, ve směsi s ionty vápníku. Singh et al. (2010) také popisuje lektiny jako neimunitní proteiny nebo glykoproteiny, které vážou cukry. Mimo antifungální a protivirové vlastnosti má lektin také mitogenetický, imunostimulační a protinádorový potenciál.

Jablonský a Šašek (2006) upozorňují, že na trhu je široký výběr přípravků a doplňků stravy z hlívy ústřední. Především v obchodech se zdravou výživou je široká nabídka tabletovaných doplňků stravy, sušené směsi zeleniny s hlívou, sušené plodnice hlívy, ale také vodné nebo alkoholové tekuté extrakty. Čerstvé plodnice mají také velký význam v kuchyňském zpracování. Nejčastěji se upravují narychlo jako minutky nebo k přípravě houbových salátů, anebo se také používají jako surovina do dalších pokrmů.

3.4 VLIV ENZYMŮ

Killham (2001) uvádí, že mineralizaci neboli rozklad organické hmoty zajišťují nejčastěji mikroorganismy a jejich aktivita v přeměně prvků. Tento proces závisí na množství mikroorganismů a jejich aktivitě, složení organické hmoty a podmínkách půdního prostředí. Bakterie, aktinobakterie, archeobakterie a půdní houby jsou mikroorganismy, které rozkládají aminokyseliny a jednoduché cukry, ale také i odolné polymery jako huminové kyseliny a lignin. Kotrbová (2011) doplňuje, že rychlost mineralizace závisí na složení organické hmoty. Nejrychleji jsou rozkládány cukry, jednoduché bílkoviny a škrob, poté následují celulóza, hemicelulóza a složitější bílkoviny. Dále se rozkládají tuky a vosky a nejpomalejší rozklad má lignin.

Stopkovýtrusné houby, které používají enzymy k rozrušování a rozkládání celulózy a ligninu, se nazývají houby dřevokazné. Tyto druhy hub jsou charakteristické svou schopností napadat mrtvé i živé stromy, čímž způsobují hnilobu dřeva. Dřevní hniloby lze rozdělit na bílou a hnědou. Bílá hniloba je specifická v rovnoměrném rozkladu všech složek buněčné stěny. To znamená, že rovnoměrně rozkládá lignin, celulózu i hemicelulózu. Hnědá hniloba však rozkládá především jen celulózu a hemicelulózu, a lignin minimálně.

Pro budování stélky a jako zdroj energie jsou důležité organické živiny. Ze specifických organických substrátů jsou štěpeny enzymy, které se převádějí ve formě produktů štěpení do buňky, a zde jsou pomocí metabolického aparátu přeměněny na důležité stavební jednotky a zdroj energie. Stavební jednotky jsou nezbytné především pro tvorbu růstových látek, například pro tvorbu plodnic. Degradaci dřeva způsobují enzymy celulóza, xylanáza, lakáza a peroxidáza (Poslušná, 2012).

Baldrián (2008) doplňuje, že dekompoziční houby využívají mrtvou organickou hmotu, která se skládá především z polysacharidů buněčných stěn a dalších biopolymerů. Patří mezi ně polymery rostlinného původu, jako je celulóza, hemicelulóza, lignin a pektin. Dále polysacharidy hub, jako je chitin a rezervní polysacharidy, jako je škrob. Polysacharidy na bázi biopolymerů jsou obvykle degradovány hydrolytickými enzymy a způsobují endo- nebo exoštěpení. Probíhá také výroba lyáz a specifických oxidáz. Dřevokazné celulólytické houby se vyvinuly složitým systémem neenzymatických štěpení celulózy na základě produkce reaktivních kyslíkových forem. Avšak relativní význam tohoto rozkladu

je stále nejasný. Extracelulární enzymy, které degradují biopolymery, jsou jedním z charakteristických rysů saprotrofních stopkovýtusných hub.

3.4.1 Enzymy

Enzymy jsou podle Matouškové (2011) makromolekuly bílkovinné povahy s katalytickou funkcí. Jsou obsaženy ve všech živých systémech a pravděpodobně i v nejjednodušších buňkách je obsaženo přes 3 000 enzymů, které řídí rychlost probíhajících reakcí v buňkách. Enzymy lze rozdělit podle místa působení na intracelulární a extracelulární. Většina enzymů zůstává uvnitř buňky, kde vznikly, a nazývají se enzymy intracelulární. V buňce vytváří organizované funkční komplexy, multifunkční enzymy a multienzymové jednotky. Enzymy, které jsou, jako mikroorganismy vylučovány do kultivačního prostředí se nazývají extracelulární. Těmito enzymy jsou zejména enzymy, které katalyzují hydrolýzu živin.

3.4.2 Celulolytické enzymy

Celulóza a hemicelulóza jsou podle Mackuľaka a Prouska (2010) hlavní zdroje při využívání biomasy rostlinného původu. Celulózy vzniká ročně $1,5 \times 10^9$ tun, takže je díky tomu nejrozšířenějším biopolymerem na zemi. Její hlavní strukturní jednotkou je D-glukóza. Vzhledem k dobré rezistenci vůči různým způsobům degradace je jako zdroj uhlíku a energie pro některé živočichy nepoužitelná. Tito živočichové neprodukují enzym, pomocí kterého by byli schopni rozštěpit β -1,4- vazby mezi jednotlivými glukózovými jednotkami. Celulózu štěpit a metabolizovat umějí pouze anaerobní plísňe, některé aerobní plísňe a dřevokazné houby. Býložravci mají ve svém trávicím traktu symbiotické bakterie a anaerobní plísňe, které rozštěpí celulózu na produkty, které jsou pro živočichy použitelné jako zdroj energie. Při mikrobiologickém štěpení celulózy je produkována celotetróza, celotrióza, celobióza až po glukózu. Baldrián (2008) dodává, že celulóza obsahuje krystalické oblasti, kde jsou jednotlivé řetězce navzájem propojeny, a méně uspořádané amorfní oblasti. Ačkoliv je celulóza chemicky jednoduchá, její krystalická struktura může mít za následek velmi složité morfologie. Hemicelulóza je nízkomolekulární nebo rozvětvený polymer, který obvykle obsahuje několik

různých jednotek cukru a substituovaných postranních řetězců. Rozvětvené polymery obsahují neutrální nebo kyselé vedlejší skupiny, které činí hemicelulózu nekystalickou nebo špatně krystalickou. Hemicelulóza tak tvoří živnou půdu obvykle spolu s pektiny a bílkovinami v primární stěně rostlinných buněk a lignin v sekundární buněčné stěně.

Podle Matouškové (2011) jsou hydrolytické (celulolytické) enzymy, které degradují dřevní hmotu, celulázy a xylanázy. Tyto enzymy štěpí hydrolytické vazby vzniklé kondenzací. Baldrián (2008) píše, že oxidační enzymy, které se účastní hydrolýzy celulózy, byly poprvé zjištěny v *Phanerochaete chrysosporium* v roce 1970. Vlastnosti enzymů umožňují rozklad celulózy i ligninu. Tyto enzymy byly objeveny v několika houbách bílé hniloby, například *Trametes versicolor*, *Heterobasidion annosum*, *P. chrysosporium*, *Pycnoporus cinnabarinus* a *Schizophyllum commune*. Enzym je znám také z hub hnědé plísně *Coniophora puteana* a z několika vřeckovýtrusných hub (*Ascomycetes*).

3.4.2.1 Celulázy

Matoušková (2011) zmiňuje, že enzym celuláza se podílí na degradaci celulózy. Při tomto přírodním procesu dochází k likvidaci rostlinných zbytků. Při procesu celuláza katalyzuje hydrolýzu celulózy až na D-glukózu. Celuláza je tvořena nejméně třemi enzymy: exo- β -1,4-glukanázou, endo- β -1,4-glukanázou a β -glukosidázou. Funkce exoceluláz je hydrolýza β -1,4-glykosidické vazby celulózy, při níž se uvolňuje celobiosa z neredukujícího konce řetězce. Hydrolýza celulózy endocelulázami je náhodná a vznikají při ní oligosacharidy, celobiosa a glukóza. Při hydrolýze β -glykosidázami vzniká z celobiosy glukóza. Zejména obsah vody v prostředí, hodnota pH a teplota jsou faktory ovlivňující rychlost degradace celulózy. Celulázy vykazují optimální aktivitu při pH 5 – 6 a teplotě 30 – 50 °C.

Celulolytické enzymy mají v současném průmyslu široké uplatnění. V potravinářském průmyslu se používají při výrobě ovocných šťáv, ke zlepšení nutriční kvality krmiva a jako přísada do detergentů. Další využití mají při výrobě papíru, bioetanolu a také v textilním průmyslu.

3.4.2.2 Xylanázy

Xylan je spolu s celulózou nejhojnějším polysacharidem v přírodě. Ke kompletní degradaci xylanu je zapotřebí několika hydrolytických enzymů: náhodně štěpících endoxylanáz, které štěpí hlavní řetězec xylanu (β -1,4 vázané xylozy), β -xylosidáz, které hydrolyzují xylooligomery a dalších enzymů, které štěpí postranní řetězce. Xylanázy jsou aktivní ve velkém rozpětí pH a teploty, avšak většina z nich má optimální aktivitu při pH 4 – 6 a v rozmezí teplot 30 – 60 °C.

Nejčastěji se xylanázy používají v pekařském průmyslu, kde zlepšují texturu a skladovatelnost chleba. Další využití mají v papírenském průmyslu, kde se používají pro rozvolnění a bělení buničiny, v textilním průmyslu a také při zpracování bioodpadů ze zemědělského a potravinářského průmyslu (Matoušková, 2011).

3.4.3 Lignolytické enzymy

Lignin je podle Matouškové (2011) po celulóze a hemicelulóze dalším nejrozšířenějším biopolymerem na Zemi. Tento polyfenolický amorfní heterogenní biopolymer je tvořený třemi základními monomery, kterými jsou sinapylalkohol, p-kumarylalkohol a koniferylalkohol. U ligninu je složité určit jeho přesnou molekulovou hmotnost a chemickou strukturu z důvodu značné složitosti molekuly. Jeho biodegradace je důležitým krokem v koloběhu uhlíku v přírodě.

Hlavními lignolytickými enzymy degradující dřevní hmotu jsou lakáza a peroxidázy. Fenoloxidáza lakáza, Mn-dependentní peroxidáza a ligninperoxidáza jsou oxidativní a většinou extracelulárně produkované enzymy. Vzhledem k nepravidelné struktuře molekuly ligninu je jejich substrátová specifita velmi nízká, což těmto enzymům zajišťuje široký biodegradační potenciál. Lakáza, mangan-dependentní peroxidáza a ligninperoxidáza jsou neprostudovanější lignolytické enzymy hub bílé hniloby. 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 a pravděpodobně i chitin a škrob. Jejich lignolytický systém je důležitý v transformaci huminových látek, včetně tvorby

humusu a mineralizaci. Lignolytické systémy se skládají z oxidáz, peroxidáz a peroxidu vodíku, který enzymy produkuje. Lignolytická oxidáza, lakáza, oxiduje své substráty pomocí molekulárního kyslíku, zatímco peroxidázy potřebují zásobování extracelulárním peroxidem vodíku, který je tvořen oxidací různých extracelulárních metabolitů. Ligninperoxidáza a mangan peroxidáza byly objeveny v polovině roku 1980 a zařazeny do lignolytických enzymů díky jejich vysokému redukčnímu potenciálu. Ligninperoxidáza degraduje jednotky nefenolového ligninu, zatímco Mn peroxidáza vytváří Mn^{3+} skupiny, které se chovají jako difúzní okysličovadlo na fenolových i nefenolových jednotkách ligninu, prostřednictvím peroxidace lipidů.

3.4.3.1 Lakáza

Matoušková (2011) píše, že lakázu (Lac) produkuje mnoho hub bílé hniloby. Tato N-glykosylovaná fenoloxidáza patří do skupiny oxidáz, které obsahují ve své molekule čtyři atomy mědi (v oxidačním stavu 2+) rozmístěné mezi třemi různými vazebnými místy. Ionty mědi jsou důležitou složkou v katalýze enzymu. Oxidázy obsahující měď katalyzují čtyřelektronovou redukci kyslíku na vodu. Lakáze její charakteristickou modrou barvu dává jeden ze tří atomů mědi, které obsahuje. Pokud enzymy nemají atom mědi, který dává modrá zbarvení, jsou nazývány “žluté” nebo “bílé” lakázy. Avšak tyto enzymy nejsou často považovány za lakázy. Molekulová hmotnost tohoto velmi nespecifického enzymu se pohybuje v rozmezí 60 – 70 kDa. Lakáza oxiduje fenoly a polyfenoly, nefenolické organické substráty a aromatické aminy. Při oxidaci těchto sloučenin vznikají reaktivní radikály podléhající dalším již neenzymatickým reakcím. Baldrián (2008) uvádí, že lakáza je známa již mnoho let v rostlinách, houbách, hmyzu a nedávno byla nalezena v bakteriích. I když vykazuje nízký redukční potenciál, může oxidovat širokou škálu substrátů. Lakázy jsou bílkoviny s molární hmotností 50 – 70 kDa a kyselým pH (3 – 6). Jsou produkovány bílou hnilobou hub *Basidiomycetes* (stopkovýtrusné) a řadou *Ascomycetes* (vřeckovýtrusné).

Lakáza se u hub podílí, kromě degradace ligninu, také na sporulaci, detoxikaci a tvorbě buněčného pigmentu. Lac je také produkována houbami ve formě různých izoenzymů. Tyto intracelulární i extracelulární enzymy jsou vylučovány do kultivačního media (Matoušková, 2011). Baldrián (2006) doplňuje, že se lakáza typicky nachází v rostlinách a houbách. V rostlinách se podílí na radikálních

mechanismech založených na formaci ligninových polymerů, zatímco v houbách má více rolí včetně morfogeneze a plísňové interakce patogen vs. host, obrany před stresem a ligninové degradace.

3.4.3.2 Mangan- dependentní peroxidáza

Mn-dependentní peroxidáza (MnP) katalyzuje H_2O_2 . Je to extracelulární hemová peroxidáza, která zajišťuje dependentní oxidaci Mn^{2+} na vysoce reaktivní Mn^{3+} . Tento vysoce reaktivní kationt vyžaduje stabilizaci chelatory produkovanými houbami (karboxylové kyseliny – šťavelová, malonová, mléčná). Stabilní kationt Mn^{3+} oxiduje fenolické části ligninu. Při této oxidaci vznikají volné radikály. Molekulová hmotnost izoenzymů MnP se pohybuje v rozmezí 45 – 55 kDa. Tyto izoenzymy se odlišují především izoelektrickými body, které se nachází v kyselém pH 3 – 4 (Matoušková, 2011).

Baldrián (2008) uvádí, že mangan peroxidázy jsou větší bílkoviny než ligninperoxidázy. Mají molární hmotnost 47 – 60 kDa a obvykle kyselé pH. Mn peroxidázy jsou schopny oxidovat fenolické substráty, nejčastěji ale oxidují Mn^{2+} na kationt Mn^{3+} , který je stabilizován organickými kyselinami, jako je oxalát, malát, laktát nebo manolát. Chelát Mn^{3+} je difúzní a může oxidovat širokou škálu substrátů, včetně fenolů, nefenolových aromatických skupin, karboxylových kyselin, thiolů a nenasycených mastných kyselin. Tato počáteční oxidace může vést až k rozkladu ligninu a mineralizaci.

3.4.3.3 Ligninperoxidáza

Matoušková (2011) uvádí, že glykoprotein ligninperoxidáza (LiP) je složený protein obsahující hem-prostetickou skupinu obsahující atom železa Fe^{2+} . Molekulová hmotnost enzymu LiP se pohybuje v rozmezí 40 – 45 kDa. Ligninperoxidáza katalyzuje v přítomnosti endogenně vytvářeného peroxidu vodíku oxidaci nefenolických aromatických struktur ligninu, při čemž vznikají arylkationtové radikály. Při katalytickém cyklu je ligninperoxidáza oxidována H_2O_2 , kdy dochází k odejmutí dvou elektronů z molekuly LiP za vzniku meziprojektu (sloučenina I.). Tento meziprojekt dále oxiduje substrát odstraněním jednoho elektronu a vzniká redukovanější enzymový meziprojekt (sloučenina II.). Sloučenina II. dále oxiduje další molekulu substrátu odebráním jednoho elektronu a tím se enzym vrací do

původního stavu. Podle Baldriána (2008) mají ligninperoxidázy molární hmotnost přibližně 40 kDa a velmi nízké pH (2,5 – 3). Jsou vyráběny menším počtem hub bílé hniloby než Mn-peroxidáza a lakáza. Houby, které LiP vyrábějí, jsou *Trametes* spp. (outkovka), *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia* spp. (žilnatka) a *Bjerkandera* spp. (šedopórka).

Při nízké koncentraci substrátu a nadbytku peroxidu vodíku se může sloučenina II. přeměnit na neaktivní formu enzymu (sloučenina III.). Této inaktivaci enzymu mohou zabránit aromatické látky (např. veratrylalkohol a tryptofan) a umožnit tím dokončení katalytického cyklu LiP (Matoušková, 2011).

Univerzální peroxidáza (VP = versatile peroxidase) byla nalezena v *Pleurotus* spp. a dalších stopkovýtrusných houbách. Byla popsána jako třetí typ lignolytických peroxidáz, která kombinuje vlastnosti LiP, MnP a mikrobiální peroxidázy oxidačních fenolických sloučenin. Tento enzym je schopen katalyzovat několik reakcí, ale vykazuje neobvykle vysoké pH, kolem 7 (Baldrián, 2008).

Podle Baldriána (2008) lze houby bílé hniloby rozdělit do čtyř skupin na základě produkce lignolytických enzymů:

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

Trametes versicolor je houba bílé hniloby produkující peroxidázy i lakázu. *Pleurotus ostreatus* je také houba bílé hniloby, která produkuje zvláštní typ peroxidázy (universální peroxidáza). Dalšími houbami, které produkují peroxidázy, jsou například *Daedalea flavida*, *Phlebia fascicularia*, *P. floridensi* a *P. radiata*. Houby, které produkují lakázu jsou například *Agaricus bisporus*, *Botrytis cinerea*, *Phlebia radiata* a *Coprinus cinereus*.

Houby bílé hniloby mohou rozkládat nebezpečné aromatické nitrosloučeniny a degradovat polychlorované bifenyly. Lignolytické enzymy se podílejí na degradaci a mineralizaci polycyklických aromatických uhlovodíků a degradaci syntetických barviv. Lakáza má své využití v potravinářském průmyslu, v nápojovém průmyslu při stanovení kyseliny askorbové a také při pečení jako biosenzor.

Lakáza bývá aplikována pro zvýraznění nebo modifikaci barvy v potravinách a nápojích. Při tomto procesu se vyloučí nevhodné fenoly, které způsobují hnědnutí a zakalení v ovocném džusu, víně či pivě (Matoušková, 2011).

Pozn.: kDa = kiloDalton – Dalton je jednotka používaná v chemii a biochemii pro molární (molekulovou) hmotnost.

3.5 PEROXID VODÍKU V PĚSTOVÁNÍ HUB

Wayne (2001) popisuje peroxid vodíku jako reaktivní formu kyslíku, která napadá různé organické sloučeniny. V živých buňkách poškozují genetický materiál, buněčné membrány apod. V dostatečné koncentraci může zabíjet bakterie, bakteriální endospory, kvasinky a spory plísní včetně výtrusů hub. Peroxid působí do jisté míry proti všem vzdušným kontaminantům, které mohou houbové kultury napadnout, včetně samotných houbových spor. Naopak antibiotika působí pouze proti bakteriální kontaminaci a fungicidy pouze proti kvasinkám a plísním.

Peroxid však nezabíjí mycelium kulturních hub a nepůsobí ani v rozporu s jeho růstem a vývojem plodnic. I když působí proti kontaminantům, tak v širokém rozmezí koncentrací umožní růst mycelia a tvorbu plodnic kulturních hub. Přidáním peroxidu vodíku do substrátů se umožní provést všechny fáze pěstování hub s úspěchem v nesterilním a nefiltrovaném prostředí. Není třeba drahé vybavení, jako jsou sterilní prostory, filtry pro filtrování ovzduší, UV lampy, rukávové boxy a další speciální zařízení. Díky peroxidu je pěstování vhodné i v domácích podmínkách, protože jsou potřeba pouze pomůcky, které se vyskytují v mnoha kuchyních. Úspěch je zaručen jen s mírně sterilním prostředím a dodržením minimální pozornosti na osobní hygienu.

Mnoho kontaminantů je proti peroxidu odolných. Peroxid neumí odstranit mnohobuněčné živé organismy (například plíseň rodu *Aspergillus*), ale dokáže je alespoň zpomalit. Vícebuněčné organismy a vysoké koncentrace klíčících spor jsou schopny produkovat dostatek rozkládajících enzymů, a tím se bránit proti vysokým koncentracím vnějšího peroxidu. Proto je důležité dbát na čistotu pomůcek a prostor při pěstování hub. Je důležité, že peroxid chrání před aerobními kontaminanty pouze kultivační médium nebo substrát, takže všechny aerobní kontaminanty spojené s myceliem budou před účinky peroxidu chráněny.

Z tohoto důvodu je také třeba dbát na čistotu a nepoužívat k očkování kontaminovanou sadbu.

Poslušná (2012) použila peroxid vodíku jako sterilizační přípravek u hub *Hypsizygus tessulatus* a *Pleurotus ostreatus*. K chemickému ošetření substrátů použila 1%, 2% a 3% roztoky peroxidu. Prostřednictvím svých pokusů zjistila, že čím vyšší je koncentrace peroxidu vodíku, tím se snižují přírůstky mycelia obou hub a zvyšuje se riziko kontaminace i rychlost jejího šíření. Poslušná (2012) tedy prokázala, že nejvhodnější variantou k ošetření substrátu pro tyto houby je ošetření horkou vodou, popřípadě nízkými koncentracemi peroxidu vodíku, kdy mycelium prorůstá substrátem nejrychleji, a je nejmenší riziko kontaminace jinou houbou.

4 Metodika

4.1 RŮSTOVÉ ZKOUŠKY MYCELIA *TRAMETES VERSICOLOR* PŘI OŠETŘENÍ SUBSTRÁTU RŮZNOU KONCENTRACÍ PEROXIDU VODÍKU

4.1.1 Harmonogram pokusů

Pokus č. 1: příprava: 18. 4. 2011
založení: 19. 4. 2011
ukončení: 17. 5. 2011

Pokus č. 2 : příprava: 4. 8. 2011
založení: 5. 8. 2011
ukončení: 1. 9. 2011

Pokus č. 3 : příprava: 13. 9. 2011
založení: 14. 9. 2011
ukončení: 31. 10. 2011

Pokus č. 4 : příprava: 3. 10. 2011
založení: 4. 10. 2011
ukončení: 31. 10. 2011
stanovení enzymatických aktivit: 23. 11. 2011
30. 11. 2011

Pokus č. 5 : příprava: 16. 1. 2012

založení: 17. 1. 2012 a 19. 1. 2012

ukončení: blok č. 1 – 1. 2. 2012 (promícháno 4. den)

blok č. 2 a 3 – 8. 2. 2012 (na povrch oba)

blok č. 4 – kontaminace 30. 1. 2012 (promícháno 2. den)

ukončení fruktifikace: 5. 4. 2012

Pokus č. 6 : příprava: 11. 6. 2012

založení: 12. 6. 2012

ukončení: 11. 7. 2012

stanovení enzymatických aktivit: 7. 8. 2012

Materiál

K založení pokusu bylo použito sadby hub připravené na pšeničných zrnech, pelet z pšeničné slámy, peroxidu vodíku (30 %), vody, sklenic Omnia, alobalové folie a popřípadě gumiček na upevnění. K samotné přípravě substrátu byly potřeba kbelíky, potravinářská folie na přikrytí, gumové rukavice či nějaká pomůcka na promíchání, vařič nebo konvice na přípravu vroucí vody. Pro očkování sadby byl mimo jiné třeba flowbox (zajištění sterilního prostředí), sterilní lžíce a nůž na nabírání sadby, gumové rukavice a technický líh pro sterilizaci pomůcek, a také klimatizační box BINDER KBW 400.

Příprava substrátu

Vlhkost substrátu měla být 68 %. Pro naplnění 8 sklenic od každé varianty bylo třeba přibližně 6 000 g substrátu. Na toto množství substrátu o vlhkosti 68 % bylo potřeba 1 920 g zcela suchých pelet a 4 080 g vody. Pelety z pšeničné slámy měly vlhkost 5,5 % (zjištěno experimentálně), tedy obsahovaly 112 ml vody. Těchto pelet bylo tedy na 6000 g substrátu o vlhkosti 68 % potřeba 2031,75 g. Na doplnění do chtěné hmotnosti a vlhkosti bylo třeba 3968 ml roztoku.

Pro variantu se studenou vodou se množství pelet (2031,75 g) smíchalo s 3968 ml studené vody a pro variantu s horkou vodou se stejné množství vody přivedlo k varu a smíchalo s dalšími 2031,75 g pelet. Roztoky s různými

koncentracemi peroxidu byly připraveny dle tabulky „Příprava ředěného roztoku“ a jednotlivé roztoky byly smíchány opět s 2031,75 g pšeničných pelet.

