

Katedra botaniky
Univerzita Karlova v Praze – Přírodovědecká fakulta

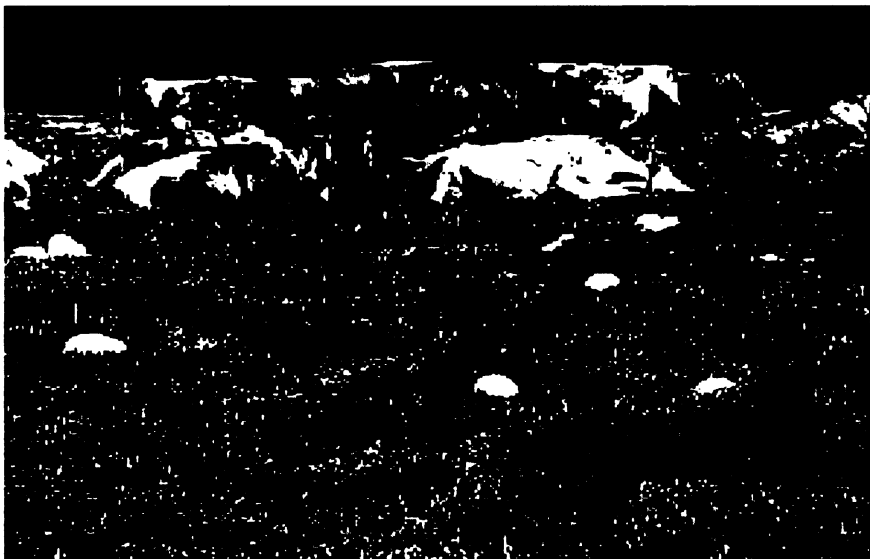
**Kultivační nároky vatovce obrovského *Langermannia gigantea*
(Batsch: Pers.) Rostk.**

Diplomová práce

Jitka Görnerová
2008

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Milan Gryndler, CSc.

Diplomová práce **Jitky Görnerové** byla obhájena na katedře botaniky PŘF UK vPraze dne 23.5.2008 a ohodnocena klasifikačním stupněm **velmi dobře**.



<http://web.guernsey.net/~cdavid/botany/files/calvatia%20gigantea/index.html>

Obr. 1: Plodnice druhu *Langermannia gigantea* rostoucí na pastvinách pro chov skotu.

Prohlašuji, že jsem předkládanou diplomovou práci vypracovala samostatně,
s použitím citované literatury.

Jitka Červená

ABSTRAKT

V rámci diplomové práce jsem se zabývala kultivačními podmínkami vhodnými pro růst houby druhu *Langermannia gigantea* (vatovec obrovský). Součástí experimentální práce bylo studium růstu vatovce na různých substrátech a optimalizace kultivačních podmínek.

Na základě získaných údajů byly zjištěny významné chitinolytické schopnosti, které houbě dávají potenciál využití v biotechnologiích. Byla prokázána glukózová represe chitinázy. Byla dále pozorována interakce mycelia s buněčnými stěnami 3 mikroskopických druhů hub: *Chrysosporium pannorum*, *Cladosporium cladosporioides* a *Aspergillus versicolor*. Důležitým zdrojem živin a energie by pro vatovec mohla být také DNA, která je součástí rostlinného, živočišného a mikrobiálního detritu. Optimální kultivační teplota pro růst je kolem 20-25 °C.

ABSTRACT

In my diploma thesis I was dealing with the cultivation conditions suitable for the growth of *Langermannia gigantea* (giant puffball). Experimental works comprised a study of utilization of different substrates by this fungus and optimization of cultivation conditions.

On the basis of the obtained results, for the first time, the important chitinolytic ability of this fungus was reported. This makes the fungus potentially important for applications in biotechnology. Chitinase production was repressed in the presence of glucose. The ability of giant puffball to associate with cell walls of 3 species of microscopic fungi (*Chrysosporium pannorum*, *Cladosporium cladosporioides* and *Aspergillus versicolor*) was noted. DNA, being found in litter of plant, microbial and animal origin, may represent the important source of mineral nutrients (nitrogen, phosphorus) and energy for giant puffball. The temperature optimum for the growth is in the range of 20-25 °C.

1. PŘEDMLUVA.....	1
2. ÚVOD.....	3
2.1 Taxonomická problematika rodu <i>Langermannia</i> (<i>Agaricomycetidae</i>)	3
2.2 Praktické využití vatovce	4
2.3 Biologie a ekologie druhu	6
2.3.1 Geografický výskyt	6
2.3.2 Morfologie	7
2.3.3 Charakteristika habitatu.....	7
2.3.4 Způsob života	9
2.4 Růst a možnosti kultivace vatovce	10
2.4.1 Klíčení bazidiospor.....	10
2.4.2 Mycelium.....	11
2.4.3 Plodnice	12
2