Příprava ředěného roztoku			
% roztok	1	3	4
Peroxid 30 % v ml	132	397	529
voda v ml	3836	3571	3439
roztoku celkem ml	3968	3968	3968

Pozn.: pro zjednodušení byla hustota vody a hustota peroxidu považována za totožnou (1g=1ml)

Postup založení pokusu

Řádně omyté sklenice byly vytřeny zevnitř a v oblasti hrdla technickým lihem. Pro přípravu substrátu byly lihem vydesinfikovány také kbelíky, ve kterých se substrát promíchával a nechával odležet.

Při přípravě substrátu ošetřeného studenou a horkou vodou byly pelety smíchány s daným množstvím vody a řádně promíchány. Stejný postup byl proveden u variant s předem připravenými roztoky peroxidu. Pro manipulaci se substrátem ošetřeným peroxidem byly použity gumové rukavice. Všechny řádně promíchané substráty byly přikryty potravinářskou folií a nechaly se odležet do druhého dne.

Druhý den byly jednotlivé substráty plněny do daného počtu sklenic. Plnění probíhalo ve flowboxu, aby se zajistilo sterilní prostředí. Substrát byl do sklenic plněn tak, aby jeho celá vrstva byla stejnoměrně utužena a netvořily se vzduchové bubliny. Po naplnění sklenic se ve flowboxu na povrch substrátu ve sklenici nasypala sadba s danou houbou a zakryla se lihem očištěnou alobalovou folií. Alobalovou folii lze upevnit gumičkou, aby nedošlo k nechtěnému odkrytí sadby. Varianty je nejlépe očkovat postupně a dbát na řádné označení sklenic. Všechny naplněné sklenice byly uloženy na temné místo s teplotou cca 25 °C.

Měření přírůstků se provádělo v pravidelných intervalech, ideálně každý sedmý den. Každá sklenice se vertikálně rozdělila pomocí lihového fixu na přibližně stejné 4 části. Při každém měření přírůstků se na každou část zapsaly různé barevnými fixy (stejný den měření = stejná barva fixu) hranice prorostlého mycelia a neprorostlého substrátu. Po skončení prorůstání se tyto jednotlivé hranice změřily

od povrchu až k poslední, zprůměrovaly se a vyvodily se z nich výsledky pokusu. Prorůstání bylo ukončeno v době, kdy prorostla první sklenice až ke dnu.

Po naplnění sklenic bylo odebráno ze zbylého substrátu od jednotlivých variant 50 g, smíchalo se se 100 ml destilované vody a po vyluhování se zjistilo pH materiálu v čerstvé hmotnosti. Tento stejný postup byl zopakován u prorostlého substrátu po skončení prorůstání.

Po ukončení prorůstání se od každého substrátu, který je kolonizován jednotlivými houbami vybere jedna sklenice a z ní se odebere ze dvou různých míst cca 50 g prorostlého substrátu. Tento se nechá v sušárně sušit přibližně 1 den při teplotě 105 °C. Po usušení se materiál zváží a vypočítají se procenta sušiny v materiálu.

Po naplnění se také odebrala ze zbylého substrátu část, která se nechala v sušárně sušit přibližně 1 den při teplotě 105 °C. Po usušení bylo zváženo množství a vypočítány procenta sušiny v materiálu.

4.1.2 Pokus č. 1

Porovnání růstu mycelia *Pleurotus ostreatus* a *Trametes versicolor* na peletách ošetřených studenou, vřelou vodou a různou koncentrací H₂O₂

Tato tabulka znázorňuje počet potřebných sklenic pro jednotlivé varianty u obou použitých hub. Celkem bylo potřeba 30 sklenic typu Omnia.

Druh houby	studená voda	horká voda	1% peroxid	3%peroxid	4% peroxid
<i>P. ostreatus</i>	3	3	3	3	3
<i>T. versicolor</i>	3	3	3	3	3

Variant bylo celkem 5, po 6-ti sklenicích Omnia. Celkem bylo potřeba 10 158,75 g pelet z pšeničné slámy.

4.1.3 Pokus č. 2

Porovnání růstu mycelia *Pleurotus ostreatus* a *Trametes versicolor* na peletách ošetřených studenou, vřelou vodou a různou koncentrací H₂O₂

Tato tabulka znázorňuje počet potřebných sklenic pro jednotlivé varianty u obou použitých hub. Celkem bylo potřeba 40 sklenic typu Omnia.

Druh houby	studená voda	horká voda	1% peroxid	3%peroxid	4% peroxid
<i>P. ostreatus</i>	4	4	4	4	4
<i>T. versicolor</i>	4	4	4	4	4

Variant bylo celkem 5, po 8. sklenicích Omnia. Celkem bylo potřeba 10 158,75 g pelet z pšeničné slámy.

4.1.4 Pokus č. 3

Porovnání růstu mycelia *Trametes versicolor* na peletách ošetřených 3% a 4% roztokem H₂O₂ v teplotách 25 °C a 30 °C

Tato tabulka znázorňuje počet potřebných sklenic pro jednotlivé varianty u *Trametes versicolor*. Celkem bylo potřeba 16 sklenic typu Omnia.

<i>Trametes</i>	3%peroxid	4% peroxid
25°C	4	4
30°C	4	4

Varianty byly celkem 2, po 8. sklenicích Omnia. Celkem bylo potřeba 4 063,5 g pelet z pšeničné slámy.

Podle tabulky byla polovina naplněných sklenic s 3 % roztokem peroxidu a polovina sklenic se 4 % roztokem peroxidu uložena na temné místo s teplotou 25 °C, ostatní sklenice byly uloženy na temné místo s teplotou 30 °C. Sklenice prorůstaly v klimatizovaném boxu, který zajišťoval stálost teplot.

4.1.5 Pokus č. 4

Porovnání růstu mycelia *Pleurotus ostreatus* a *Trametes versicolor* na peletách ošetřených vřelou vodou a různou koncentrací H₂O₂

Tato tabulka znázorňuje počet potřebných sklenic pro jednotlivé varianty u obou použitých hub. Celkem bylo potřeba 24 sklenic typu Omnia.

Druh houby	horká voda	1% peroxid	3%peroxid	4% peroxid
<i>P. ostreatus</i>	3	3	3	3
<i>T. versicolor</i>	3	3	3	3

Varianty byly celkem 4, po 6-ti sklenicích Omnia. Celkem bylo potřeba 8 127 g pelet z pšeničné slámy.

Po vyhodnocení přírůstku bylo odebráno, ze stejných sklenic a stejných míst, jako u odběru pro sušinu, 5 g prorostlého substrátu pro stanovení aktivity lignolytických a celulólytických enzymů.

4.1.6 Pokus č. 5

Porovnání růstu mycelia *Trametes versicolor* na peletách ošetřených 3% koncentrací H₂O₂ v blocích 1,5 kg + fruktifikace

K založení pokusu byly potřeba kromě výše popsaného materiálu pevné pytle, vata na vytvoření zátky a gumička na upevnění.

Pro tento pokus bylo potřeba do každého pytle 500 g pelet, které se smíchaly s 1 000 ml 3 % roztoku. Roztok s koncentrací 3 % peroxidu byl připraven podle přepočtu v následující tabulce.

Příprava ředěného roztoku		
% roztok	3	3 v pytlích
Peroxid 30 % v ml	397	100
voda v ml	3571	900
roztoku celkem ml	3968	1000

Pozn.: pro zjednodušení byla hustota vody a hustota peroxidu považována za totožnou (1g=1ml)

Počty opakování u jednotlivých variant

Tato tabulka znázorňuje způsob naočkování sadby do jednotlivých pytlů u *Trametes versicolor*.

<i>Trametes</i>	na povrch	promíchat
druhý den	1	1
čtvrtý den	1	1

Řádně promíchaný substrát se nechal odležet do druhého a čtvrtého dne od přípravy. Druhý den se dva substráty naplní do pytlů (1 kbelík = 1 pytel) stejným způsobem jako v ostatních pokusech. Do jednoho pytle se nasypala sadba na povrch substrátu a v jednom pytli se promíchala se substrátem. Pytle se uzavřely sterilní zátkou z vaty. Oba naplněné pytle se uložily na temné místo s teplotou cca 25 °C. Čtvrtý den od přípravy substrátu se tento postup zopakoval u zbylých dvou kbelíků.

Po úplné kolonizaci myceliem byly pytle přemístěny na fruktifikaci do klimatizovaného boxu, kde byla teplota 22 °C. V boxu byly také zajištěny 6-ti hodinové intervaly světla a tmy. Pytle se nařízly, aby plodnice mohly prorůst ven. Světelné intervaly měly intenzitu cca 800 luxů (na bocích bloků byla intenzita menší, kolem 200 luxů).

4.1.7 Pokus č. 6

Porovnání růstu mycelia *Pleurotus ostreatus* a *Trametes versicolor* na peletách ošetřených sterilizací, destilovanou vodou a různou koncentrací H₂O₂

Materiál:

K založení pokusu byly potřeba kromě výše popsaného materiálu sterilované pelety z pšeničné slámy a destilovaná voda.

1. Ošetření pelet roztoky peroxidu vodíku

Tato tabulka znázorňuje počet potřebných sklenic pro jednotlivé varianty u obou použitých hub. Celkem bylo potřeba 18 sklenic typu Omnia.

Druh houby	1% peroxid	3%peroxid	4% peroxid
<i>P. ostreatus</i>	3	3	3
<i>T. versicolor</i>	3	3	3

Varianty byly celkem 3, po 6-ti sklenicích Omnia. Celkem bylo potřeba 6 095,25 g pelet z pšeničné slámy.

2. Ošetření vysterilizovaných pelet

V sušárně při teplotě 121 °C po dobu 3. hodin bylo sterilováno 6 000 g pelet z pšeničné slámy. Potřebné množství pelet a roztoků pro přípravu substrátů bylo přepočítáno. Vlhkost substrátu měla být 68 %. Na jednu variantu se sterilními peletami bylo použito 1 500 g pelet (celkem 4 varianty po 1 500 g sterilizovaných pelet). Pro namíchání substrátu o vlhkosti 68 % při použití 1 500 g zcela suchých vysterilizovaných pelet bylo potřeba 3 187,5 g vody (přepočteno podle výše popsané části „Příprava substrátu“).

Pro variantu s vodou se množství sterilních pelet (1 500 g) smíchalo s 3 187,5 ml destilované vody. Roztoky s různými koncentracemi peroxidu byly připraveny podle přepočtu v následující tabulce.

Příprava ředěného roztoku			
% roztok	1	3	4
Peroxid 30 % v ml	106	319	425
voda v ml	3081,5	2868,5	2762,5
roztoku celkem ml	3187,5	3187,5	3187,5

Pozn.: pro zjednodušení byla hustota vody a hustota peroxidu považována za totožnou (1g=1ml)

Tato tabulka znázorňuje počet potřebných sklenic pro jednotlivé varianty u obou použitých hub. Celkem bylo potřeba 24 sklenic typu Omnia.

Druh houby	destilovaná voda	1% peroxid	3% peroxid	4% peroxid
<i>P. ostreatus</i>	3	3	3	3
<i>T. versicolor</i>	3	3	3	3

Varianty byly celkem 4, po 6-ti sklenicích Omnia. Celkem bylo potřeba 8 127 g pelet z pšeničné slámy.

Po vyhodnocení přírůstku bylo odebráno, ze stejných sklenic a stejných míst, jako u odběru pro sušinu, 5 g prorostlého substrátu pro stanovení aktivity lignolytických a celulólytických enzymů.

4.2 STANOVENÍ AKTIVITY CELULOLYTICKÝCH A LIGNOLITICKÝCH ENZYMŮ V PROROSTLÉM SUBSTRÁTU

4.2.1 Měření aktivity celulólytických a lignolytických enzymů

Byla měřena aktivita celulólytických enzymů v substrátu prorostlém myceliem *Pleurotus ostreatus* a *Trametes versicolor* po různém způsobu ošetření substrátu. Postup měření aktivity enzymů byl proveden podle Baldriána (2009).

Použité chemikálie

- ABTS (2,2 azinobis – 3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)
- Azo-CM-celulosa (Azo-karboxymethyl-celulosa)
- Azo-xylan
- Dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného
- Dihydrát síranu manganatého
- Dihydrogenfosforečnan draselný
- DMAB (3-dimethylaminobenzoová kyselina)
- EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina)
- Ethanol
- Kyselina citronová
- Kyselina jantarová
- Kyselina mléčná
- Kyselina octová
- MBTH (3-methyl-2-benzothiazolinon-hydrazon-hydrochlorid)
- Octan sodný

- Peroxid vodíku
- p-nitrofenol-cellobiosid
- p-nitrofenol-glukopyranosid
- p-nitrofenol-N-acetylglukosamin
- p-nitrofenol-xylopyranosid
- Uhličitan vápenatý

Přístrojové vybavení

- ELISA Spektrofotometr TECAN – měření absorbance v mikrotitračních destičkách
- Spekol – měření absorbance v kyvetě (1 cm)
- Vortex
- Termoblok
- Analytické váhy

Postup

Bylo odebráno 5 g prorostlého substrátu, k němu přidáno 50 ml octanového pufru (160 mM; 8,9 g octanu sodného, 3 g kyseliny octové, 1 000 ml destilované vody, pH 5) a toto třepáno 2 hodiny při laboratorní teplotě. Z každého vzorku se odebralo filtrací 5 ml potřebných k měření aktivity celulolytických a lignolytických enzymů.

Lakáza

- Použitý pufr: Citát-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 μ l vzorku, 150 μ l pufru a 50 μ l substrátu ve třech opakováních pro každý vzorek
- měření při 420 nm na spektrofotometru TECAN, měření každých 30 s po dobu 3 minut
- enzymová aktivita počítána z rozdílů absorbancí v lineární oblasti

Manganová peroxidáza

- 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
- 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 přídatkem 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 peroxidázy byla počítána z rozdílů absorbancí v lineární oblasti s odečtením aktivity oxidáz a peroxidáz bez manganu

Endoglukanasa (zkr. CEL)

- Chromogenní substrát: Azo-CM-celulosa
- Připravena směs obsahující 150 μ l vzorku a 150 μ l substrátu
- Inkubace 1 hodinu či půl hodiny při 40°C, zastavení reakce přidáním 750 μ l precipitantu (roztok obsahující ethanol), centrifugace (10 min, 10 000 rpm), měření množství uvolněného barviva z celulosy
- Měření při 595 nm na spektru proti blanku (voda + chromogenní substrát)
- Enzymová aktivita počítána ze změny absorbance oproti blanku za daný čas

Endoxylanasa (zkr. XYL)

- Chromogenní substrát: Azo-xylan
- Připravena směs obsahující 150 μ l vzorku a 150 μ l substrátu
- Inkubace 1 hodinu půl hodiny při 40°C, zastavení reakce přidáním 750 μ l precipitantu, centrifugace (10 min, 10 000 rpm), měření množství uvolněného barviva z xylanu
- Měření při 595 nm na spektru proti blanku (voda + chromogenní substrát)
- Enzymová aktivita počítána ze změny absorbance oproti blanku za daný čas

β -glukosidasa (pNPG)

- Chromogenní substrát: p-nitrofenol-glukopyranosid (1,2 mM v 50 mM octanovém pufru pH 5)
- Příprava 3 sad měření (celkem tedy 9 jamek pro jeden vzorek): 40 μ l vzorku a 160 μ l substrátu
- zastavení reakce po 5, 65 a 120 minutách pomocí uhličitanu vápenatého (změnou pH se projeví zbarvení)
- měření při 400 nm na spektrofotometru TECAN
- enzymová aktivita počítána z rozdílů absorbancí v lineární oblasti

Exoglukanasa (pNPC)

- Chromogenní substrát: p-nitrofenol-cellobiosid (1,2 mM v 50 mM octanovém pufru pH 5)
- Příprava 3 sad měření (celkem tedy 9 jamek pro jeden vzorek): 40 μ l vzorku a 160 μ l substrátu
- zastavení reakce po 5, 65 a 120 minutách pomocí uhličitanu vápenatého (změnou pH se projeví zbarvení)
- měření při 400 nm na spektrofotometru TECAN
- enzymová aktivita počítána z rozdílů absorbancí v lineární oblasti

Xylosidasa (pNPX)

- Chromogenní substrát: p-nitrofenol-xylopyranosid (1,2 mM v 50 mM octanovém pufru pH 5)
- Příprava 3 sad měření (celkem tedy 9 jamek pro jeden vzorek): 40 μ l vzorku a 160 μ l substrátu
- zastavení reakce po 5, 65 a 120 minutách pomocí uhličitanu vápenatého (změnou pH se projeví zbarvení)
- měření při 400 nm na spektrofotometru TECAN
- enzymová aktivita počítána z rozdílů absorbancí v lineární oblasti

Chitinasa (pNPN)

- Chromogenní substrát: p-nitrofenol-N-acetylglukosamin (1,2 mM v 50 mM octanovém pufru pH 5)
- Příprava 3 sad měření (celkem tedy 9 jamek pro jeden vzorek): 40 μ l vzorku a 160 μ l substrátu
- zastavení reakce po 5, 65 a 120 minutách pomocí uhličitanu vápenatého (změnou pH se projeví zbarvení)
- měření při 400 nm na spektrofotometru TECAN
- enzymová aktivita počítána z rozdílů absorbancí v lineární oblasti

5 Výsledky

Kapitola výsledky zahrnuje podkapitolu „Růstové zkoušky mycelia“, kde jsou výsledky znázorněny tabulkami a grafy a jejich popisem. V tabulkách jsou zapsány naměřené hodnoty pH a procentuální obsah sušiny v jednotlivých substrátech. V grafech jsou znázorněny výsledky růstových zkoušek mycelia *Trametes versicolor* a *Pleurotus ostreatus*. Všechny údaje v grafech jsou průměry přírůstků naměřené při vyhodnocování na konci prorůstání mycelia. Konec prorůstání nastal tehdy, když mycelium dorostlo ke dnu u první sklenice. Pokus byl tedy ukončen, i když bylo u dna prorostlé mycelium jen u jedné sklenice ze všech. Tabulky s jednotlivými přírůstky u všech variant a všech sklenic viz Příloha č. 2 – 6.

Druhou podkapitolou je „Statistické vyhodnocení“, kde je graficky znázorněna vyrovnanost růstu mycelia obou hub ve všech provedených pokusech. Rozptyl je znázorněn pomocí chybových (rozptylových) úseček. Grafy byly vytvořeny v programu Statistika.

Třetí podkapitolou je „Stanovení aktivity celulolytických a lignolytických enzymů“, kde je znázorněna pomocí grafů aktivita lignolytických a celulolytických enzymů, především pak lakázy a mangan-dependentní peroxidázy.

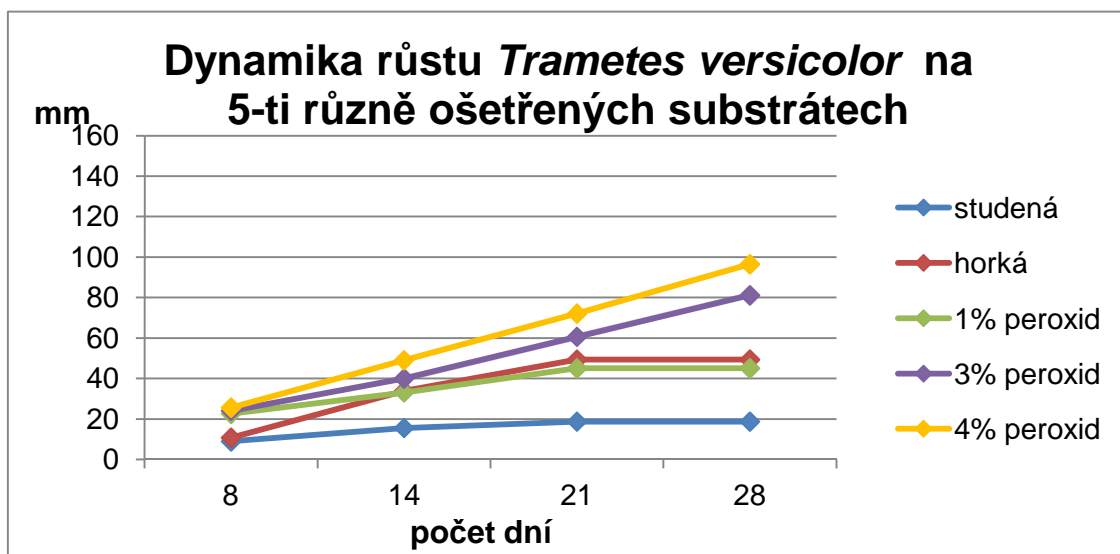
5.1 RŮSTOVÉ ZKOUŠKY MYCELIA

5.1.1 Pokus č. 1

Porovnání růstu mycelia *Pleurotus ostreatus* a *Trametes versicolor* na peletách ošetřených studenou, vřelou vodou a různou koncentrací peroxidu vodíku

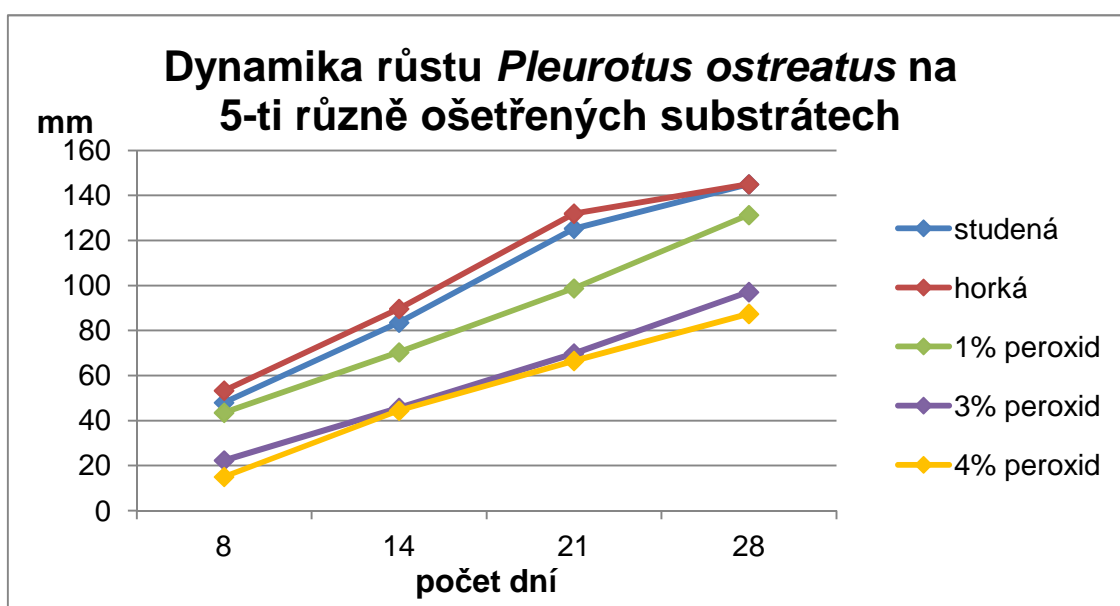
Graf č. 1 znázorňuje že, *Trametes versicolor* měla nejlepší růst na substrátu ošetřeném 4% roztokem peroxidu vodíku. Podobný, ale pomalejší růst mělo mycelium na substrátu s 3% roztokem peroxidu. Na substrátech ošetřených 1% roztokem peroxidu a horkou vodou prorůstalo mycelium velmi pomalu

a po 21. dnech svůj růst zastavilo. Na substrátu se studenou vodou nemělo podhoubí přirůstků téměř žádné a ve většině případů kontaminovalo zelenou plísní.



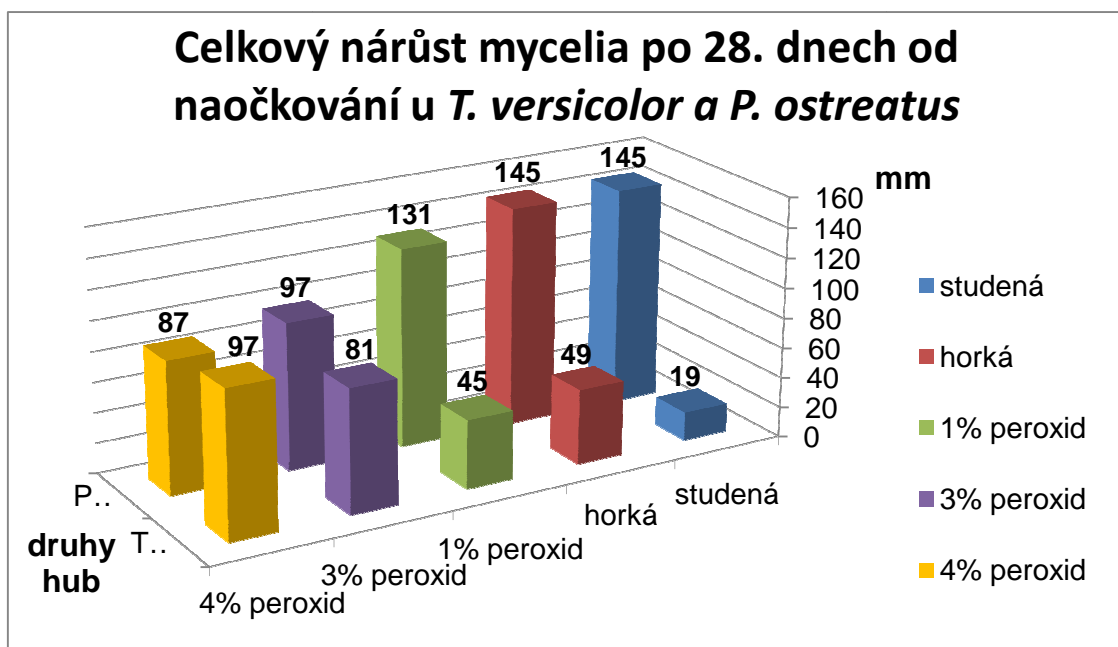
Graf č. 1: Vyjádření dynamiky růstu *Trametes versicolor* na 5-ti různě ošetřených substrátech.

Z grafu č. 2 je zřejmé že, podhoubí *Pleurotus ostreatus* vykazovalo nejlepší růst na substrátech ošetřených studenou a horkou vodou. Mycelium na těchto substrátech však po 21. dnech růst zpomalilo. Pomalejší, ale vyrovnané přirůstků mělo podhoubí hlívy na substrátu ošetřeném 1% roztokem peroxidu. Na substrátech ošetřených 3% a 4% roztokem H_2O_2 prorůstalo mycelium velmi pomalu a za období kolonizace prorostlo jen asi do 1/2 sklenice.



Graf č. 2: Vyjádření dynamiky růstu *Pleurotus ostreatus* na 5-ti různě ošetřených substrátech.

Graf č. 3 ukazuje že, rozdíly v aktivitě růstu mycelia outkovky a hlívy jsou znatelné. Z grafu lze odvodit, že *Trametes versicolor* lépe roste na substrátech ošetřených peroxidem vodíku. Naopak mycelium *Pleurotus ostreatus* lépe prorůstá na substrátech ošetřených studenou a horkou vodou a také s 1% roztokem peroxidu.



Graf č. 3: Vyjádření celkového nárůstu mycelia po 28. dnech od naočkování u *T. versicolor* a *P. ostreatus*.

5.1.2 Pokus č. 2

Porovnání růstu mycelia *Pleurotus ostreatus* a *Trametes versicolor* na peletách ošetřených studenou, vřelou vodou a různou koncentrací peroxidu vodíku

V tabulce č. 1 jsou naměřené hodnoty pH jednotlivých substrátů, ještě před očkovaním sadby a kolonizací mycelia. Hodnoty se pohybují v blízkosti neutrálního pH. V případě studené a horké vody jsou hodnoty pH 0,1 pod neutrální hodnotu z důvodu použití kohoutkové vody k ošetření substrátu. V ostatních případech peroxid substrát mírně okyseluje.

	studená voda	horká voda	1% peroxid	3% peroxid	4% peroxid
hodnota pH	6,9	6,9	6,7	6,5	6,5

Tabulka č. 1: pH substrátů nekolonizovaného mycelia

V tabulce č. 2 jsou zapsány naměřené hodnoty pH v kolonizovaném substrátu po ukončení prorůstání mycelia. Mycelium všechny substráty okyseluje. U substrátů se studenou a horkou vodou a všech peroxidem ošetřených substrátech kolonizovaných *Trametes versicolor* má pH stejnou hodnotu. U substrátů kolonizovaných *Pleurotus ostreatus* dosahuje pH vyšších hodnot. Hodnota pH u outkovky v 1% roztoku peroxidu chybí z důvodu kontaminace všech sklenic myceliem jiné houby.

hodnota pH	horká voda	1% peroxid	3% peroxid	4% peroxid
<i>Trametes</i>	5,1	---	5,1	5,2
<i>Pleurotus</i>	5,1	5,2	5,3	5,4

Tabulka č. 2: pH substrátů po kolonizaci myceliem *Trametes versicolor* a *Pleurotus ostreatus*.

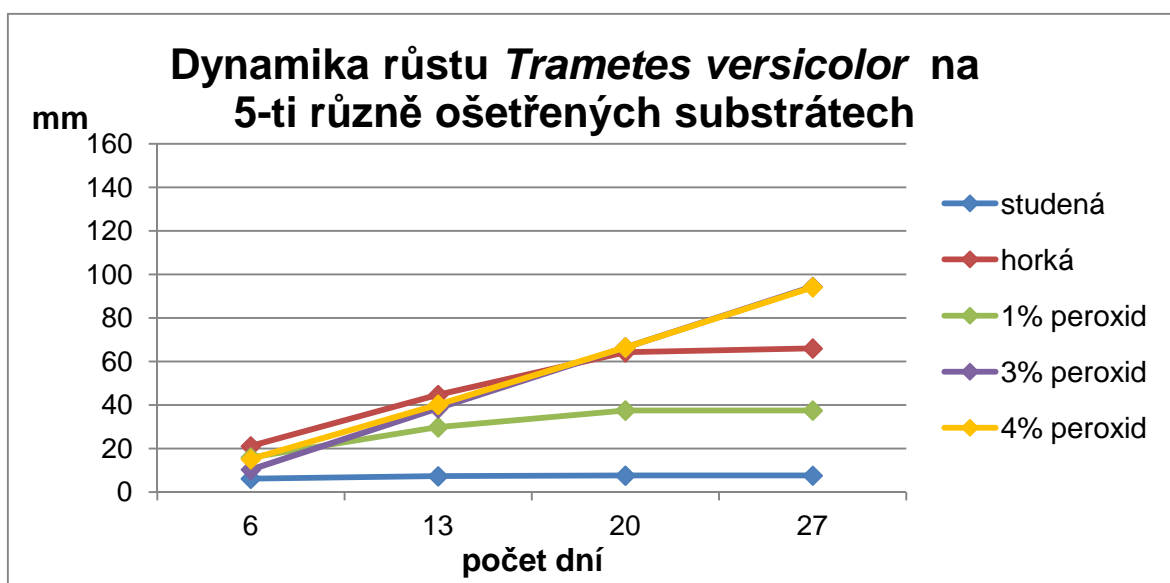
Tabulka č. 3 ukazuje množství sušiny, které obsahují jednotlivé substráty bez naočkování sadby a kolonizace myceliem. Ve všech substrátech je přibližně stejný obsah sušiny.

	studená voda	horká voda	1% peroxid	3% peroxid	4% peroxid
sušina %	30,395	31,645	31,076	31,276	31,157

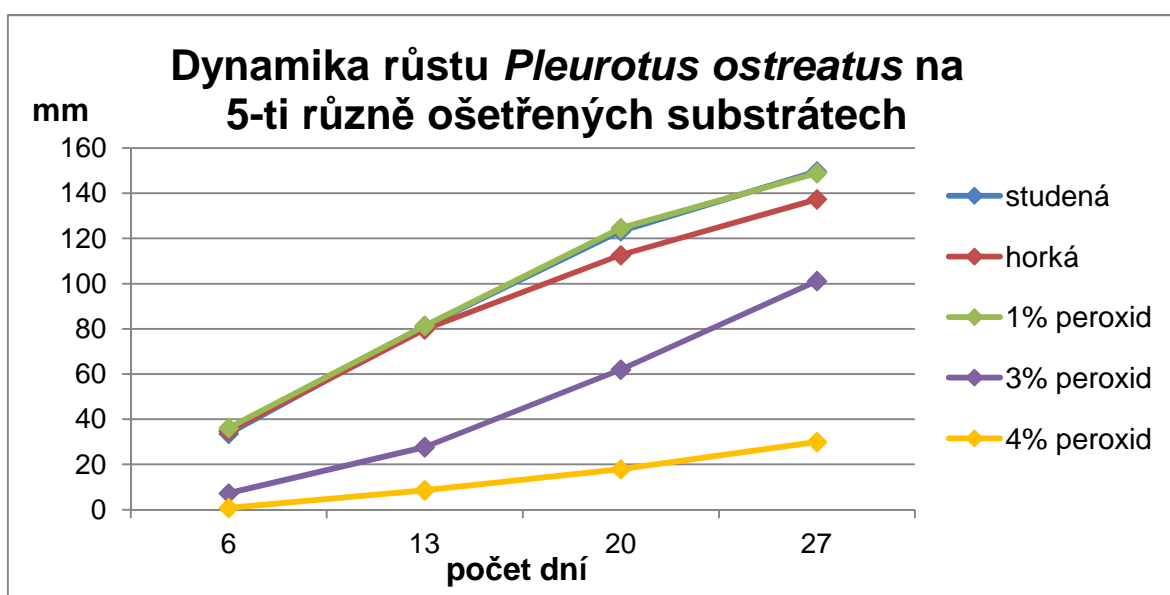
Tabulka č. 3: Sušina substrátů nekolonizovaného myceliem.

Z grafu č. 4 je zřejmé že, *Trametes versicolor* dosáhla nejlepšího růstu na substrátu ošetřeném 4% roztokem peroxidu. Ve druhé polovině prorůstání (po 13. dnech) se růst mycelia na substrátu se 3% roztokem peroxidu vyrovnal s předchozím a dosáhl stejných průměrných přírůstků. Mycelium na substrátu s 1% roztokem H₂O₂ prorůstalo ze začátku aktivně, ale po 13. dnech prorůstání svou

aktivitu růstu pomalu ztrácelo a na konci už nevykazovalo přírůstky žádné. Podobně to bylo i s myceliem na substrátu ošetřeném horkou vodou. Podhoubí outkovky na substrátu ošetřeném horkou vodou si udrželo aktivitu růstu delší dobu než na substrátu s 1% roztokem H_2O_2 , ale ke konci svůj růst také zpomalilo a vykazovalo nižší průměrné přírůstky. Na substrátu ošetřeném studenou vodou neprokazovalo mycelium svůj růst skoro vůbec. Substrát i sadba byly ve všech případech kolonizovány zelenou plísní, což je vyřadilo z dalšího hodnocení.



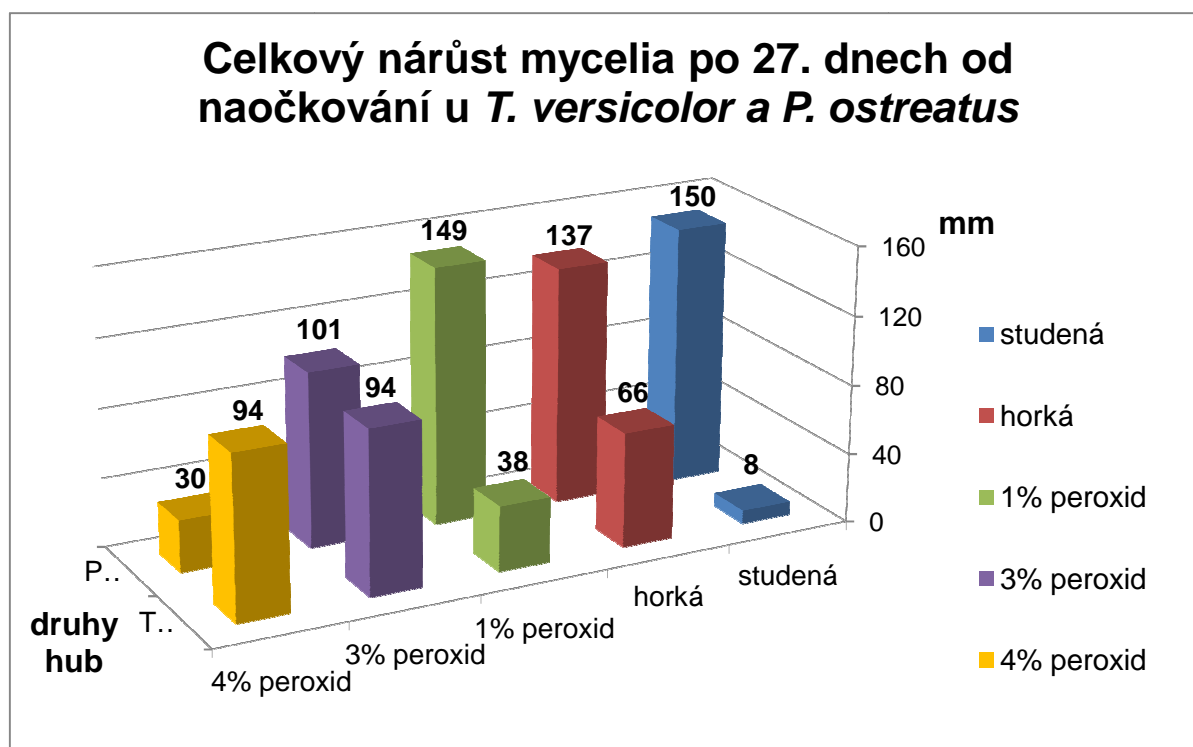
Graf č. 4: Vyjádření dynamiky růstu *Trametes versicolor* na 5-ti různě ošetřených substrátech.



Graf č. 5: Vyjádření dynamiky růstu *Pleurotus ostreatus* na 5-ti různě ošetřených substrátech.

Graf č. 5 ukazuje, že mycelium *Pleurotus ostreatus* mělo opačné reakce na substráty než *Trametes versicolor*. Nejlepší růst vykazovalo na substrátech ošetřených studenou vodou a 1% roztokem peroxidu. V těchto případech byly v podstatě stejné průměrné přírůstky. Na začátku prorůstání mělo podobné výsledky i mycelium na substrátu s horkou vodou. To, ale v polovině (po 13. dnech) snížilo aktivitu růstu a prokázalo se nižšími přírůstky. Na substrátech ošetřených 3% a 4% roztokem H₂O₂ prorůstalo mycelium hlívy velmi pomalu.

V grafu č. 6 jsou patrné rozdíly v aktivitě růstu *Trametes versicolor* a *Pleurotus ostreatus* na jednotlivých substrátech. Celkový nárůst je v grafu zaznamenán po 27. dnech od naočkování, což je na konci prorůstání, kdy mycelium dosáhlo dna u první sklenice. Z grafu lze odvodit, že ošetření substrátu vyšší koncentrací peroxidu snáší lépe *Trametes versicolor*, naopak po ošetření studenou nebo horkou vodou jsou přírůstky *Pleurotus ostreatus* vyšší.



Graf č. 6: Vyjádření celkového nárůstu mycelia po 27. dnech od naočkování u *T. versicolor* a *P. ostreatus*.

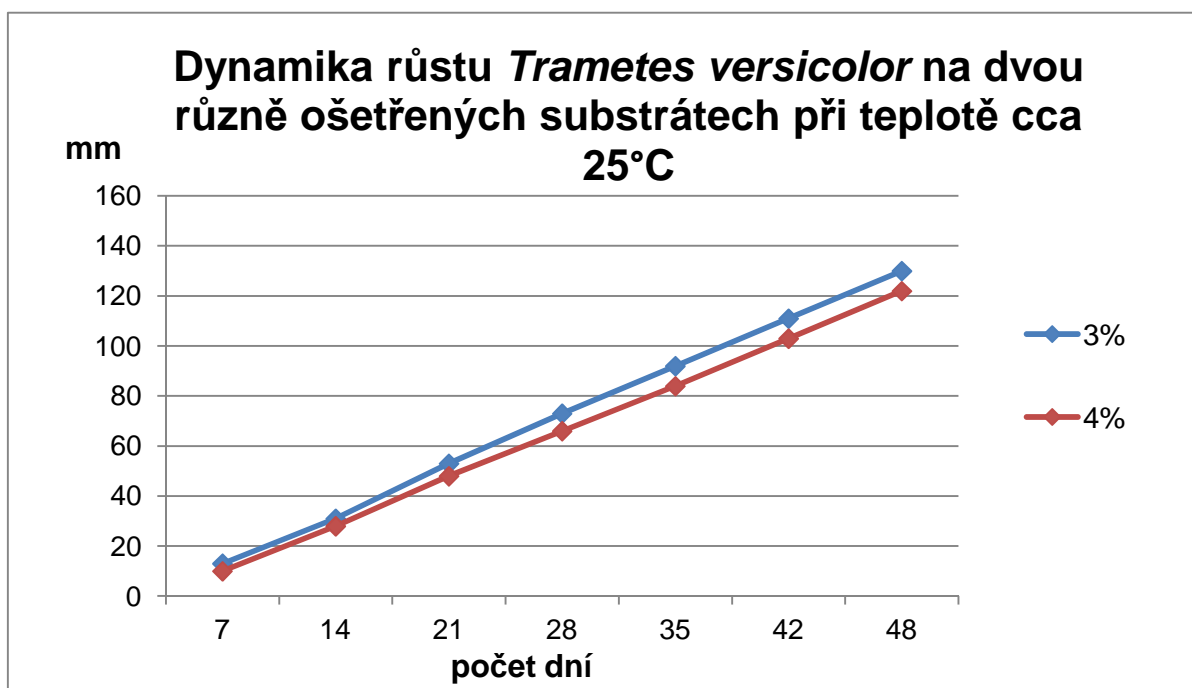
5.1.3 Pokus č. 3

Porovnání růstu mycelia *Trametes versicolor* na peletách ošetřených 3% a 4% roztokem H₂O₂ v teplotách 25 °C a 30 °C

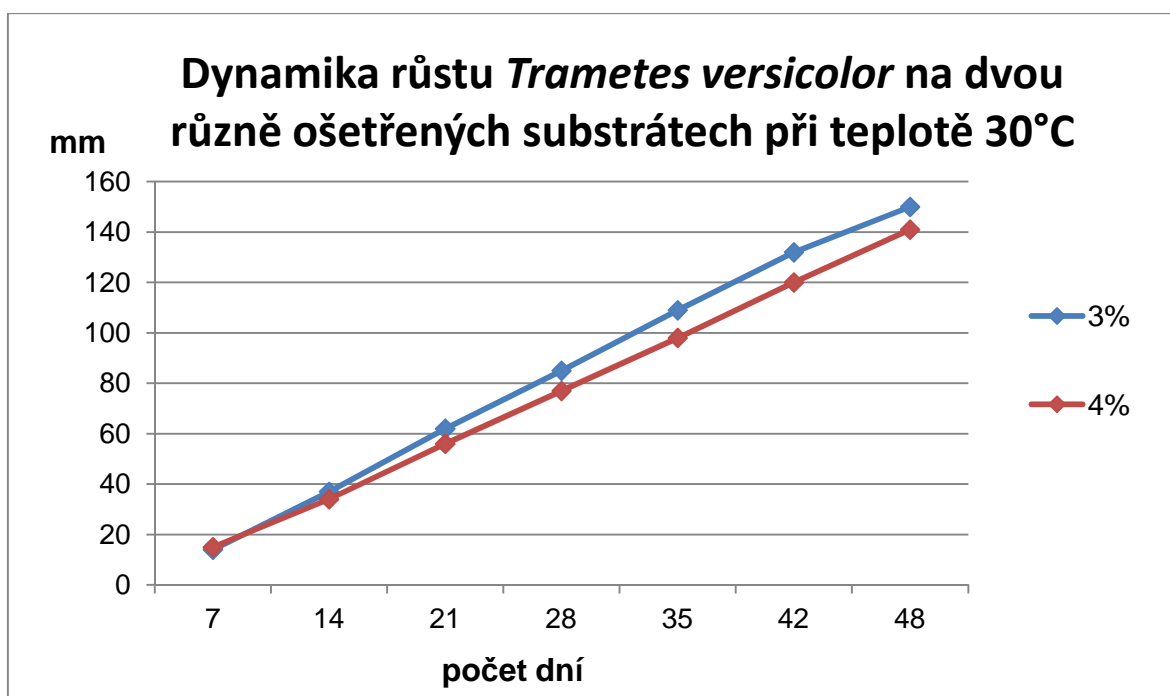
Grafy č. 7 až 10 ukazují průměrné týdenní přírůstky *Trametes versicolor* v substrátech ošetřených 3% a 4% roztokem peroxidu v teplotách 25 °C a 30 °C.

Podle grafů č. 7 a 8 je patrné, že mycelium dosáhlo v obou teplotách lepšího růstu na substrátu s 3% roztokem peroxidu. Z grafů je také patrné, že mycelium na obou substrátech prorůstalo pomaleji v teplotě 25 °C, kde za stejnou dobu jako při teplotě 30 °C nestačilo prorůst celou sklenici (celá sklenice cca 150 mm).

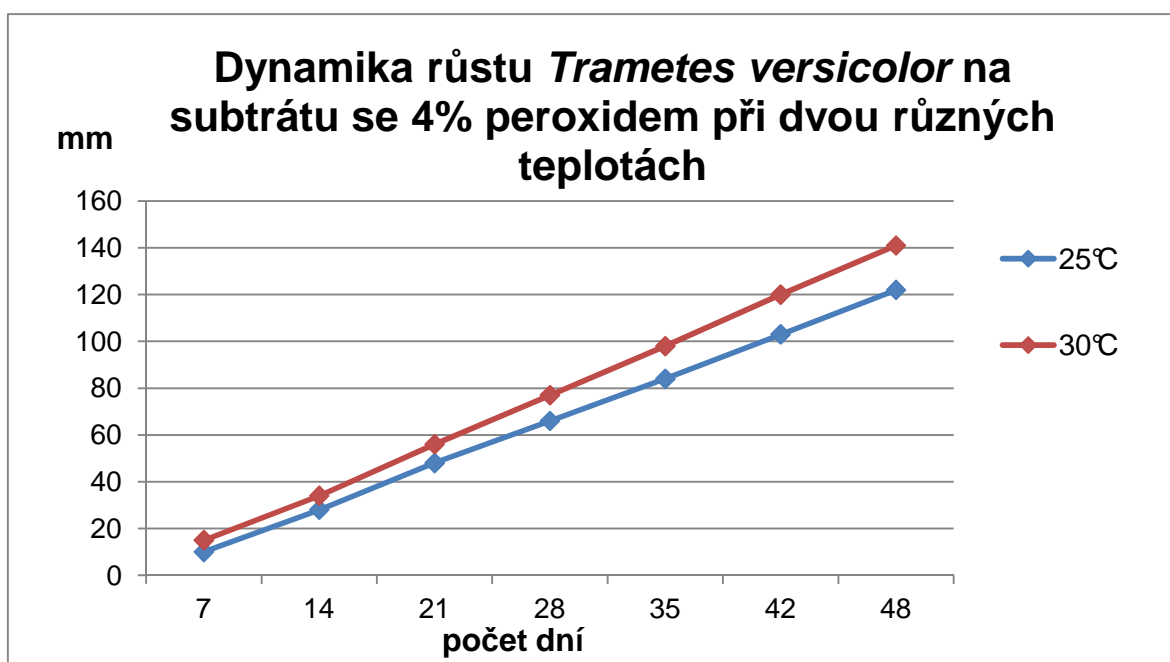
Podle grafů č. 9 a 10 lze usoudit, že mycelium oběma substráty prorůstalo rychleji v teplotě 30 °C. I z těchto grafů je patrné, že mycelium lépe prorůstalo substrátem ošetřeným 3% roztokem peroxidu, kde v teplotě 30 °C prorostlo celou sklenici až ke dnu.



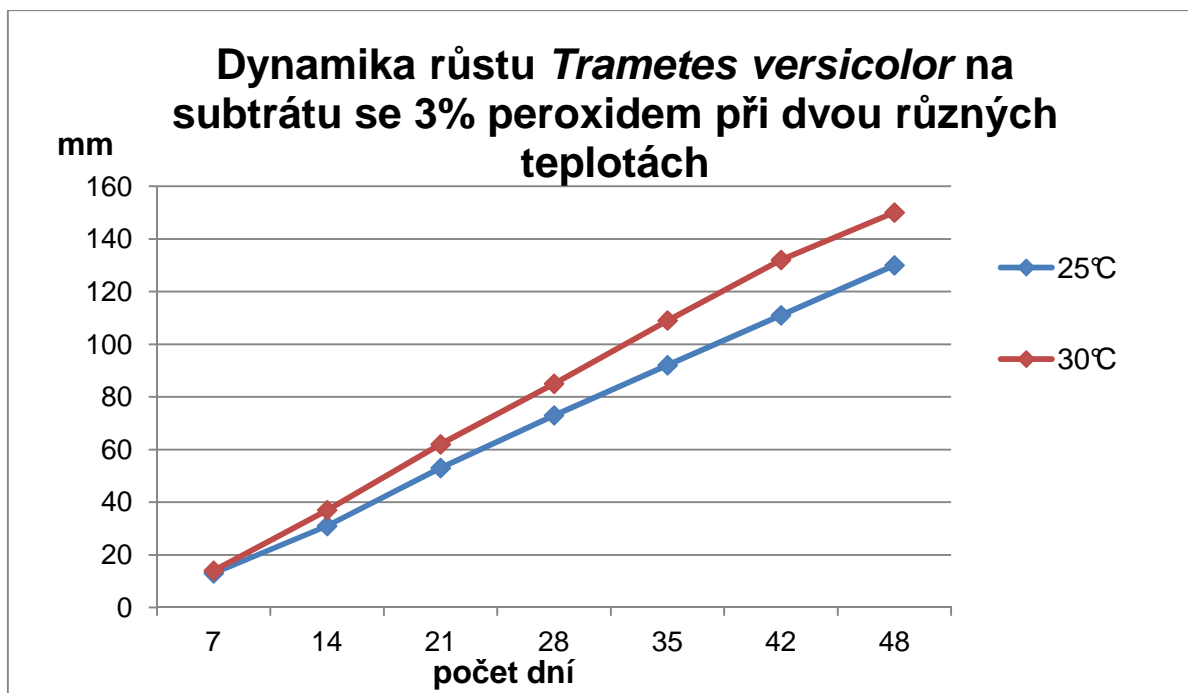
Graf č. 7: Vyjádření dynamiky růstu *Trametes versicolor* na dvou různě ošetřených substrátech při teplotě 25 °C.



Graf č. 8: Vyjádření dynamiky růstu *Trametes versicolor* na dvou různě ošetřených substrátech při teplotě 30 °C.

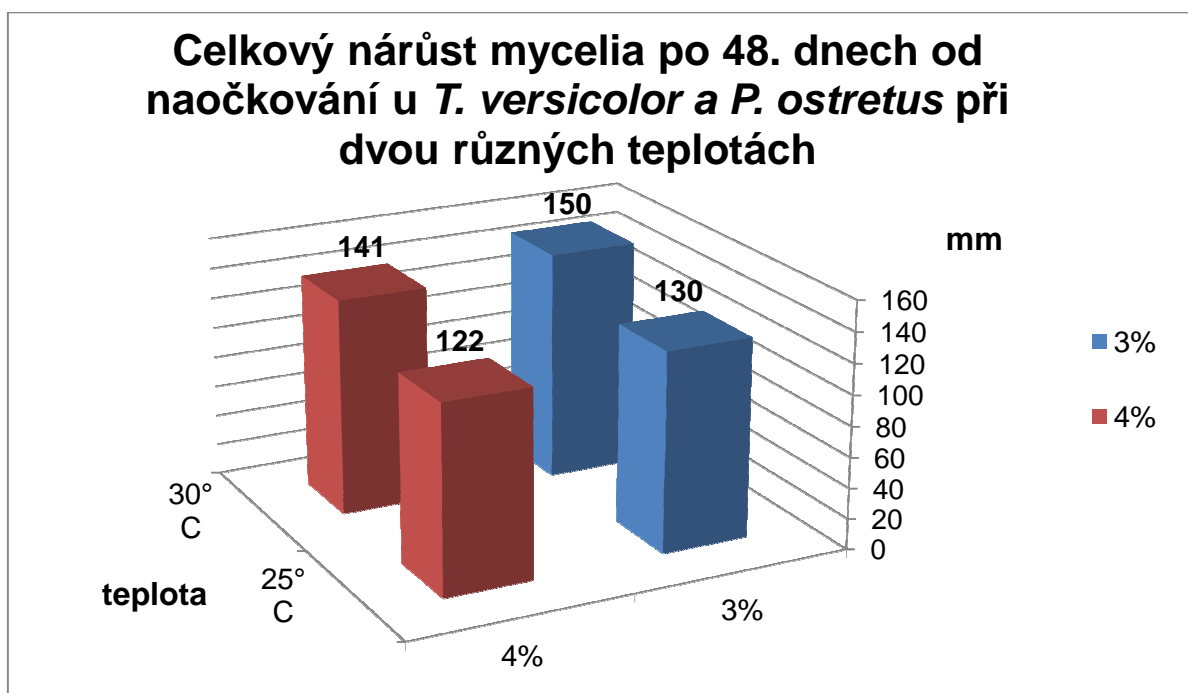


Graf č. 9: Vyjádření dynamiky růstu *Trametes versicolor* na substrátu ošetřeném 4% roztokem H_2O_2 při dvou různých teplotách.



Graf č. 10: Vyjádření dynamiky růstu *Trametes versicolor* na substrátu ošetřeném 3% roztokem H_2O_2 při dvou různých teplotách.

Graf č. 11 shrnuje předchozí grafy a ukazuje, že myceliu *Trametes versicolor* vyhovuje nejvíce pro kolonizaci substrát ošetřený 3% roztokem peroxidu a teplota 30 °C.



Graf č. 11: Vyjádření celkového nárůstu mycelia po 48. dnech od naočkování u *Trametes versicolor*.

5.1.4 Pokus č. 4

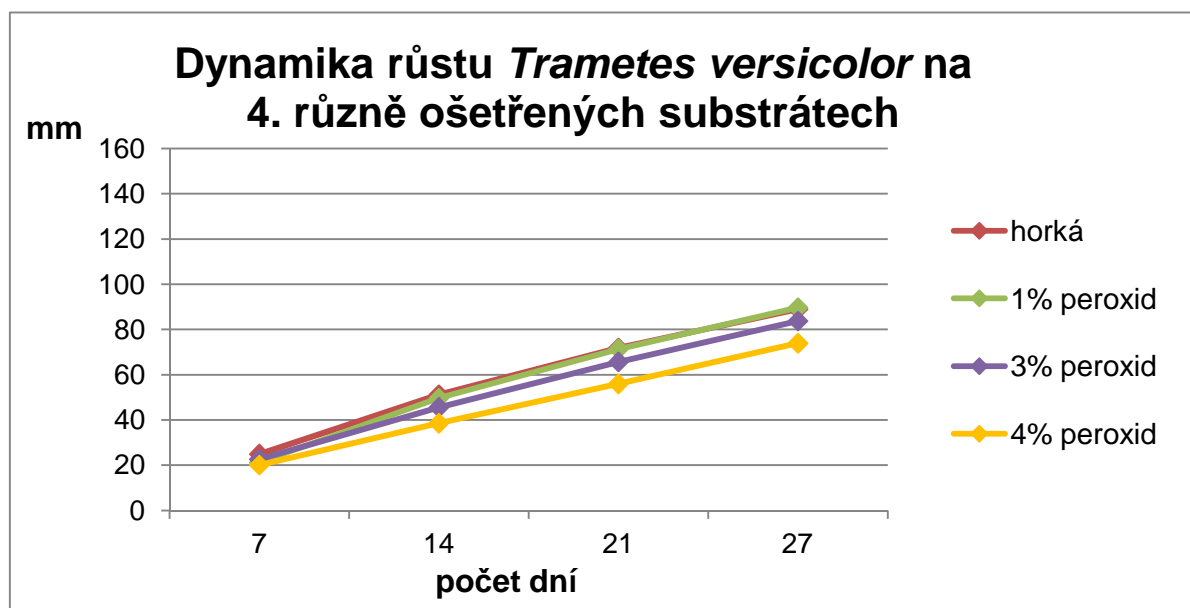
Porovnání růstu mycelia *Pleurotus ostreatus* a *Trametes versicolor* na peletách ošetřených vřelou vodou a různou koncentrací peroxidu vodíku

V tabulce č. 4 je zapsáno množství sušiny, které obsahují jednotlivé substráty po kolonizaci myceliem. Ve všech prorostlých substrátech je přibližně 1/4 sušiny. Ve sloupci „Houba“ jsou zapsány zkratky naočkovaných hub a ošetření substrátu (například: TH = *Trametes*, horká voda, P3 = *Pleurotus*, 3% peroxid, atd.). Ve sloupci „Místo“ jsou termíny, kdy bylo při prorůstání označeno místo, ze kterého byl později odebrán vzorek na měření sušiny. Pokus byl založen 4. 10., takže mycelium prorostlo k místu s označením 18. 10. po 14. dnech a k místu s označením 31. 10. prorostlo po 27. dnech od naočkování sadby do substrátu. Množství sušiny v kolonizovaných substrátech je nižší než množství zjištěné v substrátech bez kolonizace myceliem (viz tabulka č. 3). Tyto výsledky byly dále použity při stanovení aktivity celulolytických a lignolytických enzymů.

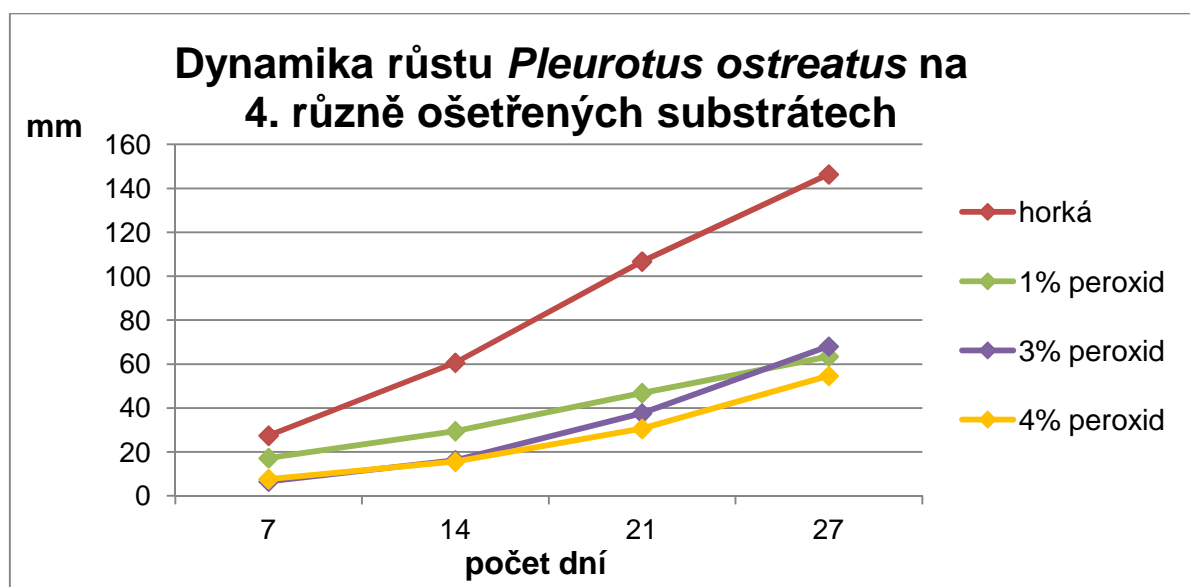
Číslo vzorku	Houba	Místo (den)	Sušina %
1	TH	18. 10. (14. den)	27,3143
2	T1	18. 10. (14. den)	24,0522
3	T3	18. 10. (14. den)	24,3876
4	T4	18. 10. (14. den)	22,7650
5	PH	18. 10. (14. den)	25,1945
6	P1	18. 10. (14. den)	24,1040
7	P3	18. 10. (14. den)	25,0055
8	P4	18. 10. (14. den)	24,5070
9	TH	31. 10. (27. den)	25,8743
10	T1	31. 10. (27. den)	24,0775
11	T3	31. 10. (27. den)	23,1480
12	T4	31. 10. (27. den)	28,0500
13	PH	31. 10. (27. den)	27,9810
14	P1	31. 10. (27. den)	27,8584
15	P3	31. 10. (27. den)	29,3141
16	P4	31. 10. (27. den)	28,5543

Tabulka č. 4: Sušina substrátů po kolonizaci myceliem *Trametes versicolor* a *Pleurotus ostreatus*.

Z grafu č. 12 je patrné, že mycelium *Trametes versicolor* prorůstalo při vhodných podmínkách všemi substráty relativně dobře. Kolonizace probíhala pomalu, ale plynule. Za období prorůstání, které ukončila rychlá kolonizace hlívy v substrátu s horkou vodou, stačilo mycelium outkovky v substrátu ošetřeném 4% peroxidem prorůst pouze do poloviny sklenice. V ostatních substrátech prorostlo mycelium přibližně do 2/3 sklenice.



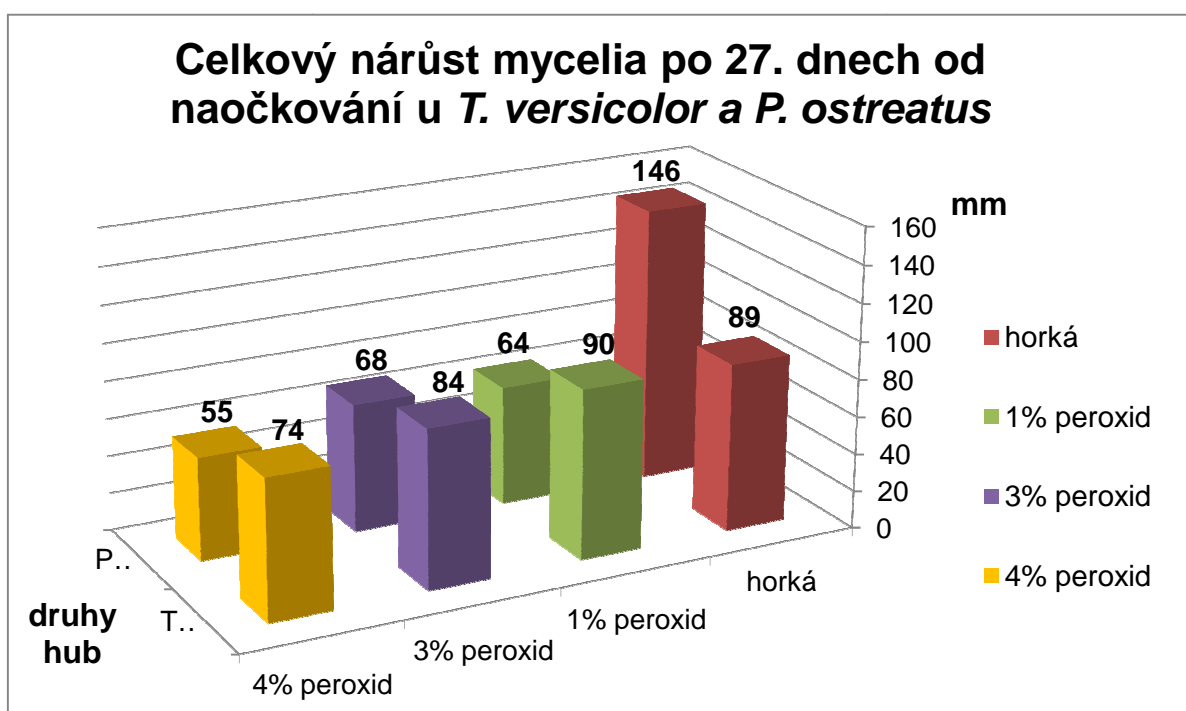
Graf č. 12: Vyjádření dynamiky růstu *Trametes versicolor* na 4. různě ošetřených substrátech.



Graf č. 13: Vyjádření dynamiky růstu *Pleurotus ostreatus* na 4. různě ošetřených substrátech.

Z grafu č. 13 je zřejmé, že mycelium houby *Pleurotus ostreatus* dobře prorůstalo na substrátu ošetřeném horkou vodou. U substrátů ošetřených peroxidem byl růst podstatně pomalejší. Kolonizace substrátu s 3% a 4% H₂O₂ byla ze začátku velmi pomalá, ale v polovině období se průměrné týdenní přírůstky začaly zvětšovat. Na substrátu ošetřeném 1 % peroxidem byl růst po celé období přibližně stejný.

Graf č. 14 ukazuje celkový nárůst mycelia obou hub za období 27. dní od naočkování. Je patrné, že mycelium *Trametes* kolonizovalo všechny substráty rovnoměrně, zatímco mycelium *Pleurotus* kolonizovalo substrát ošetřený horkou vodou velmi rychle, ale ostatní substráty prorostlo jen z malé části. V případě delšího období prorůstání lze předpokládat, že mycelium *Trametes versicolor* by dokončilo kolonizaci všech substrátů přibližně ve stejnou dobu.



Graf č. 14: Vyjádření celkového nárůstu mycelia po 27. dnech od naočkování u *T. versicolor* a *P. ostreatus*.

5.1.5 Pokus č. 5

Porovnání růstu mycelia *Trametes versicolor* na peletách ošetřených 3% koncentrací H_2O_2 v blocích 1,5 kg + fruktifikace

Příprava substrátu proběhla 16. 1. 2012. Druhý den byly naočkovány dva 1,5 kilogramové bloky, kdy v prvním případě byla sadba nasypána na povrch substrátu, ve druhém případě byl substrát se sadbou promíchán. Tento postup byl zopakován u dalších dvou bloků 19. 1. 2012, tedy čtvrtý den od přípravy substrátu.



Obrázek č. 1 a 2: Příklady 1,5 kilogramových bloků prorostlých myceliem *Trametes versicolor*.



Obrázek č. 3 a 4: Příklady 1,5 kilogramových bloků částečně prorostlých myceliem *Trametes versicolor*.

První blok zcela kolonizovaný myceliem outkovky byl naočkováný čtvrtý den od přípravy substrátu a sadba byla se substrátem promíchána. Úplné kolonizace bylo dosaženo 1. 2. 2012, tedy 13 dní po naočkování. O týden později 8. 2. 2012 byly zcela kolonizovány oba bloky, které byly naočkovány na povrch substrátu. Z toho plyne, že blok naočkováný druhý den od přípravy substrátu prorůstal 22 dní, zatímco blok naočkováný čtvrtý den prorůstal jen 20 dní. Tato odchylka může být způsobena použitím rozdílného množství sadby při očkování, které nebylo nijak přesně odměřováno. Také lze považovat za významný fakt, že čtvrtý den od přípravy bylo v substrátu méně peroxidu vodíku, který by růst mycelia zpomaloval. Na čtvrtém bloku, který byl naočkováný druhý den od přípravy substrátu, a sadba byla se substrátem promíchána, byla 30. 1. 2012 nalezena kontaminace. Kontaminace zelenou plísní mohla být způsobena nedostatečnou čistotou při promíchávání sadby nebo také špatným těsněním sterilní zátky z vaty.



Obrázek č. 5 a 6: Příklady 1,5 kilogramových bloků kontaminovaných zelenou plísní.

Všechny nekontaminované bloky byly 8. 2. 2012 přemístěny dle metodiky na místo s teplotou 22 °C a s 6. hodinovými světelnými cykly. Přibližně po 21. dnech se v podmínkách upravených pro fruktifikaci objevila v naříznutých částech i uvnitř bloků primordia, ze kterých by v dalších fázích fruktifikace vyrostly plodnice outkovky pestré (*Trametes versicolor*). Zhruba po dvou měsících od přemístění do těchto podmínek (5. 4. 2012) byla primordia zcela vyvinuta a měla velikost přibližně jako golfový míček (viz obrázky č. 7 a 8).



Obrázek č. 7 a 8: Tvorba primordií v naříznutých částech 1,5 kilogramových bloků.



Obrázek č. 9 a 10: Tvorba primordií uvnitř pytlů 1,5 kilogramových bloků.

5.1.6 Pokus č. 6

Porovnání růstu mycelia *Pleurotus ostreatus* a *Trametes versicolor* na peletách ošetřených sterilizací, destilovanou vodou a různou koncentrací peroxidu vodíku (H₂O₂)

V tabulce č. 5 je zapsáno množství sušiny v substrátech bez naočkování a kolonizace myceliem. Všechny substráty mají přibližně stejné procenta sušiny. Na substráty, které jsou označeny velkým písmenem S, byly použity sterilizované pelety. Sterilizace pelet nijak neovlivňuje množství sušiny v substrátech.

Substrát	Sušina %
H ₂ O S	30,4096
1 % S	31,5039
3 % S	31,1386
4 % S	29,6477
1%	31,3327
3%	31,0297
4%	31,3395

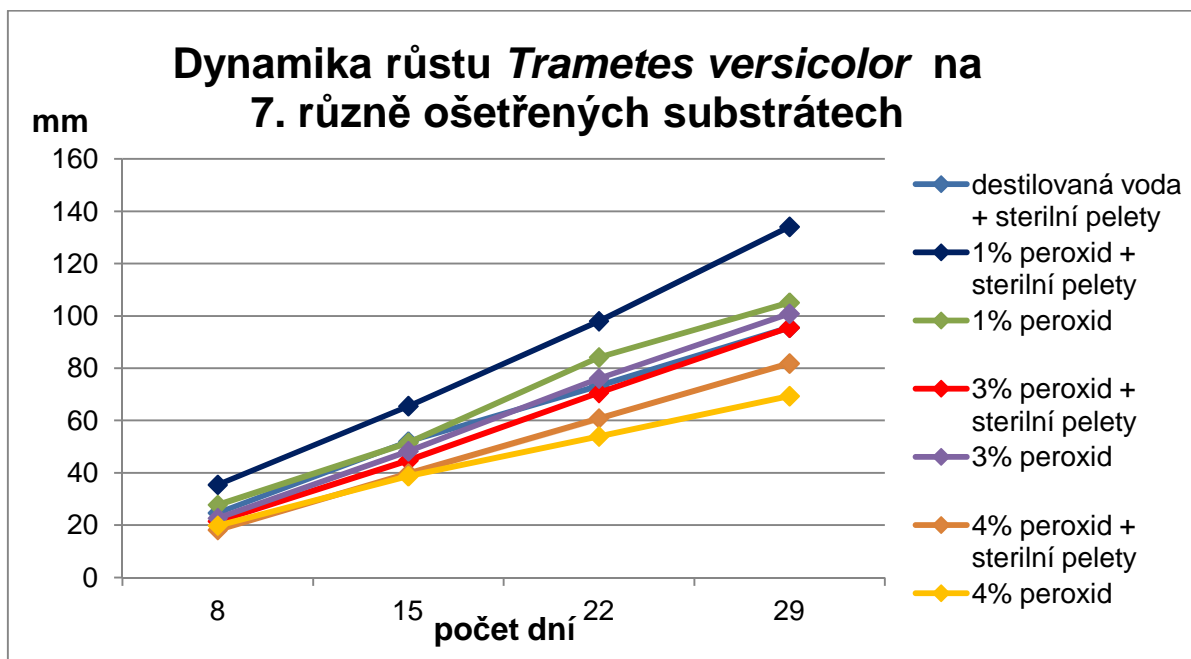
Tabulka č. 5: Sušina substrátů nekolonizovaných myceliem.

V tabulce č. 6 je množství sušiny v substrátech, které byly naočkovány a kolonizovány myceliem hub *Trametes versicolor* a *Pleurotus ostreatus*. V kolonce „Substrát + houba“ je označení jednotlivých substrátů naočkovaných danou houbou (PS 1% - *Pleurotus* na sterilních peletách a 1% peroxidu; T 4% - *Trametes* na peletách bez sterilizace a 4% peroxidu atd.). Vzorky na měření sušiny byly odebrány po ukončení pokusu. Od každé varianty byly odebrány dva vzorky. Jeden vzorek byl odebrán v místě, kterého mycelium dosáhlo 15. den po naočkování a druhý vzorek v místě 30. den po naočkování, tedy na konci pokusu. Toto je znázorněno v kolonce tabulky „Den“. Množství sušiny v kolonizovaných substrátech je opět nižší než množství zjištěné v substrátech bez kolonizace myceliem (viz tabulka č. 5). Tyto výsledky byly dále použity při stanovení aktivity celulolytických a lignolytických enzymů.

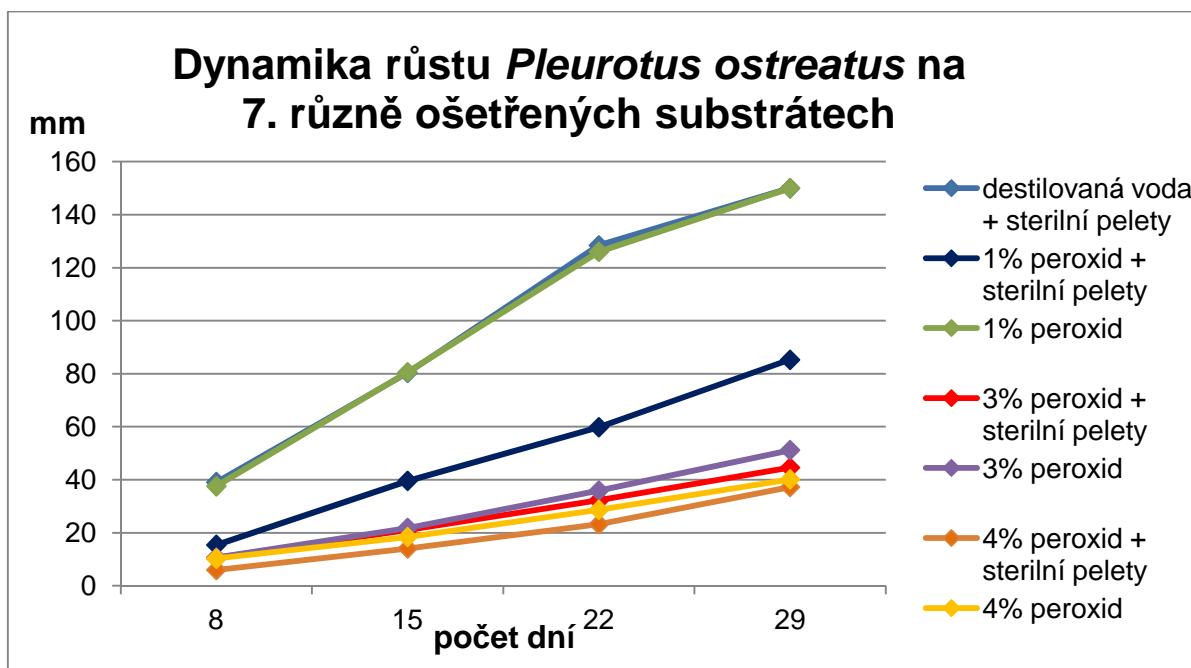
Pořadové číslo	Substrát + houba	Den	Sušina %
1	PS H ₂ O	15.	26,302
2	PS 1%	15.	28,986
3	PS 3%	15.	27,198
4	PS 4%	15.	24,790
5	P 1%	15.	28,389
6	P 3%	15.	26,490
7	P 4%	15.	25,337
8	TS H ₂ O	15.	24,613
9	TS 1%	15.	26,348
10	TS 3%	15.	26,428
11	TS 4%	15.	25,862
12	T 1%	15.	26,326
13	T 3%	15.	25,968
14	T 4%	15.	24,191
15	PS H ₂ O	30.	25,581
16	PS 1%	30.	29,768
17	PS 3%	30.	30,583
18	PS 4%	30.	30,109
19	P 1%	30.	27,302
20	P 3%	30.	28,705
21	P 4%	30.	29,301
22	TS H ₂ O	30.	24,832
23	TS 1%	30.	28,220
24	TS 3%	30.	27,989
25	TS 4%	30.	26,988
26	T 1%	30.	25,513
27	T 3%	30.	27,547
28	T 4%	30.	25,895

Tabulka č. 6: Sušina substrátů po kolonizaci myceliem *Trametes versicolor* a *Pleurotus ostreatus*.

Z grafu č. 15 je patrné, že mycelium *Trametes versicolor* prorůstalo nejlépe substrátem s 1% roztokem peroxidu a sterilními peletami. Kolonizace u této houby probíhá vždy pomaleji než u hlívy, ale je plynulá bez zpomalení nebo úplného zastavení růstu. Mycelium hlívy prorůstá rychleji, proto stihne mycelium outkovky na některých substrátech za období kolonizace prorůst pouze do 1/2 - 2/3 sklenice.



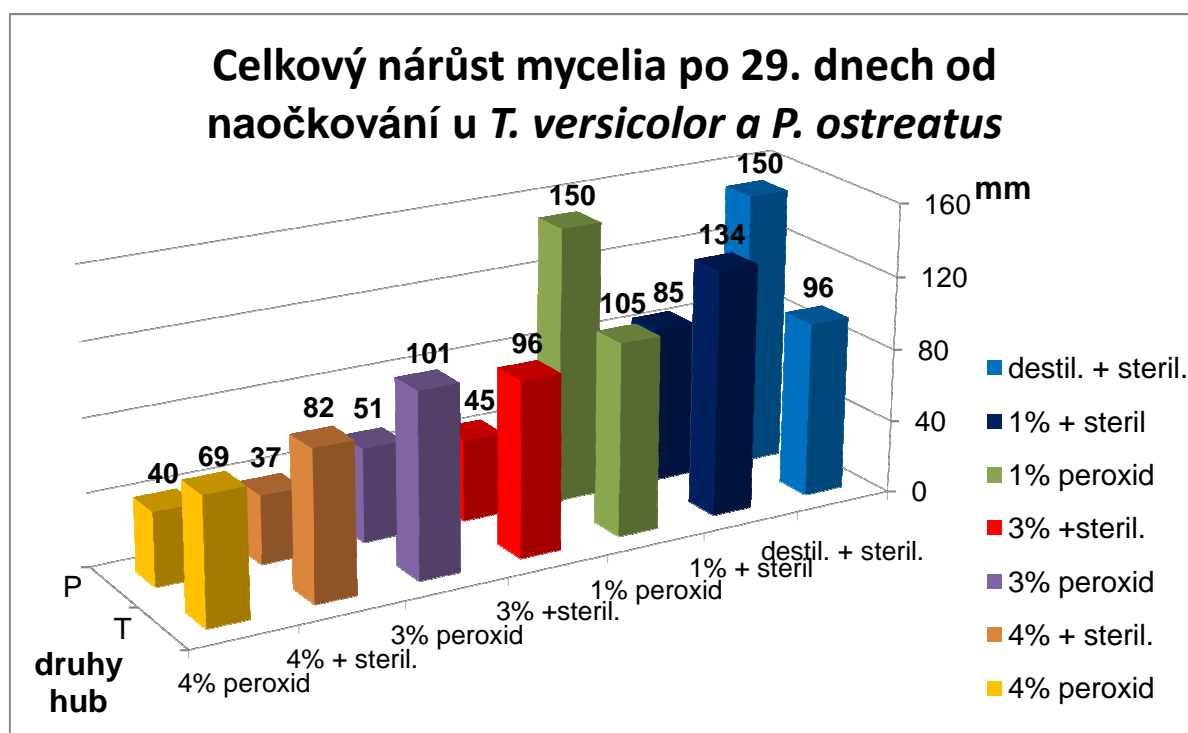
Graf č. 15: Vyjádření dynamiky růstu *Trametes versicolor* na 7. různě ošetřených substrátech.



Graf č. 16: Vyjádření dynamiky růstu *Pleurotus ostreatus* na 7. různě ošetřených substrátech.

Graf č. 16 znázorňuje, že mycelium houby *Pleurotus ostreatus* dobře prorůstalo na substrátu ošetřeném destilovanou vodou a sterilizací pelet. Stejně výsledky měla hlíva i na substrátu s 1% roztokem peroxidu a nesterilními peletami. Z tohoto lze vyvodit, že 1 % roztok peroxidu měl stejné sterilizační účinky jako sterilizace pelet v sušárně a destilování vody. Na substrátech ošetřených 3% a 4% roztokem peroxidu se sterilními i nesterilními peletami měla hlíva kolonizaci výrazně pomalejší.

Graf č. 17 ukazuje celkový nárůst mycelia obou hub za období 29. dní od naočkování. Je patrné, že mycelium *Trametes* kolonizovalo nejrychleji substrát ošetřený 1% roztokem peroxidu se sterilními peletami. Na ostatních substrátech outkovka prorůstala rovnoměrně s přibližně stejnými přírůsky. Mycelium *Pleurotus* kolonizovalo nejrychleji substrát s 1% roztokem peroxidu s nesterilními peletami a substrát s destilovanou vodou se sterilními peletami. Na substrátu ošetřeném 1% roztokem peroxidu se sterilními peletami mělo přibližně poloviční rychlost kolonizace a na ostatních substrátech prorostlo mycelium hlívy přibližně do 1/3 sklenice.



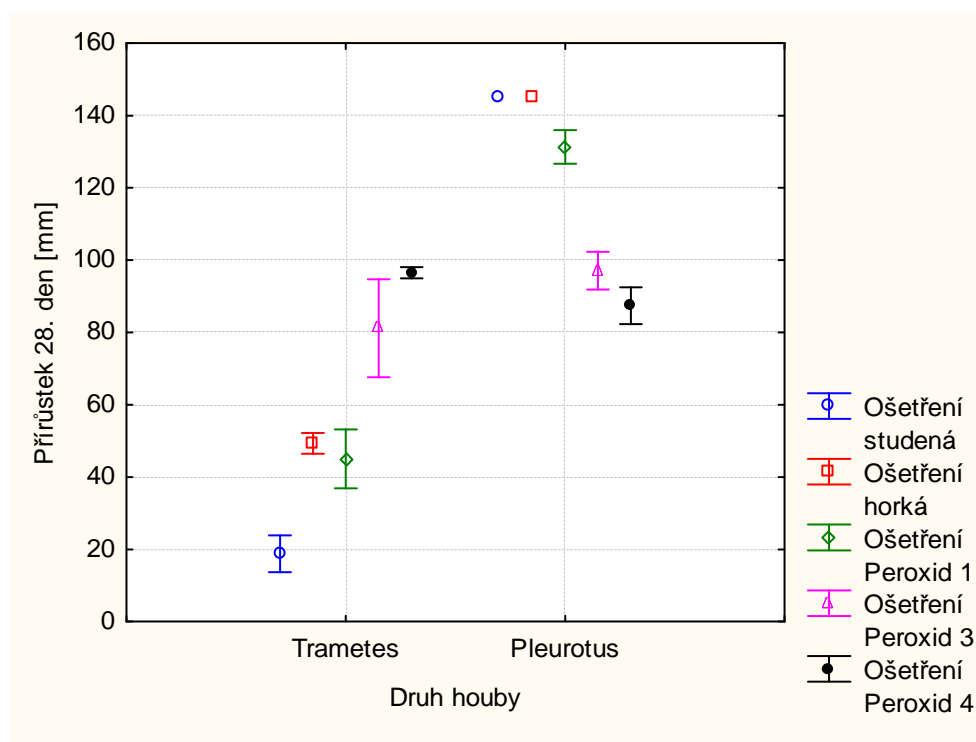
Graf č. 17: Vyjádření celkového nárůstu mycelia po 29. dnech od naočkování u *T. versicolor* a *P. ostreatus*.

5.2 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ

Statistické vyhodnocení pokusů je znázorněno grafy č. 18 – 23. K vyhodnocení byly použity celkové přírůstky z pokusů a zpracovány v programu Statistika. Rozptylové úsečky znázorňují vyrovnanost (homogenitu) růstu mycelia.

Graf č. 18 znázorňuje statistické vyhodnocení pokusu č. 1.

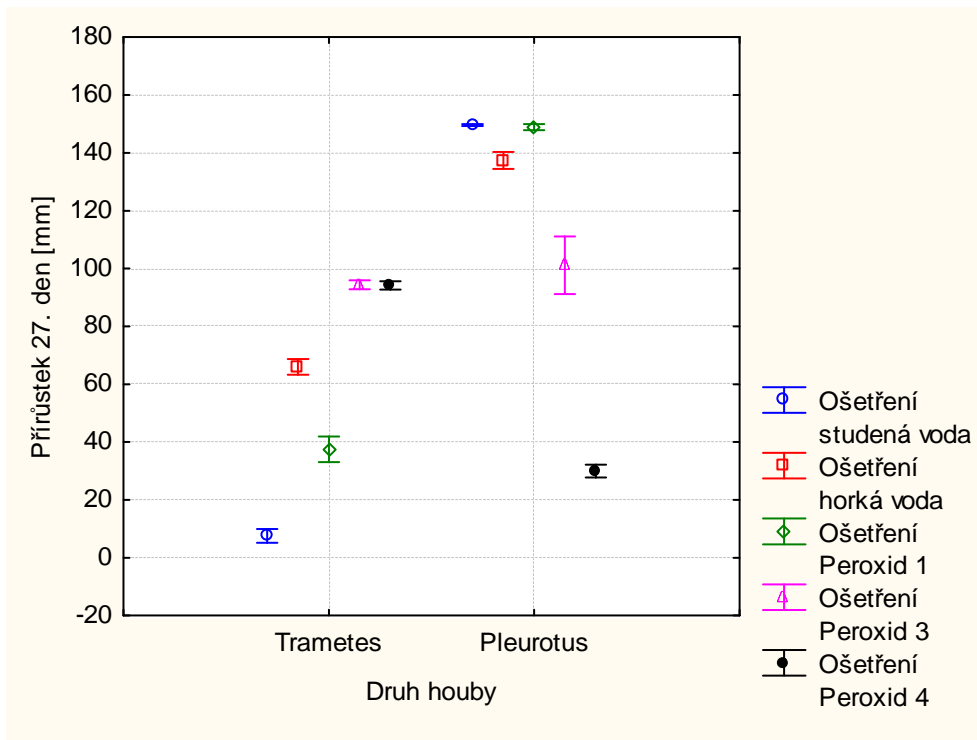
Z výsledků vyhodnocení je zřejmé, že největší rozptyl měla outkovka na substrátu ošetřeném 3% peroxidem vodíku, což mohl být následek kontaminace. Naopak největší homogenitu, tedy velmi vyrovnaný růst vykazovala hlíva na substrátech ošetřených studenou a horkou vodou. Na ostatních substrátech u obou hub byl rozptyl velmi podobný.



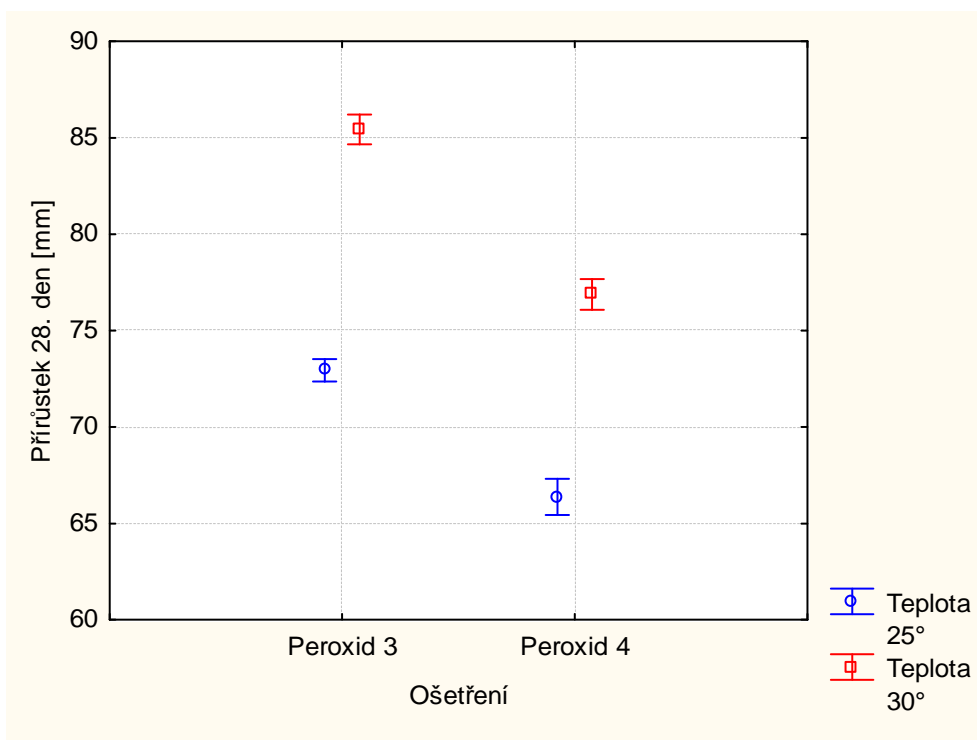
Graf č. 18: Statistické vyhodnocení pokusu č. 1

Graf č. 19 statisticky vyhodnocuje pokus č. 2.

Podle tohoto grafu je zřejmé, že obě houby v tomto pokusu vykazovaly vyrovnaný růst mycelia. Nejvíce homogenní růst byl u mycelia hlívy na substrátech ošetřených studenou vodou a 1% roztokem peroxidu vodíku. Nejvíce variabilní růst vykazovalo mycelium hlívy na substrátu ošetřeném 3% roztokem peroxidu vodíku.



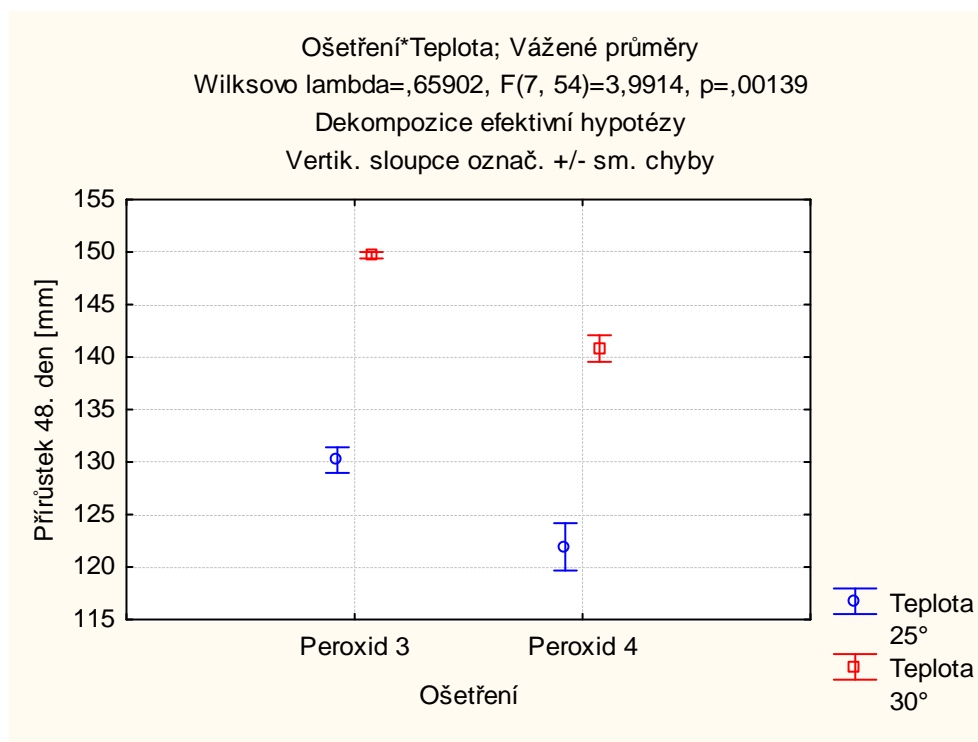
Graf č. 19: Statistické vyhodnocení pokusu č. 2



Graf č. 20: Statistické vyhodnocení pokusu č. 3

Grafy č. 20 a 21 znázorňují statistické vyhodnocení pokusu č. 3.

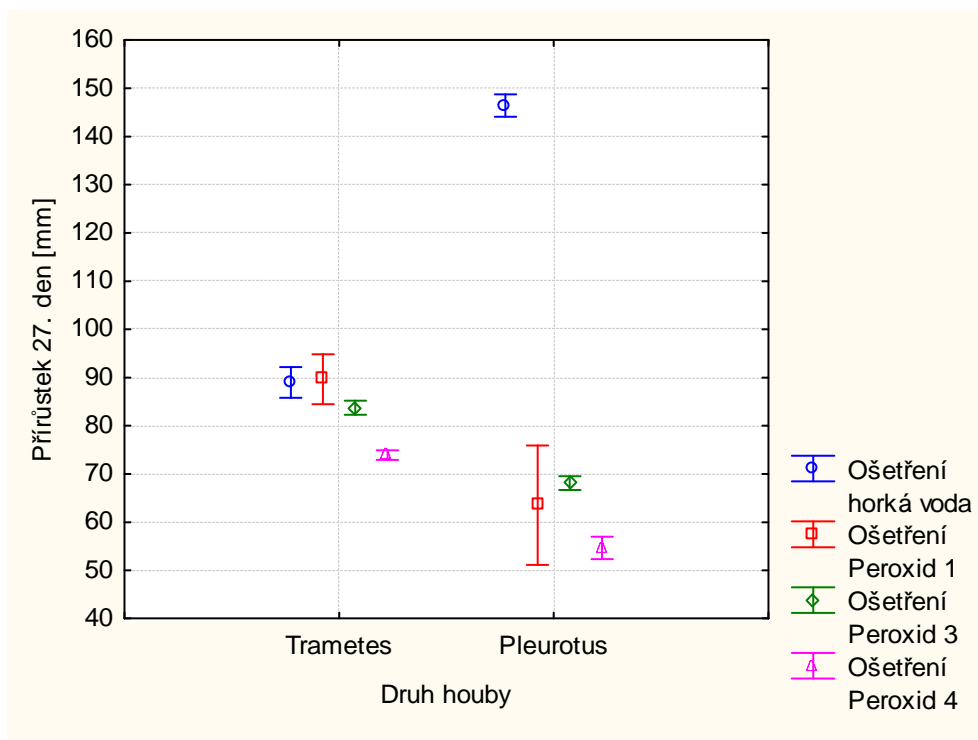
Oba grafy znázorňují velmi podobné rozptyly na obou substrátech. Největší homogenitu měla outkovka na substrátu ošetřeném 3% roztokem peroxidu při teplotě 30 °C na konci pokusu. Srovnáním obou grafů je zřejmé, že ve druhé polovině kolonizace byl růst na tomto substrátu vyrovnanější, rozptyl se snížil. Ke konci pokusu vykazovala outkovka nejvíce variabilní růst na substrátu ošetřeném 4% peroxidem vodíku při teplotě 25 °C.



Graf č. 21: Statistické vyhodnocení pokusu č. 3

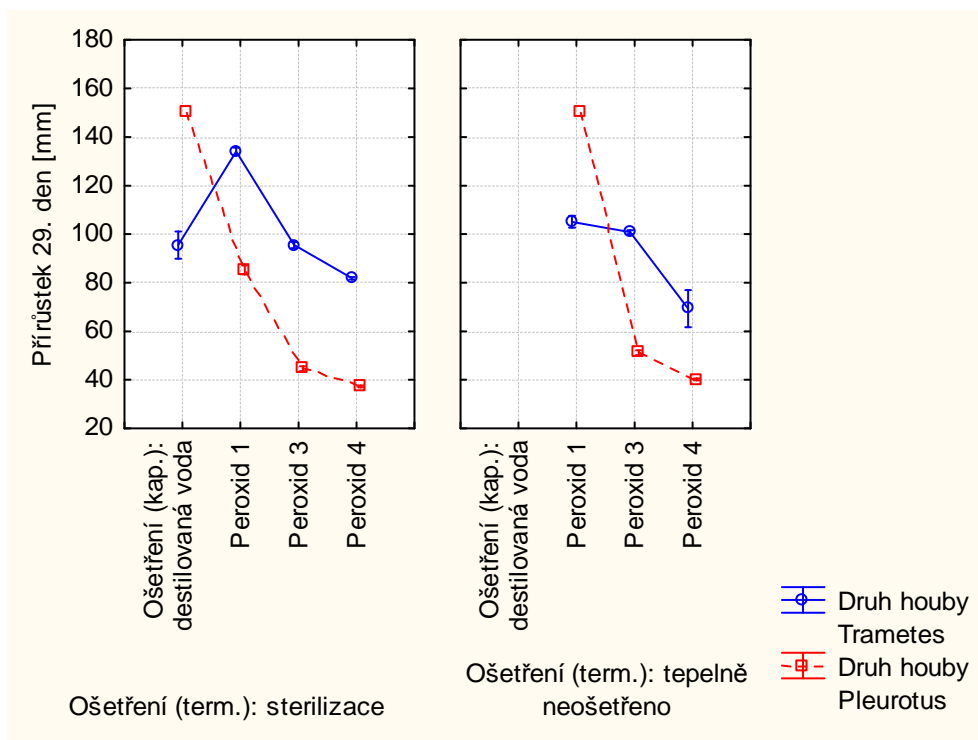
Graf č. 22 statisticky vyhodnocuje pokus č. 4.

Z těchto výsledků je patrné, že největší rozptyl mělo mycelium hlívy ústřičné na substrátu ošetřeném 1% roztokem peroxidu vodíku, což bylo způsobeno kontaminací substrátu zelenou plísní. Také outkovka na substrátu ošetřeném 1% peroxidem vykazovala menší homogenitu než na substrátech s vyššími koncentracemi peroxidu vodíku (3 % a 4 % H₂O₂). Obě houby na substrátech ošetřených 3% a 4% roztokem peroxidu prokazovaly pomalý, ale vyrovnaný růst.



Graf č. 22: Statistické vyhodnocení pokusu č. 4

Z grafu č. 23 je patrné statistické vyhodnocení pokusu č. 6. Z těchto výsledků vyplývá, že růst obou hub byl velmi vyrovnaný. Pouze *Trametes versicolor* na substrátu ošetřeném sterilizací pelet a destilovanou vodou a na nesterilním substrátu ošetřeném 4% roztokem peroxidu vodíku vykazovala malou variabilitu v růstu.



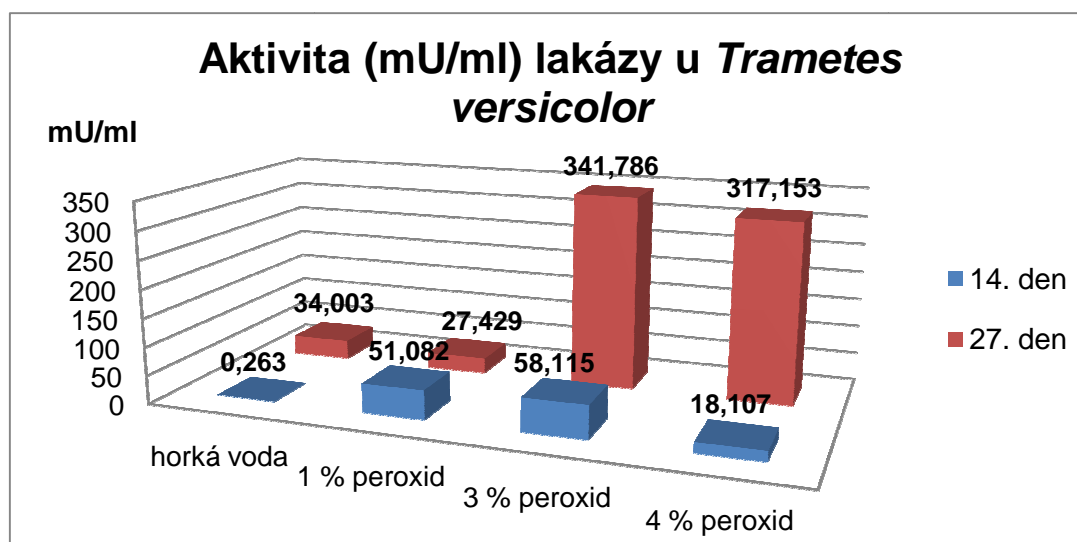
Graf č. 23: Statistické vyhodnocení pokusu č. 6

5.3 STANOVENÍ AKTIVITY CELULOLYTICKÝCH A LIGNOLYTICKÝCH ENZYMŮ

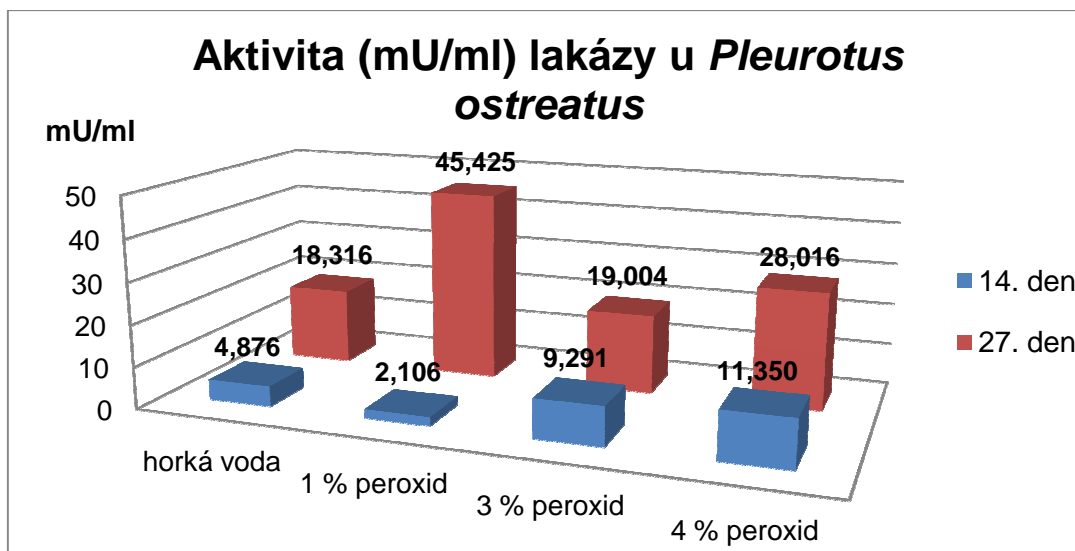
5.3.1 Měření č. 1

Vzorky pro první měření aktivity enzymů byly odebrány po skončení pokusu číslo 4 (31. 10. 2011) a ve dnech 23. 11. a 30. 11. 2011 proběhlo samotné měření aktivity enzymů. V den ukončení pokusu byly odebrány a vyluhovány vzorky dle metodiky. Tyto vzorky byly zmrazeny do doby měření aktivity enzymů.

Graf č. 24 znázorňuje, že aktivita lakázy v myceliu outkovky pestré byla nevyšší 27. den na substrátech ošetřených 3% a 4% roztokem peroxidu vodíku. Aktivita byla vyšší u všech substrátů 27. den od naočkování než 14. den od naočkování kromě v substrátu s 1% roztokem peroxidu. Označení míst odběrů je počet dní od naočkování. Z toho vyplývá, že mycelium odebrané 14. den od naočkování je starší (stáří 13 dní) než mycelium odebrané 27. den od naočkování (stáří přibližně 2 dny). Mladší mycelium má tedy vyšší aktivitu lakázy.



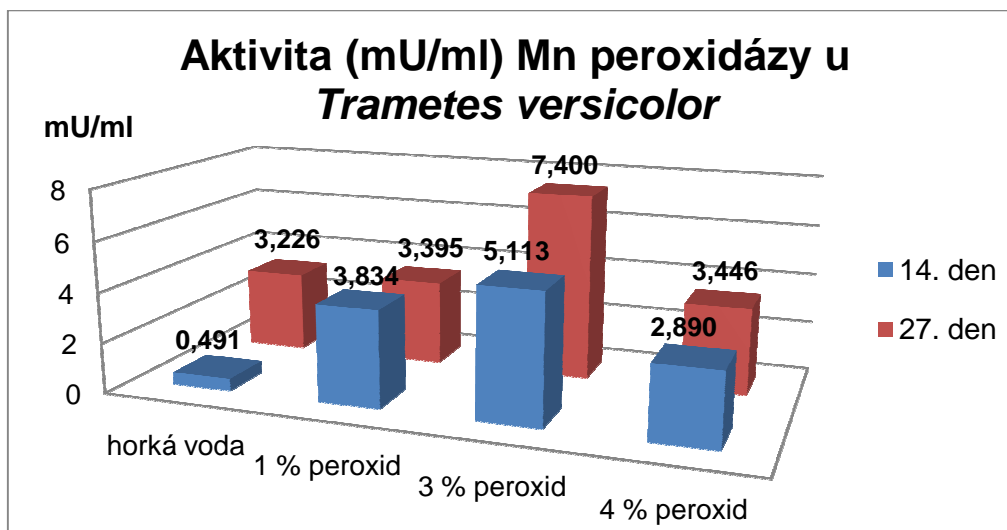
Graf č. 24: Aktivita (mU/ml) lakázy v myceliu *Trametes versicolor* odebraném v místech, kam podhoubí dorostlo 14. a 27. den.



Graf č. 25: Aktivita (mU/ml) lakázy v myceliu *Pleurotus ostreatus* odebraném v místech, kam podhoubí dorostlo 14. a 27. den.

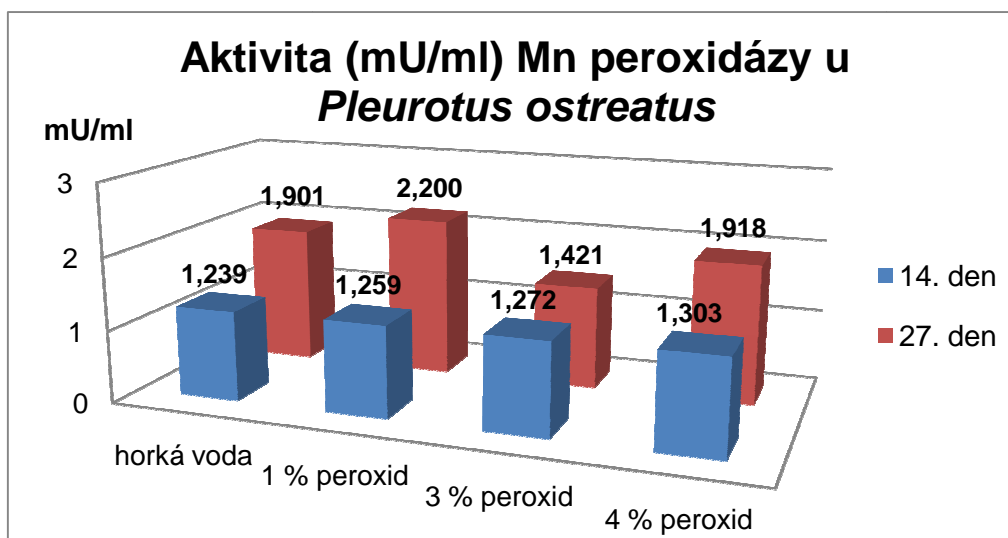
Z grafu č. 25 je zřejmé, že aktivita lakázy v myceliu hlívy ústřičné je také vyšší ve dvoudenním, tedy v mladším myceliu. Nejvyšší rozdíl v aktivitě byl mezi 13 dní starým a 2 dny starým myceliem na substrátu ošetřeném 1% H₂O₂.

Z grafu č. 26 vyplývá, že aktivita Mn-dependentní peroxidázy u outkovky je opět vyšší v mladším myceliu. Na substrátu ošetřeném 1% peroxidem, mělo mladší mycelium aktivitu nižší stejně jako v případě lakázy.



Graf č. 26: Aktivita (mU/ml) Mn peroxidázy v myceliu *Trametes versicolor* odebraném v místech, kam podhoubí dorostlo 14. a 27. den.

Graf č. 27 znázorňuje aktivitu Mn peroxidázy v myceliu hlívy ústříčné. Podle všech grafů z prvního měření aktivity enzymů byla aktivita lakázy i Mn-dependentní peroxidázy u *T. versicolor* i *P. ostreatus* vyšší v mladším myceliu, tedy v myceliu, které bylo v místě odebrání 2 dny staré.



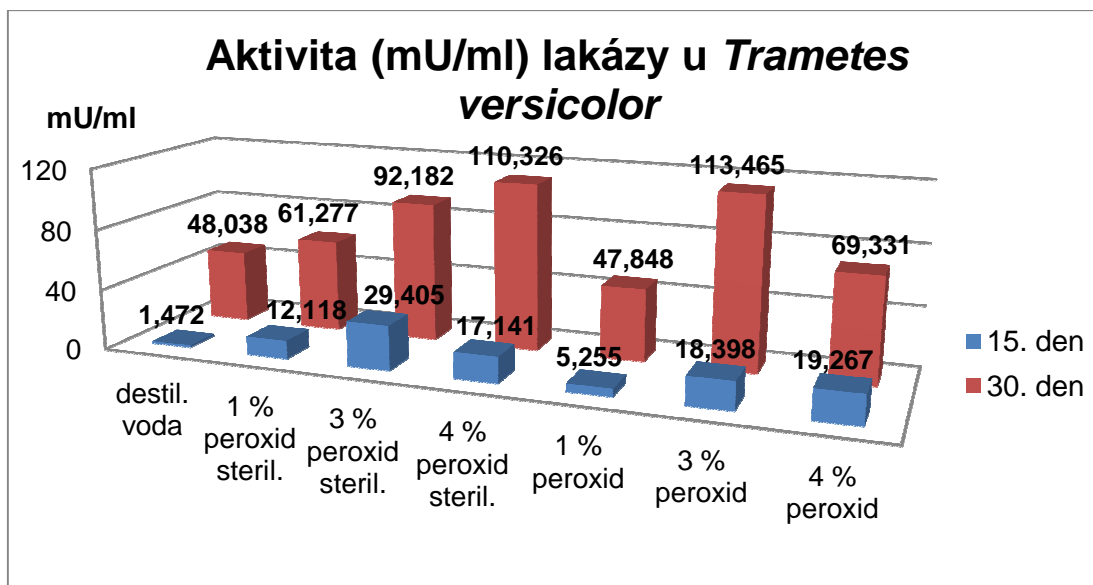
Graf č. 27: Aktivita (mU/ml) Mn peroxidázy v myceliu *Pleurotus ostreatus* odebraném v místech, kam podhoubí dorostlo 14. a 27. den.

5.3.2 Měření č. 2

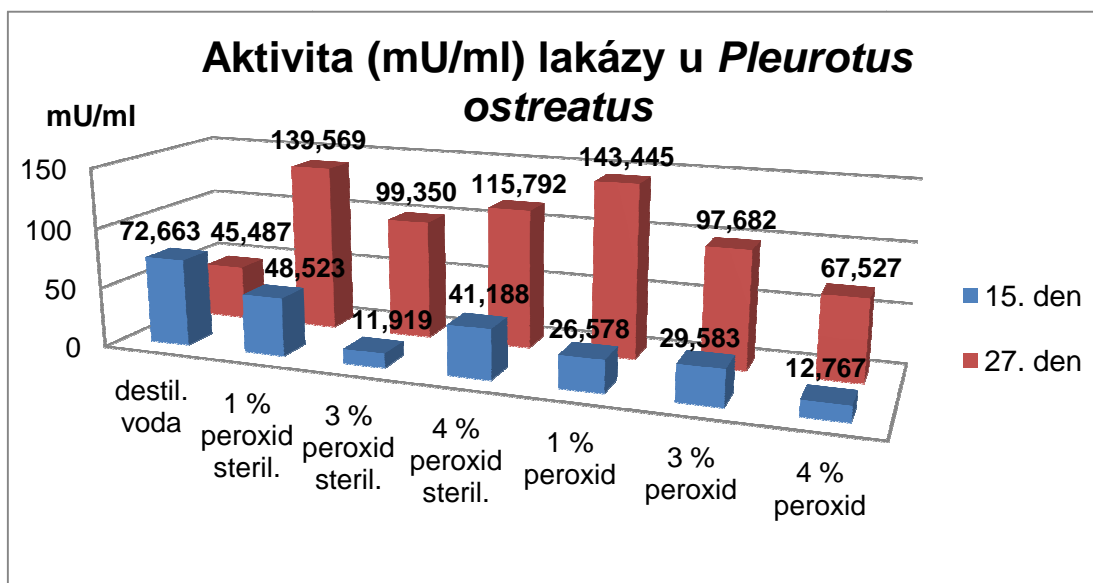
Vzorky pro druhé měření aktivity enzymů byly odebrány po skončení pokusu číslo 6 (11. 7. 2012) a dne 7. 8. 2012 proběhlo samotné měření aktivity enzymů. V den ukončení pokusu byly odebrány a vyluhovány vzorky dle metodiky. Tyto vzorky byly zmrazeny do doby měření aktivity enzymů.

Z grafů z druhého měření je zřejmé, že aktivita mycelia, které dorostlo do místa odběru 30. den (stáří 2 dny), byla ve většině případů vyšší než aktivita mycelia, které dorostlo do místa odběru 15. den (stáří 15 dní). Tedy mladší mycelium obou hub mělo vyšší aktivitu lakázy a Mn-dependentní peroxidázy.

Z grafu č. 28 vyplývá, že nejvyšší rozdíl v aktivitě lakázy mezi vzorky odebranými ze stejných substrátů vykazuje *Trametes* na substrátech ošetřených vyšší koncentrací peroxidu vodíku (3% a 4% H₂O₂). Naopak podle grafu č. 29 je patrné, že nejvyšší rozdíly v aktivitě lakázy má *Pleurotus* na substrátu ošetřeném 1% peroxidem.

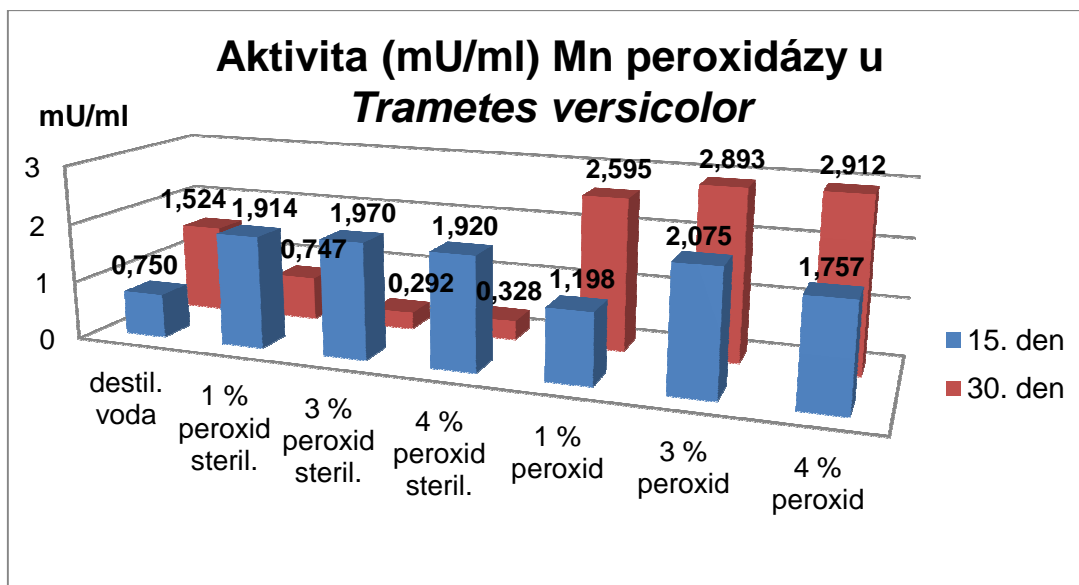


Graf č. 28: Aktivita (mU/ml) lakázy v myceliu *Trametes versicolor* odebraném v místech, kam podhoubí dorostlo 15. a 30. den.

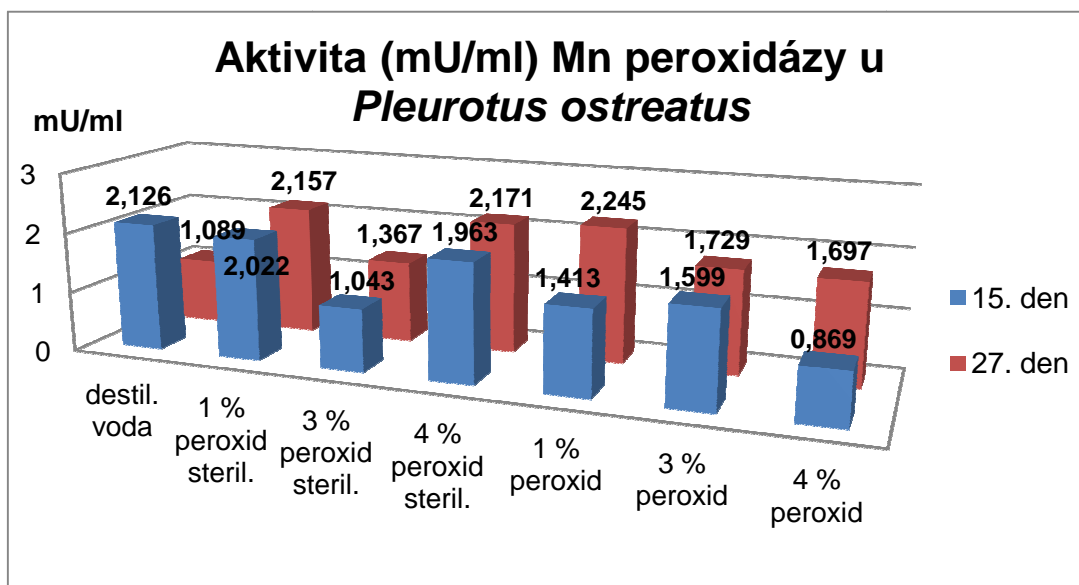


Graf č. 29: Aktivita (mU/ml) lakázy v myceliu *Pleurotus ostreatus* odebraném v místech, kam podhoubí dorostlo 15. a 30. den.

Z grafu č. 30 je zřejmé, že aktivita Mn peroxidázy u outkovky byla u mladšího mycelia na sterilních substrátech nižší než u mycelia staršího. Z grafu č. 31 je patrné, že aktivita Mn peroxidázy mycelia hlívy byla u všech substrátů, kromě substrátu s destilovanou vodou, vyšší u mladšího mycelia.



Graf č. 30: Aktivita (mU/ml) Mn peroxidázy v myceliu *Trametes versicolor* odebraném v místech, kam podhoubí dorostlo 15. a 30. den.



Graf č. 31: Aktivita (mU/ml) Mn peroxidázy v myceliu *Pleurotus ostreatus* odebraném v místech, kam podhoubí dorostlo 15. a 30. den.

Ve výsledcích z obou měření aktivity lakázy a Mn peroxidázy u *Trametes versicolor* a *Pleurotus ostreatus* je patrné, že ve většině případů má vyšší aktivitu těchto enzymů dvoudenní, tedy mladší mycelium než mycelium staré 15 dní. Ostatní enzymy (zmíněno v metodice) nejsou ve výsledcích uvedeny z důvodu nevykazování trendu, podle kterého lze určit spojitost jejich aktivity s použitím peroxidu vodíku.

Pozn.: mU/ml – U (enzymová jednotka) je starší jednotka používaná v biochemii pro aktivitu enzymů.

6 Diskuse

Rychlost růstu mycelia *Trametes versicolor* a *Pleurotus ostreatus* byla průkazně ovlivněna ošetřením substrátu z pšeničných pelet různými koncentracemi peroxidu vodíku. Z výsledků našich pokusů je patrné, že mycelium *Trametes* prorůstalo nejrychleji substrátem ošetřeným 1% roztokem peroxidu a velmi podobné výsledky prokazovalo i na substrátu ošetřeném horkou vodou. Substráty ošetřeny 3% a 4% roztokem peroxidu mycelium prorůstalo výrazně pomaleji, ale při prodloužení pokusu o několik dní by bez problémů prorostlo celý substrát. Z prvních dvou pokusů však vyplývá, že na substrátu ošetřeném studenou vodou se myceliu outkovky nedařilo. Na tomto substrátu vykazovalo velmi pomalý růst, který byl ve většině případů zastaven v důsledku kontaminace zelenou plísní. Naopak mycelium *Pleurotus* prorůstalo velmi rychle substráty ošetřeny studenou a horkou vodou. Podobné přírůstky mělo i na substrátu s 1% peroxidem vodíku. Mycelium hlívy však velmi špatně a pomalu prorůstalo substráty ošetřeny vyššími koncentracemi peroxidu (3 % a 4 % H₂O₂). Působení peroxidu vodíku je pravděpodobně krátkodobé, vzhledem k tomu, že je peroxid silně oxidační činidlo. V průběhu jeho působení vznikají pravděpodobně některé produkty, které brzdí růst mycelia. V našem případě byla na tyto produkty mnohem více citlivější hlíva než outkovka.

Výsledky růstových zkoušek mycelia hlívy ústřední potvrzují pokusy Poslušné (2012), která shodně uvedla, že mycelium *Pleurotus ostreatus* a *Hypsizygos tessulatus* roste nejlépe na substrátech ošetřených horkou vodou, popřípadě nízkými koncentracemi peroxidu vodíku. Wayne (2001) doporučuje optimální koncentraci peroxidu vodíku 0,03 % a tvrdí, že nízké koncentrace peroxidu vodíku inhibují klíčení houbových a bakteriálních spor. Toto tvrzení nelze potvrdit, jelikož kontaminace substrátů v našich pokusech byla pozorována i na substrátech ošetřených 1% roztokem peroxidu (viz tabulky přírůstků v přílohách 2 – 6).

Wayne (2001) popsal návod na efektivní domácí pěstování hub na substrátu sterilizovaném peroxidem vodíku. Pro optimální chemickou sterilizaci substrátu doporučuje vodu nejdříve povařit na 90 °C, poté část nalít ihned do substrátu, část nechat odstát a teprve po vychladnutí smíchat s peroxidem vodíku. V našich pokusech však tato metoda nešla uskutečnit, protože vodu nasáknutou

do pelet nebylo jak odstranit a substrát by byl příliš přemokřený. Peroxid vodíku při teplotě nad 60 °C rozkládá aktivně všechny materiály, a proto Wayne (2001) doporučuje přidat jej až do vychladnuté vody.

Také Savoie et al. (2007) uvádí, že peroxid vodíku má velký význam při metabolismu hub a při ošetření substrátu pro pěstované houby. Jeho pokusy byly provedeny na houbách *Agaricus bisporus* a *Pleurotus* spp., kdy zkoumal množství peroxidu vodíku v myceliem prorostlých substrátech z pšeničné slámy a kávové drti. Savoie et al. (2007) zjistil, že peroxid vodíku je hlívuou ústříčnou produkován. Ze substrátů z pšeničné slámy a kávové drti odebral vzorky 4., 8., 12. a 16. den od naočkování, a měřil koncentraci přítomného peroxidu vodíku, která se v různých termínech odběru lišila. Produkce peroxidu na pšeničné slámě se také lišila od produkce na kávové drti. Na surové slámě byla nejvyšší produkce peroxidu v období 8. a 12. den od naočkování. Produkce peroxidu a aktivita enzymů má dle Savoie et al. (2007) souvislost s tvorbou plodnic.

Podle Wayne (2001) tepelné ošetření substrátu horkou vodou imobilizuje aktivitu enzymů katalázy a peroxidázy, které jsou produkovány kompetičními organismy (houby a bakterie). Tyto enzymy dokážou v tepelně neupravených substrátech ze slámy nebo pilin peroxid vodíku velice rychle rozložit. Wayne (2001) také doporučuje dbát během očkování substrátů na čistotu okolí a sadby a zabránit tak případným kontaminacím. I když peroxid vodíku dokáže zničit kvasinky, izolované spory a bakterie, proti mnohobuněčným organismům, jako je například zelená plíseň rodu *Aspergillus*, je účinný méně. Tyto vícebuněčné organismy a vysoké koncentrace klíčících spor mohou produkovat enzymy, které peroxid vodíku rozkládají, a tím se proti vyšším koncentracím peroxidu brání.

Vzhledem k tomu, že substráty ošetřeny 1%, 3% a 4% roztoky peroxidu vodíku nebyly zcela tepelně ošetřeny, je třeba předpokládat, že se zárodky plísní a jejich enzymy (kataláza a peroxidáza) v substrátech vyskytovaly. Pelety z pšeničné slámy jsou na rozdíl od surové slámy částečně tepelně ošetřeny v průběhu jejich výroby působením vysoké teploty při lisování. Surová sláma proto může být více kontaminována zárodky plísní a účinky peroxidu mohou být nižší při kultivaci outkovky i ostatních hub, jak dokazuje Poslušná (2012). U pokusu, kde byly pelety vystaveny sterilizaci v sušárně při teplotě 121 °C po dobu 3. hodin, lze předpokládat, že enzymy katalázy a peroxidázy byly inhibovány, a proto mycelium outkovky prorůstalo rychleji sterilním substrátem ošetřeným 1% roztokem peroxidu vodíku než

v nesterilním substrátu. Naopak myceliu hlívy sterilizace pelet nepospěla, což může znamenat, že ošetření substrátu peroxidem vodíku není pro tuto houbu vhodné. Může to také znamenat, že hlíva roste na sterilních substrátech pomaleji a je vnímavější vůči kompetitorům než na substrátu, ve kterém je přirozená populace bakterií. Také Poslušná (2012) zjistila, že mycelium hlívy ústříčné roste nejlépe na substrátu ošetřeném horkou vodou, popřípadě nízkou koncentrací peroxidu vodíku a při vyšších koncentracích H_2O_2 je její růst velmi pomalý. Substráty v našich pokusech byly očkovány ve sterilním prostředí (flowbox) a byly použity pouze lihem a kahanem sterilované pomůcky, čímž lze vysvětlit nízké frekvence kontaminací substrátů během kolonizace myceliem.

Byly zjišťovány ideální teploty pro růst mycelia *Trametes versicolor* (outkovka pestrá) na substrátech ošetřených 3% a 4% roztokem peroxidu vodíku. Mycelium outkovky bylo naočkováno na ošetřené substráty a část byla uložena v teplotě 25 °C a část v teplotě 30 °C. Po zpracování výsledků bylo zjištěno, že nejrychlejší růst mělo podhoubí outkovky na substrátu šetřeném 3% peroxidem v teplotě 30 °C. Stamets (2000) však uvádí ideální teplotu pro prorůstání mycelia outkovky 24 – 29 °C. Antonín a spol. (v tisku) uvádí ideální teplotu v rozmezí pouze 20 – 24 °C a tvrdí, že při této teplotě roste mycelium outkovky nejrychleji. Podle Jablonského a Šaška (2006) je pro růst mycelia *Pleurotus ostreatus* (hlíva ústříčná) ideální teplota 28 °C, kdy podhoubí roste nejrychleji a při teplotách nižších než 20 °C je růst značně zpomalen. Ve všech našich pokusech však vykazovalo mycelium hlívy pravidelný a velmi rychlý růst při teplotě 24 – 26 °C.

Z výsledků je zřejmé, že mycelium outkovky má pomalejší růst než mycelium hlívy. Na substrátech ošetřených horkou vodou a 1% roztokem peroxidu dosahovaly obě houby nejlepšího růstu. Většina pokusů však byla ukončena po 27. – 29. dnech, kdy dna sklenice dosáhlo jako první mycelium hlívy na substrátu s horkou vodou. Za tuto dobu dosáhlo mycelium outkovky na stejném substrátu polovičního růstu. Z porovnání rychlosti růstu a výskytu kontaminace zelenými plísněmi na ošetřených substrátech lze usoudit, že hlíva lépe odolává konkurenčním mikroorganismům než outkovka. Podle Jablonského (2013, osobní sdělení) lze z pozorování v přírodě usuzovat, že outkovka je houbou následnou, která roste například na špalcích dřeva, které před ní osídlilo podhoubí *Pleurotus ostreatus* nebo *Lentinula edodes* (Shiitake).

Stamets (2000) uvádí, že při zajištění ideálních podmínek prorůstá mycelium outkovky s ohledem na objem a druh substrátu 14 – 21 dní. Antonín a spol. (v tisku) uvádí, že kolonizace mycelia outkovky v blocích trvá přibližně 40 dní a jeho rychlost je srovnatelná s růstem mycelia hlívy. V našem pokusu prorostlo mycelium outkovky 1,5 kilogramový blok za 13 – 22 dní, takže doba prorůstání je velmi závislá na objemu a druhu kolonizovaného substrátu. Jisté je, že rychlost prorůstání substrátu myceliem závisí také na množství dodaného inokula, to často autoři neudávají.

Ideální teplota pro tvorbu primordií outkovky pestré je podle Stametse (2000) 10 – 24 °C, i když růst primordií je možný i při teplotě 27 °C. Stamets (2000) také píše, že pro kolonizaci mycelia je zapotřebí tmy, ale pro tvorbu a vývoj primordií je třeba zajistit světelné podmínky 500 – 2 000 luxů. Při zajištění ideálních podmínek je stádium vývoje primordií outkovky 7 – 14 dní. V našem pokusu, kdy fruktifikace probíhala při teplotě 22 °C na 1,5 kilogramových blocích prorostlých myceliem outkovky, trvalo přibližně 21 dní, než se začala objevovat v průřezech bloků malá primordia. Světelné podmínky pro tvorbu primordií měly intenzitu světla 200 – 800 luxů a byly zajištěny klimatizovaným boxem v 6. hodinových intervalech (6 hodin světlo a 6 hodin tma). Přibližně za dva měsíce v těchto podmínkách byla primordia zcela vyvinuta.

Hodnoty pH nekolonizovaných substrátů se pohybovaly v rozmezí 6,5 – 6,9. Hodnoty pH substrátů kolonizovaných myceliem outkovky byly v rozmezí 5,1 – 5,2 a substráty prorostlé myceliem hlívy měly hodnoty pH 5,1 – 5,4. Podle Jablonského a Šaška (2006) se optimální hodnoty pH pro růst podhoubí pohybují v rozmezí 5,5 – 6,5 a hodnoty mimo toto rozmezí růst mycelia zpomalují. Jablonský a Šašek (2006) dále doplňují, že hodnoty pH se v substrátu během kolonizace mění. Jiné hodnoty pH má substrát ve vnitřních vrstvách a podstatně nižší hodnoty pH má substrát na povrchu.

Baldrián (2006) uvádí, že aktivita lakázy a Mn-dependentní peroxidázy byla prokázána v mnoha druzích hub. Existuje mnoho taxonomických nebo fyziologických skupin hub, které obvykle neprodukují významné množství těchto enzymů nebo je vyrábí jen několik druhů. Například výroba lakázy nikdy nebyla prokázána u nižších hub (*Zygomycetes* a *Chytridiomycetes*). Existuje mnoho záznamů, že je lakáza a Mn peroxidáza vyráběna saprotrofními houbami z třídy *Basidiomycetes*, tj. především houbami bílé hniloby, které způsobují degradaci ligninu. U *Trametes versicolor* byla zjištěna produkce lignolytických enzymů extracelulární i intracelulární.

U Pleurotus ostreatus byla zjištěna výroba enzymů pouze intracelulární. Podstatnou část aktivity lakázy a Mn peroxidázy v *T. versicolor* a *P. ostreatus* vykazuje buněčná stěna, zatímco v jiné houbě třídy *Basidiomycetes*, například *Agricorus bisporus*, nebyla činnost těchto enzymů v buněčné stěně nalezena. Baldrián (2006) uvádí, že aktivita lakázy a Mn peroxidázy je dána stářím mycelia, vlhkostí substrátu a dostatkem kyslíku. Závislost na vlhkosti substrátu je prokázána pozorováním v přírodě, kdy roste více hub v chladnějších měsících s dostatkem vlhkosti než v suchých letních měsících. Při kolonizaci substrátu myceliem je potřeba zajistit dostatek kyslíku pro enzymy, a proto je ideální výměna vzduchu větráním každou hodinu, jak uvádí Stamets (2000).

Měřením aktivity enzymů ve vzorcích z našich pokusů bylo zjištěno, že aktivita lakázy a Mn peroxidázy je nižší u staršího mycelia, což potvrzuje tezi Baldriána (2006), že stárnutím mycelia aktivita enzymů klesá. V některých případech byla zjištěna aktivita lakázy i Mn peroxidázy nižší v mladém myceliu než ve starším, což mohlo být způsobeno například oslabením při kontaminaci jinou houbou. V porovnání obou hub v aktivitě lakázy u mladšího mycelia vykazovala outkovka pestrá vyšší aktivitu na substrátech ošetřených vyššími koncentracemi peroxidu (3 % a 4 % H_2O_2) než na substrátu ošetřeném horkou vodou, a to na substrátech ze sterilních i nesterilních pelet. Tento výsledek potvrzuje, že outkovka kolonizuje lépe substráty ošetřené vyššími koncentracemi peroxidu vodíku. A z toho tedy plyne, že pro její pěstování je vhodné používat peroxid vodíku, jako alternativní prostředek chemické sterilizace substrátů. Naopak mycelium hlívy ústříčné mělo nejvyšší aktivitu lakázy na sterilních i tepelně neošetřených substrátech s 1% roztokem peroxidu. To také vysvětluje tvrzení Poslušné (2012), že substrát vhodný pro hlívu, je substrát ošetřený nízkými koncentracemi peroxidu a horkou vodou.

Z porovnání aktivity Mn peroxidázy vyplývá, že *Trametes* měla nejvyšší aktivitu opět na substrátech ošetřených peroxidem vodíku. Avšak na sterilních substrátech ošetřených všemi koncentracemi peroxidu aktivitu v mladším myceliu vykazovala velmi nízkou, což se shoduje s objevem Baldriána et al. (2005), který v pokusech zjistil statisticky významnou negativní korelaci mezi koncentrací peroxidu a Mn peroxidázou a pozitivní korelaci mezi koncentrací peroxidu a lakázou. My se však domníváme, že peroxid neovlivňuje aktivitu enzymu Mn peroxidázy během kolonizace substrátu, protože v případě mycelia hlívy byla aktivita Mn peroxidázy ve

většině substrátů velmi podobná, a na substrátu ošetřeném sterilizací pelet a destilovanou vodou dokonce nejnižší.

V porovnání aktivity mladšího a staršího mycelia je zřejmé, že starší mycelium ztrácelo aktivitu lakázy velmi rychle. Na většině substrátů vykazovalo mnohem nižší aktivitu lakázy než mladé mycelium. Naopak aktivita Mn peroxidázy u staršího mycelia nebyla výrazně nižší než u mladého mycelia. Na substrátech, kde prokazovalo starší mycelium vyšší aktivitu lakázy a Mn peroxidázy než mladší mycelium, je pravděpodobné, že kolonizace substrátu byla zpomalena či úplně zastavena a aktivita enzymů snížena v důsledku kontaminace substrátů kompetičními houbami.

Baldrián et al. (2005) uvádí, že nejvyšší aktivita lakázy a Mn peroxidázy byla pozorována během prvního měsíce degradace. V našich pokusech byla aktivita měřena nejpozději 30. den, takže toto tvrzení nemůžeme potvrdit ani vyvrátit.

7 Závěr

Výsledky pokusů prokázaly, že různé koncentrace peroxidu vodíku statisticky průkazně ovlivnily schopnost mycelia houby *Trametes versicolor* kolonizovat pěstební substrát a snížily jeho kontaminaci.

Dále bylo prokázáno, že *Trametes versicolor* i *Pleurotus ostreatus* dosahují nejlepšího růstu na substrátech ošetřených horkou vodou a 1% peroxidem vodíku. Outkovka pestrá dobře kolonizuje i substráty s vyšší koncentrací peroxidu, naopak růst mycelia hlívy ústřičné je v substrátech s vyšší koncentrací peroxidu (3 % a 4 % H₂O₂) pomalejší. Substráty ošetřené studenou vodou kolonizovala pouze hlíva.

Jako ideální teplota pro kolonizaci substrátů s vyšší koncentrací peroxidu vodíku myceliem outkovky pestré byla na základě pokusu stanovena teplota 30 °C.

Podařilo se dosáhnout vývoje primordií houby *Trametes versicolor* v laboratorních podmínkách, kdy se první malá primordia objevila po 21. dnech a zcela vyvinutá byla po dvou měsících v podmínkách pro fruktifikaci.

Stanovením aktivity enzymů lakázy a Mn-dependentní peroxidázy bylo zjištěno, že vyšší aktivitu vykazuje mladší mycelium, staré přibližně 2 dny (místo odběru 27. a 30. den po naočkování). Mycelium staré 13 a 15 dní (místo odběru 14. a 15. den po naočkování) svou aktivitu enzymů zřejmě stárnutím ztrácelo.

8 Seznam literatury

Antonín, V., Šašek, V., Jablonský, I., Vančuríková, Z. V tisku. Léčivé houby. Ottovo nakladatelství, Praha

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

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. 2009. Microbial enzyme-catalyzed processes in soils and their analysis. *Plant, Soil and Environment*, volume 55, No. 9, p. 370 – 378, ISSN 1214-1178

Jablonský, I., Šašek, V. 1997. Pěstování hub ve velkém i malém. Nakladatelství Brázda, Praha, 168 s. ISBN: 80-209-0266-X

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

Jablonský, I. 2013. Nepublikováno, osobní sdělení

Kalina, T., Váňa, J. 2005. Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. Karolinum, Praha, 606 s. ISBN: 978-80-246-1036-8

Killham K. 2001. Soil Ecology. Cambridge university press, first edition, Cambridge, p. 40 – 61, ISBN: 0-521-43521-8

Klán, J. 1989. Co víme o houbách. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 310 s. ISBN: 80-04-21143-7

Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M. 2004. Farmakologie a toxikologie, Grada Publishing a.s., 728 s.

Maršálek, J., Hrnčíř, Š. 2000. β -D-glukany jako imunomodulátory pro naše zdraví. Výživa a potraviny, ročník. 55, číslo 6, ISSN: 1211-846X

Novák, M. 2007. β -glukany, historie a současnost. Chemické listy Vol. 101, Praha, s. 872 – 880

Poslušná, M. 2012. Podmínky růstu a tvorby plodnic u líhovce moučného. Diplomová práce, Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Katedra Zahradnictví, 105 s.

Savoie, J. M., Salmones, D., Mata, G. 2007. Hydrogen peroxide concentration measured in cultivation substrates during growth and fruiting of the mushrooms *Agaricus bisporus* and *Pleurotus* spp. Journal of the Science of Food and Agriculture, Volume 87, Number 7, John Wiley & Sons, Ltd., p. 1337-1344

Singh, R. S., Bhari, R., Kaur, H. P. 2010. Mushroom lectins: Current status and future perspectives. [online], Critical Reviews in Biotechnology; [cit. 2013-01-14]. dostupné z: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/07388550903365048>

Stamets, P. 2000. Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms. Ten speed Press, California, 574 p. ISBN: 0-89815-608-4

Stamets, P. 2005. Mycelium running – Hone Mushrooms Can help save the World. Ten speed Press, California – Berkeley, 343 p. ISBN: 1580085792

Internetové zdroje monografie:

Limura, S. 2005. Progress toward the Total Synthesis of Pleurotin. Wipf Research Group Meeting, University of Pittsburgh, [online], 17 p.; [cit. 2013-02-27].

dostupné z: <http://ccc.chem.pitt.edu/wipf/Topics/Shinya.pdf>

Kotrbová, G. 2011. Kvantifikace zásoby uhlíku v půdě pro účely inventarizace krajiny. Bakalářská práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, [online], 28 s.; [cit. 2013-03-19].

dostupné z: http://theses.cz/id/fdq57k/Bakalsk_prce_Gabriela_Kotrbov.pdf

Mackuľak, T., Prousek, J. 2010. Využitie drevokazných húb pri predúpravě lignocelulóзовého substrátu na produkciu bioplynu. Odborný seminár „Produkcia bioplynu, pyrolýza a splynovanie – efektívny spôsob zhodnotenia biomasy ako obnoviteľného zdroja energie“. Oddelenie enviromentálneho inžinierstva, Ústav chemického a enviromentálneho inžinierstva, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita Bratislava, [online], s. 104 – 107; [cit. 2013-03-19].

dostupné z: <http://kchbi.chtf.stuba.sk/cevoze/doc/pod6/Zbornik%20komplet%20za%20mknuty.pdf#page=105>

Matoušková, P. 2011. Produkce a charakterizace extracelulárních hydroláz z vybraných druhů plísni. Diplomová práce, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta Chemická – Ústav chemie potravin a biotechnologií, [online], 100 s.;

[cit. 2013-02-19].

dostupné z: http://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=37064

Wayne, R. R. 2001. Growing Mushrooms the Easy Way - Home Mushroom Cultivation with Hydrogen Peroxide. Volume I. and II., Revised third edition, California – Berkeley, [online], 65 p.; [cit. 2013-03-12].

dostupné z: <http://jontrot.free.fr/champignons/culture-eau-oxygenee-Vols1-2new.pdf>

Internetové zdroje obrázků:

Pleurotus ostreatus (hlíva ústříčná). [online], použito v literární rešerši, [cit. 2013-04-06]. Dostupné z:

http://www.terezia.eu/cz/produkt/hliva_ustricna_v_kapslich

Pleurotus ostreatus (hlíva ústříčná). [online], obrázek č. 2 v přílohách, [cit. 2013-04-06]. Dostupné z: <http://www.biolib.cz/cz/image/id107293/>

Trametes versicolor (outkovka pestrá). [online], použito v literární rešerši, [cit. 2013-04-06]. Dostupné z: <http://www.houbareni.cz/disc.php?start=830>

Trametes versicolor (outkovka pestrá). [online], obrázek č. 1 v přílohách, [cit. 2013-04-06]. Dostupné z: <http://www.houbareni.cz/houba.php?id=148>

9 Přílohy

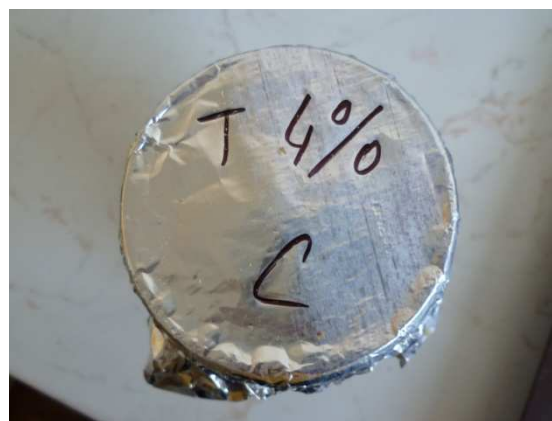
Příloha č. 1: Fotodokumentace



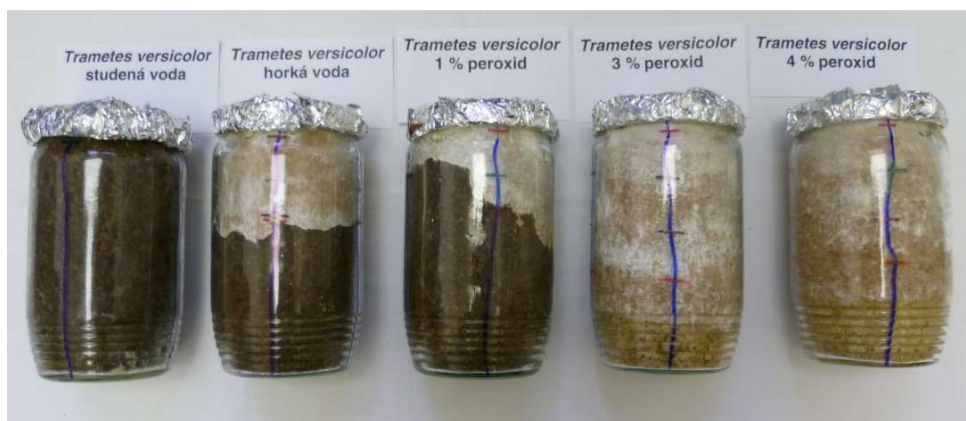
Obrázek č. 1: *Trametes Versicolor* (outkovka pestrá); zdroj: <http://www.houbareni.cz/houba.php?id=148>



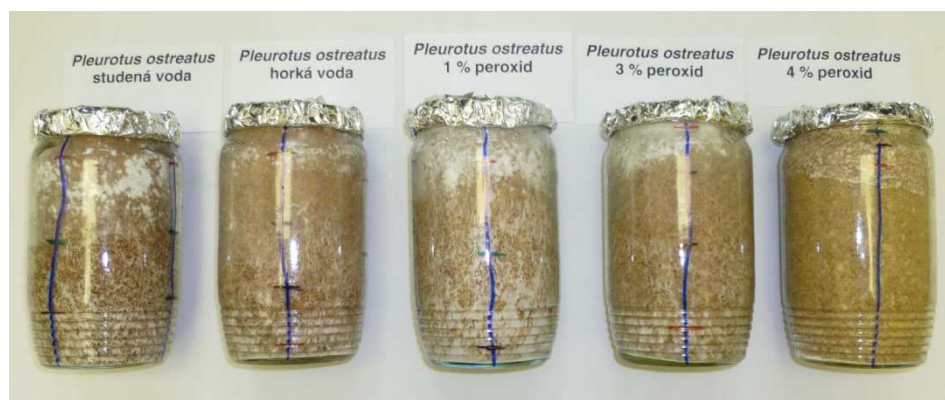
Obrázek č. 2: *Pleurotus ostreatus* (hlíva ústříčná); zdroj: <http://www.biolib.cz/cz/image/id107293/>



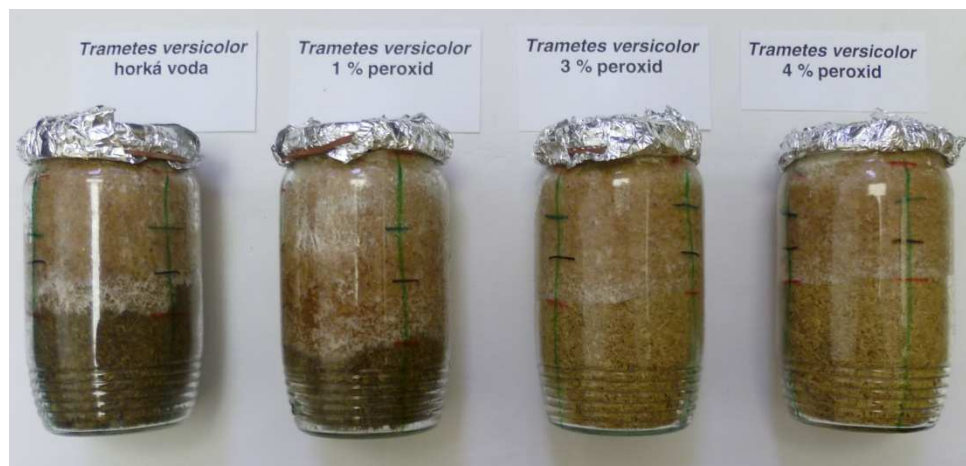
Obrázek č. 3 a 4: Příklady označování sklenic jednotlivých variant.



Obrázek č. 5: Substrát prorostlý myceliem *Trametes versicolor* po skončení pokusu č. 2.



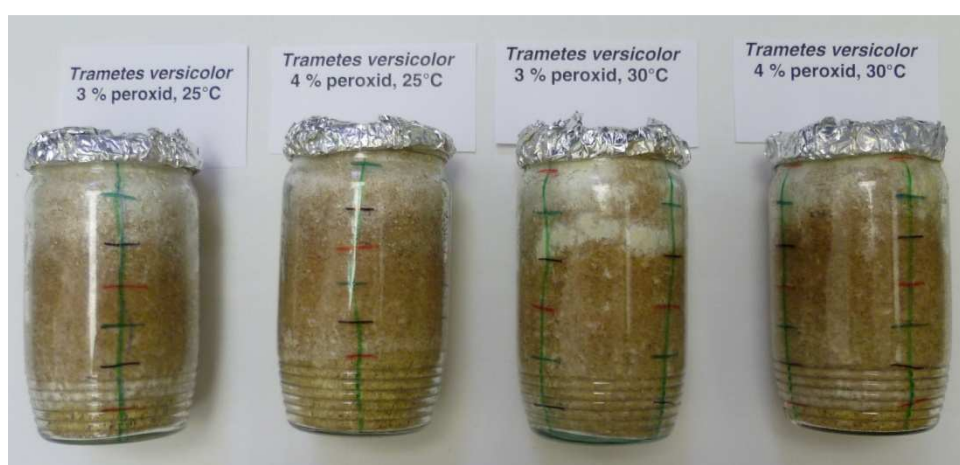
Obrázek č. 6: Substrát prorostlý myceliem *Pleurotus ostreatus* po skončení pokusu č. 2.



Obrázek č. 7: Substrát prorostlý myceliem *Trametes versicolor* po skončení pokusu č. 4.



Obrázek č. 8: Substrát prorostlý myceliem *Pleurotus ostreatus* po skončení pokusu č. 4.



Obrázek č. 9: Substrát prorostlý myceliem *Trametes versicolor* po skončení pokusu č. 3.



Obrázek č. 10: Nesterilní substrát prorostlý myceliem *Trametes versicolor* a *Pleurotus ostreatus* po skončení pokusu č. 6.



Obrázek č. 11: Sterilní substrát prorostlý myceliem *Trametes versicolor* a *Pleurotus ostreatus* po skončení pokusu č. 6.



Obrázek č. 12: Sterilní substrát ošetřený destilovanou vodou a prorostlý myceliem *T. versicolor* a *P. ostreatus* po skončení pokusu č. 6.



Obrázek č. 13: Sterilní a nesterilní substrát ošetřený 1% roztokem H_2O_2 a prorostlý myceliem *T. versicolor* a *P. ostreatus* po skončení pokusu č. 6.



Obrázek č. 14: Sterilní a nesterilní substrát ošetřený 3% roztokem H_2O_2 a prorostlý myceliem *T. versicolor* a *P. ostreatus* po skončení pokusu č. 6.



Obrázek č. 15: Sterilní a nesterilní substrát ošetřený 4% roztokem H_2O_2 a prorostlý myceliem *T. versicolor* a *P. ostreatus* po skončení pokusu č. 6.



Obrázek č. 16: Primordia outkovky pestré po 21. dnech v podmínkách pro fruktifikaci.



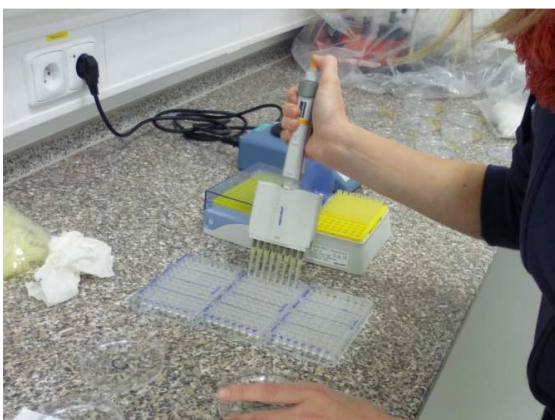
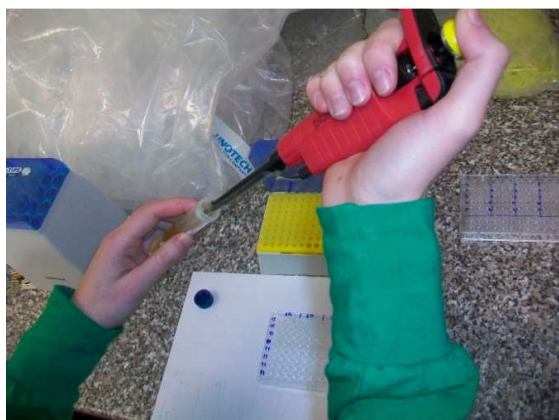
Obrázek č. 17: Detail primordia outkovky pestré.



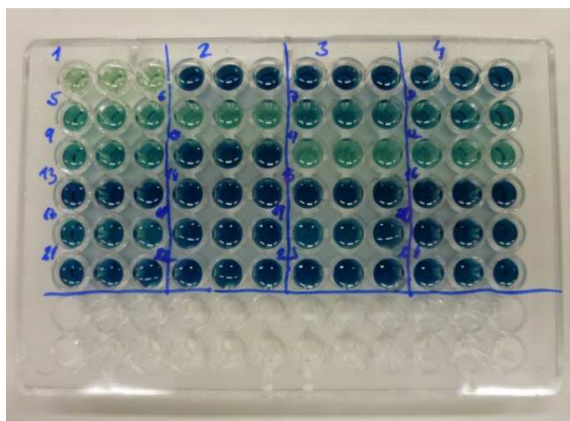
Obrázek č. 18: Uložení 1,5 kilogramových bloků v podmínkách pro fruktifikaci v klimatizovaném boxu.



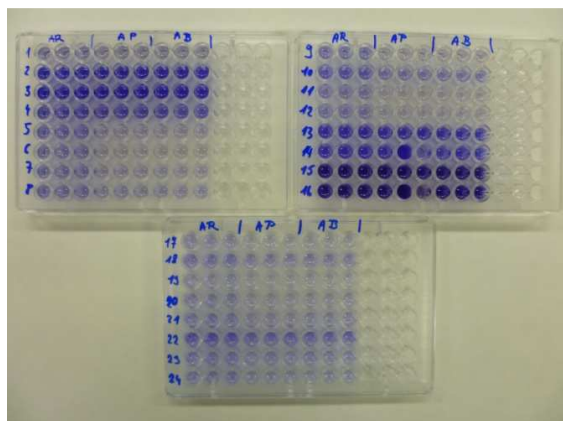
Obrázek č. 19: Vzorke pro stanovení enzymatické aktivity (v pozadí třepačka).



Obrázek č. 20 a 21: Příklady použití jednoránkových i vícekanálových automatických pipet.



Obrázek č. 22: Příklad zbarvení vzorků při měření enzymatické aktivity lakázy.



Obrázek č. 23: Příklad zbarvení vzorků při měření enzymatické aktivity Mn-dependentní peroxidázy.

Příloha č. 2:

Tabulky s přírůstků mycelia v 7 - 8 denních intervalech -> pokus č. 1

založeno 19. 4. 2011, ukončeno 17. 5. 2011

<i>T. versicolor</i>		studená voda															
Den	a					b					c				Ø	x	
8	0	21	35	0	14	0	0	0	0	0	22	30	0	0	13	9	9
14	22	23	42	35	30,5	0	0	0	0	0	35	30	0	0	16,3	15,58	16
21	23	23	43	41	32,5	0	28	0	0	7	37	30	0	0	16,8	18,75	19
28	23	23	43	41	32,5	0	28	0	0	7	37	30	0	0	16,8	18,75	19
kontaminace					kontaminace					kontaminace							

<i>T. versicolor</i>		horká voda															
Den	a					b					c				Ø	x	
8	16	0	0	35	12,8	20	25	3	15	15,8	0	0	15	0	3,75	10,75	11
14	32	15	20	56	30,8	39	43	37	42	40,3	31	22	28	41	30,5	33,83	34
21	46	32	53	67	49,5	50	45	61	56	53	44	36	45	57	45,5	49,33	49
28	46	32	53	67	49,5	50	45	61	56	53	44	36	45	57	45,5	49,33	49

<i>T. versicolor</i>		1% peroxid															
Den	a					b					c				Ø	x	
8	0	20	25	0	11,3	13	39	30	27	27,3	32	28	33	25	29,5	22,67	23
14	0	20	25	0	11,3	34	63	54	48	49,8	36	37	45	36	38,5	33,17	33
21	0	20	25	0	11,3	68	83	74	68	73,3	40	54	59	50	50,8	45,08	45
28	0	20	25	0	11,3	68	83	74	68	73,3	40	54	59	50	50,8	45,08	45
kontaminace																	

T. versicolor		3% peroxid															
Den	a					b					c				Ø	x	
8	21	32	27	27	26,8	26	21	29	37	28,3	15	28	27	0	17,5	24,17	24
14	33	58	58	55	51	50	50	51	55	51,5	15	28	27	0	17,5	40	40
21	81	84	88	85	84,5	78	76	79	81	78,5	15	28	33	0	19	60,67	61
28	118	116	120	118	118	106	105	106	109	107	15	28	33	0	19	81,17	81
kontaminace																	

T. versicolor		4% peroxid															
Den	a					b					c				Ø	x	
8	28	18	20	32	24,5	30	20	25	30	26,3	27	28	23	27	26,3	25,67	26
14	53	46	46	51	49	52	44	50	51	49,3	49	50	48	49	49	49,08	49
21	80	70	70	73	73,3	75	67	71	74	71,8	72	71	70	72	71,3	72,08	72
28	106	85	96	100	96,8	103	93	96	100	98	94	95	95	95	94,8	96,5	97

P. ostreatus A35		studená voda															
Den	a					b					c				Ø	x	
8	50	50	44	51	48,8	40	43	48	46	44,3	48	53	56	47	51	48	48
14	86	90	81	90	86,8	73	75	83	80	77,8	85	88	90	82	86,3	83,58	84
21	129	131	123	133	129	110	112	127	128	119	128	127	130	126	128	125,3	125
28	145	145	145	145	145	145	145	145	145	145	145	145	145	145	145	145	145

P. ostreatus A35		horká voda															
Den	a					b					c				Ø	x	
8	59	55	58	60	58	52	50	54	51	51,8	50	49	48	54	50,3	53,33	53
14	86	94	91	97	92	89	88	94	90	90,3	88	88	83	88	86,8	89,67	90
21	141	134	132	136	136	132	130	138	135	134	128	128	126	124	127	132	132
28	145	145	145	145	145	145	145	145	145	145	145	145	145	145	145	145	145

P. ostreatus A35						1% peroxid											
Den	a					b					c					Ø	x
8	42	42	46	43	43,3	45	44	49	48	46,5	42	40	40	41	40,8	43,5	44
14	78	72	73	82	76,3	71	70	75	73	72,3	60	60	65	65	62,5	70,33	70
21	120	113	100	121	114	101	102	105	102	103	77	79	82	83	80,3	98,75	99
28	145	145	145	145	145	134	143	140	137	139	116	117	107	102	111	131,3	131

P. ostreatus A35						3% peroxid											
Den	a					b					c					Ø	x
8	21	22	27	26	24	24	18	0	20	15,5	25	22	30	33	27,5	22,33	22
14	39	41	43	41	41	43	41	33	43	40	59	51	50	64	56	45,67	46
21	57	56	61	58	58	62	62	63	74	65,3	92	84	77	92	86,3	69,83	70
28	75	75	81	79	77,5	100	81	100	104	96,3	122	117	110	121	118	97,08	97

P. ostreatus A35						4% peroxid											
Den	a					b					c					Ø	x
8	18	20	20	18	19	28	27	0	0	13,8	16	13	20	0	12,3	15	15
14	54	54	55	57	55	38	41	27	28	33,5	55	40	42	42	44,8	44,42	44
21	80	79	77	80	79	47	57	43	46	48,3	80	70	69	70	72,3	66,5	67
28	107	102	100	105	104	66	71	61	63	65,3	102	92	95	85	93,5	87,42	87

Příloha č. 3: **Tabulky s přírůstků mycelia v 6 - 7 denních intervalech -> pokus č. 2**

založeno 5. 8. 2011, ukončeno 1. 9. 2011, 25 °C při měření výsledků

T. versicolor																						
studená voda																						
Den	a					b					c					d					Ø	x
6	17	15	0	0	8	9	12	0	0	5,25	14	12	0	0	6,5	19	0	0	0	4,75	6,125	6
13	23	18	0	0	10,3	10	13	0	0	5,75	17	14	0	0	7,75	21	0	0	0	5,25	7,25	7
20	23	18	0	0	10,3	10	13	0	0	5,75	19	16	0	0	8,75	22	0	0	0	5,5	7,563	8
27	23	18	0	0	10,3	10	13	0	0	5,75	19	16	0	0	8,75	22	0	0	0	5,5	7,563	8
Kontaminace					Vyhozeno 25.8.					Kontaminace					Kontaminace							

T. versicolor																						
horká voda																						
Den	a					b					c					d					Ø	x
6	25	16	26	28	23,8	22	16	17	30	21,3	23	20	21	20	21	20	15	19	19	18,3	21,06	21
13	50	44	57	53	51	41	50	46	41	44,5	35	33	44	47	39,8	45	47	50	31	43,3	44,63	45
20	66	64	72	70	68	65	73	72	62	68	36	50	53	72	52,8	63	66	72	73	68,5	64,31	64
27	66	69	73	75	70,8	65	75	74	62	69	36	50	53	72	52,8	66	66	76	75	70,8	65,81	66

T. versicolor																						
1% peroxid																						
Den	a					b					c					d					Ø	x
6	18	17	18	15	17	25	25	22	29	25,3	26	19	11	0	14	0	0	17	12	7,25	15,88	16
13	47	33	43	34	39,3	30	27	26	31	28,5	31	30	22	0	20,8	0	39	42	42	30,8	29,81	30
20	50	34	47	36	41,8	30	27	26	31	28,5	31	30	22	0	20,8	70	40	59	67	59	25,19	25
27	50	34	47	36	41,8	30	27	26	31	28,5	31	30	22	0	20,8	70	40	59	67	59	56,25	56
Kontaminace					Vyhozeno 25.8.					Vyhozeno 25.8.					Kontaminace							

P. ostreatus A35		1% peroxid																				
Den	a					b					c					d					Ø	x
6	31	32	38	32	33,3	41	39	39	38	39,3	36	38	36	25	33,8	46	40	31	37	38,5	36,19	36
13	74	75	86	78	78,3	90	81	81	76	82	84	91	81	69	81,3	92	83	74	88	84,3	81,44	81
20	122	107	132	122	121	132	123	122	113	123	127	136	128	112	126	139	119	120	139	129	124,6	125
27	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	133	146	150	150	150	150	150	148,9	149
Kontaminace																						

P. ostreatus A35		3% peroxid																				
Den	a					b					c					d					Ø	x
6	12	9	6	12	9,75	0	0	0	15	3,75	0	15	16	0	7,75	4	15	12	0	7,75	7,25	7
13	23	42	39	21	31,3	17	35	22	41	28,8	21	48	50	20	34,8	16	20	18	11	16,3	27,75	28
20	64	92	92	66	78,5	59	74	62	61	64	75	88	94	69	81,5	22	25	29	20	24	62	62
27	111	143	144	114	128	100	113	111	126	113	119	134	139	113	126	48	33	43	28	38	101,2	101
Kontaminace																						

P. ostreatus A35		4% peroxid																				
Den	a					b					c					d					Ø	x
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	3	0	0	0	0	0	0,75	1
13	17	0	18	13	12	7	0	0	7	3,5	16	18	0	0	8,5	16	13	0	13	10,5	8,625	9
20	28	24	24	27	25,8	15	14	14	17	15	25	30	0	12	16,8	21	17	0	18	14	17,88	18
27	41	37	38	41	39,3	25	25	22	24	24	36	41	16	20	28,3	33	32	18	31	28,5	30	30

Příloha č. 4: **Tabulky s přírůstků mycelia v 7 denních intervalech -> pokus č. 3**

založeno 14. 9. 2011, ukončeno 31. 10. 2011, 25 °C a 30 °C při měření výsledků

T. versicolor		3% peroxid, 25°C																				
Den	a					b					c					d				Ø	x	
7	20	12	13	17	15,5	11	15	16	10	13	0	15	15	12	10,5	18	6	14	19	14,3	13,3	13
14	36	34	27	34	32,8	29	32	34	30	31,3	23	30	29	30	28	36	29	32	36	33,3	31,3	31
21	55	54	49	53	52,8	53	55	55	53	54	50	51	51	51	50,8	57	50	54	57	54,5	53,0	53
28	74	74	70	72	72,5	73	74	74	75	74	70	71	70	70	70,3	77	73	73	77	75	72,9	73
35	92	92	91	88	90,8	92	93	93	93	92,8	88	89	88	89	88,5	98	92	94	96	95	91,8	92
42	109	110	107	107	108	112	112	112	111	112	107	107	107	108	107	118	113	111	117	115	110,5	111
48	127	128	128	127	128	133	134	133	135	134	124	124	126	124	125	139	132	131	138	135	130,2	130

T. versicolor		4% peroxid, 25°C																				
Den	a					b					c					d				Ø	x	
7	14	0	16	15	11,3	12	12	12	0	9	11	16	15	17	14,8	11	0	0	16	6,75	10,4	10
14	32	29	31	30	30,5	26	26	26	22	25	27	31	31	32	30,3	27	19	21	30	24,3	27,5	28
21	51	49	51	51	50,5	46	48	48	45	46,8	48	51	52	52	50,8	47	41	42	49	44,8	48,2	48
28	70	66	67	70	68,3	66	67	67	60	65	67	68	71	71	69,3	66	59	60	67	63	66,4	66
35	89	85	86	88	87	82	83	85	79	82,3	85	86	86	89	86,5	82	76	76	82	79	83,7	84
42	112	106	109	113	110	101	101	102	98	101	102	103	105	106	104	100	95	92	99	96,5	102,8	103
48	134	133	138	136	135	117	117	118	114	117	120	124	123	124	123	117	111	109	116	113	121,9	122

T. versicolor		3% peroxid, 30°C																					
Den	a					b					c					d					Ø	x	
7	19	10	15	14	14,5	12	15	17	22	16,5	20	14	21	0	13,8	13	18	0	20	12,8	14,4	14	
14	40	36	36	35	36,8	34	35	40	42	37,8	31	35	44	34	36	35	41	32	42	37,5	37,0	37	
21	62	61	60	59	60,5	59	58	64	65	61,5	64	63	67	62	64	58	65	60	65	62	62,0	62	
28	85	85	84	83	84,3	81	83	87	86	84,3	87	85	90	84	86,5	80	91	86	90	86,8	85,4	85	
35	110	108	108	106	108	104	106	111	111	108	108	108	113	107	109	104	111	108	116	110	108,7	109	
42	133	130	130	133	132	129	130	135	136	133	133	133	138	130	134	127	132	127	133	130	131,8	132	
48	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	145	150	150	150	149	149,7	150	

T. versicolor		4% peroxid, 30°C																					
Den	a					b					c					d					Ø	x	
7	13	16	13	13	13,8	14	16	14	17	15,3	10	17	16	16	14,8	13	17	15	13	14,5	14,6	15	
14	34	33	30	34	32,8	35	38	34	36	35,8	32	36	35	35	34,5	31	35	36	31	33,3	34,1	34	
21	55	55	56	55	55,3	57	58	57	57	57,3	55	57	54	57	55,8	54	57	58	54	55,8	56,0	56	
28	78	76	78	78	77,5	79	78	80	79	79	75	78	76	77	76,5	66	77	79	76	74,5	76,9	77	
35	100	99	101	101	100	100	99	98	101	99,5	96	98	95	97	96,5	98	99	97	96	97,5	98,4	98	
42	124	123	123	124	124	122	123	120	124	122	116	116	115	113	115	118	122	120	117	119	120,0	120	
48	148	144	143	144	145	146	145	143	146	145	136	137	133	131	134	136	142	141	138	139	140,8	141	

Příloha č. 5:

Tabulky s přírůstků mycelia v 7 denních intervalech -> pokus č. 4

založeno 4. 10. 2011, ukončeno 31. 10. 2011, 24 °C při měření výsledků

T. versicolor		horká voda															
Den	a					b					c					Ø	x
7	26	26	25	21	24,5	28	31	29	14	25,5	24	18	31	26	24,8	24,9	25
14	50	47	48	48	48,3	55	53	56	47	52,8	52	45	60	53	52,5	51,2	51
21	68	68	66	69	67,8	79	76	82	73	77,5	74	66	75	66	70,3	71,8	72
27	74	78	71	77	75	99	98	96	95	97	95	89	103	93	95	89,0	89

T. versicolor		1% peroxid															
Den	a					b					c					Ø	x
7	16	20	21	26	20,8	30	15	32	22	24,8	0	25	13	34	18	21,2	21
14	45	45	47	57	48,5	59	52	58	53	55,5	42	47	43	48	45	49,7	50
21	70	70	73	78	72,8	84	77	85	77	80,8	63	68	63	48	60,5	71,3	71
27	90	89	87	98	91	107	107	114	99	107	80	85	72	48	71,3	89,7	90

Kontaminace

T. versicolor		3% peroxid															
Den	a					b					c					Ø	x
7	34	20	21	21	24	27	21	17	26	22,8	19	21	23	21	21	22,6	23
14	54	42	43	45	46	51	45	40	52	47	41	44	46	44	43,8	45,6	46
21	72	61	61	65	64,8	72	64	62	72	67,5	62	66	66	65	64,8	65,7	66
27	87	77	78	80	80,5	90	86	81	94	87,8	80	85	85	82	83	83,8	84

T. versicolor		4% peroxid																
Den	a					b					c					Ø	x	
7	20	18	0	22	15	18	23	21	18	20	24	22	17	38	25,3	20,1	20	
14	38	40	35	37	37,5	36	38	42	36	38	44	42	35	40	40,3	38,6	39	
21	55	57	53	55	55	54	56	60	56	56,5	53	59	56	58	56,5	56,0	56	
27	70	74	72	70	71,5	70	72	77	74	73,3	81	78	73	76	77	73,9	74	

P. ostreatus A35		horká voda																
Den	a					b					c					Ø	x	
7	21	18	34	21	23,5	18	21	22	35	24	31	45	34	30	35	27,5	28	
14	58	47	58	52	53,8	49	37	60	76	55,5	69	88	70	64	72,8	60,7	61	
21	105	103	102	97	102	90	77	102	117	96,5	115	136	121	116	122	106,8	107	
27	150	150	142	142	146	150	123	150	150	143	150	150	150	150	150	146,4	146	

P. ostreatus A35		1% peroxid																	
Den	a					b					c					Ø	x		
7	23	25	22	19	22,3	19	21	0	27	16,8	0	0	35	16	12,8	17,3	17		
14	40	41	42	34	39,3	34	46	21	45	36,5	0	0	35	16	12,8	29,5	30		
21	75	76	71	63	71,3	55	73	53	45	56,5	0	0	35	16	12,8	46,8	47		
27	110	110	105	105	108	70	73	93	45	70,3	0	0	35	16	12,8	63,5	64		
Kontaminace										Kontaminace									

P. ostreatus A35		3% peroxid																
Den	a					b					c					Ø	x	
7	7	13	0	0	5	0	14	0	12	6,5	13	14	6	0	8,25	6,6	7	
14	19	23	20	0	15,5	13	17	17	12	14,8	24	26	6	18	18,5	16,3	16	
21	43	45	45	24	39,3	13	22	46	37	29,5	49	55	25	47	44	37,5	38	
27	63	74	69	65	67,8	64	63	70	61	64,5	70	77	71	70	72	68,1	68	

P. ostreatus A35					4% peroxid												
Den	a					b					c					Ø	x
7	0	0	15	0	3,75	0	0	12	7	4,75	15	14	13	16	14,5	7,7	8
14	13	23	20	16	18	0	0	18	7	6,25	23	20	19	28	22,5	15,6	16
21	20	39	48	43	37,5	0	18	31	26	18,8	38	33	34	37	35,5	30,6	31
27	60	60	69	64	63,3	48	52	60	57	54,3	48	45	45	48	46,5	54,7	55

Příloha č. 6:

Tabulky s přírůstků mycelia v 7 - 8 denních intervalech -> pokus č. 6

založeno 12. 6. 2012, ukončeno 11. 7. 2012, 24 °C při měření výsledků

<i>T. versicolor</i>		destilovaná voda + sterilní pelety															
Den	a					b					c					Ø	x
8	17	27	15	35	23,5	22	27	29	30	27	30	29	20	15	23,5	24,67	25
15	51	40	52	56	49,8	50	51	56	57	53,5	55	53	53	50	52,8	52	52
22	58	55	61	66	60	74	78	78	81	77,8	83	85	78	82	82	73,25	73
29	69	66	67	78	70	103	103	107	115	107	110	116	107	105	110	95,5	96

<i>T. versicolor</i>		1% peroxid + sterilní pelety															
Den	a					b					c					Ø	x
8	36	35	35	38	36	34	31	34	36	33,8	38	38	39	31	36,5	35,42	35
15	68	64	64	66	65,5	63	60	65	67	63,8	67	68	69	65	67,3	65,5	66
22	106	99	100	100	101	85	89	96	96	91,5	103	100	101	101	101	98	98
29	142	137	140	134	138	129	125	132	130	129	132	132	142	134	135	134,1	134

<i>T. versicolor</i>		1% peroxid															
Den	a					b					c					Ø	x
8	32	29	27	34	30,5	24	20	32	21	24,3	29	26	31	28	28,5	27,75	28
15	56	52	57	62	56,8	51	46	55	52	51	39	49	51	48	46,8	51,5	52
22	90	83	83	100	89	80	79	87	79	81,3	81	85	81	82	82,3	84,17	84
29	115	100	91	117	106	104	103	113	105	106	91	109	106	107	103	105,1	105

T. versicolor		3% peroxid + sterilní pelety															
Den	a					b					c					Ø	x
8	26	20	20	26	23	21	20	24	17	20,5	19	22	21	22	21	21,5	22
15	50	44	46	49	47,3	43	43	46	41	43,3	42	44	44	45	43,8	44,75	45
22	78	70	75	78	75,3	68	68	70	69	68,8	67	69	67	68	67,8	70,58	71
29	104	97	100	102	101	93	92	95	96	94	91	92	92	92	91,8	95,5	96
T. versicolor																	
T. versicolor		3% peroxid															
Den	a					b					c					Ø	x
8	23	20	23	25	22,8	21	25	19	22	21,8	20	27	26	21	23,5	22,67	23
15	48	48	49	48	48,3	47	49	45	47	47	50	51	50	47	49,5	48,25	48
22	76	74	77	77	76	74	76	74	73	74,3	77	78	80	77	78	76,08	76
29	103	99	105	104	103	97	101	98	97	98,3	100	102	104	100	102	100,8	101
T. versicolor																	
T. versicolor		4% peroxid + sterilní pelety															
Den	a					b					c					Ø	x
8	22	17	14	17	17,5	16	18	17	17	17	18	19	27	16	20	18,17	18
15	41	38	36	38	38,3	41	39	39	37	39	38	39	47	44	42	39,75	40
22	61	60	58	59	59,5	60	63	59	61	60,8	60	60	66	63	62,3	60,83	61
29	82	82	81	80	81,3	82	83	80	82	81,8	80	80	85	85	82,5	81,83	82
T. versicolor																	
T. versicolor		4% peroxid															
Den	a					b					c					Ø	x
8	23	20	20	21	21	22	21	15	16	18,5	18	22	21	19	20	19,83	20
15	29	27	39	41	34	42	42	39	39	40,5	39	43	43	42	41,8	38,75	39
22	29	27	39	41	34	64	65	63	63	63,8	62	65	64	65	64	53,92	54
29	29	27	39	41	34	86	89	87	87	87,3	86	87	85	89	86,8	69,33	69
Kontaminace																	

P. ostreatus A35		destilovaná voda + sterilní pelety															
Den	a					b					c					Ø	x
8	38	42	37	28	36,3	46	43	42	41	43	36	37	39	40	38	39,08	39
15	56	87	82	70	73,8	90	90	81	88	87,3	78	83	80	79	80	80,33	80
22	117	127	124	116	121	138	144	129	143	139	129	122	124	128	126	128,4	128
29	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150

P. ostreatus A35		1% peroxid + sterilní pelety															
Den	a					b					c					Ø	x
8	15	15	5	13	12	17	13	15	24	17,3	18	16	17	17	17	15,42	15
15	37	37	38	39	37,8	40	37	43	41	40,3	39	42	40	42	40,8	39,58	40
22	57	63	62	60	60,5	60	57	60	60	59,3	62	61	55	61	59,8	59,83	60
29	90	90	90	80	87,5	81	86	79	83	82,3	93	81	75	95	86	85,25	85

P. ostreatus A35		1% peroxid															
Den	a					b					c					Ø	x
8	42	36	36	37	37,8	37	36	33	34	35	34	45	42	39	40	37,58	38
15	90	81	78	73	80,5	88	77	78	78	80,3	78	86	81	79	81	80,58	81
22	134	124	124	114	124	133	128	133	123	129	123	129	122	125	125	126	126
29	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150

P. ostreatus A35		3% peroxid + sterilní pelety															
Den	a					b					c					Ø	x
8	10	13	7	6	9	12	12	13	15	13	0	13	12	13	9,5	10,5	11
15	18	22	19	20	19,8	20	20	22	24	21,5	19	20	26	23	22	21,08	21
22	26	32	29	27	28,5	33	31	32	35	32,8	35	34	38	35	35,5	32,25	32
29	41	42	43	40	41,5	45	40	45	48	44,5	47	45	48	51	47,8	44,58	45

P. ostreatus A35		3% peroxid															
Den	a					b					c					Ø	x
8	7	10	14	14	11,3	11	11	14	0	9	15	6	14	12	11,8	10,67	11
15	19	23	28	20	22,5	18	20	20	16	18,5	29	24	24	21	24,5	21,83	22
22	32	35	37	35	34,8	33	33	34	29	32,3	39	40	48	36	40,8	35,92	36
29	49	53	53	49	51	50	49	47	46	48	56	56	54	52	54,5	51,17	51

P. ostreatus A35		4% peroxid + sterilní pelety															
Den	a					b					c					Ø	x
8	0	12	0	12	6	0	0	0	12	3	0	12	12	12	9	6	6
15	17	18	13	16	16	17	0	15	19	12,8	0	16	19	19	13,5	14,08	14
22	24	22	21	21	22	26	20	22	24	23	22	23	28	26	24,8	23,25	23
29	38	38	38	35	37,3	38	35	37	37	36,8	37	35	40	39	37,8	37,25	37

P. ostreatus A35		4% peroxid															
Den	a					b					c					Ø	x
8	11	10	12	12	11,3	6	10	10	12	9,5	10	12	12	6	10	10,25	10
15	17	18	18	18	17,8	18	18	17	20	18,3	19	20	20	18	19,3	18,42	18
22	29	27	30	29	28,8	27	31	28	31	29,3	28	28	29	27	28	28,67	29
29	39	41	42	41	40,8	38	41	38	40	39,3	39	41	41	41	40,5	40,17	40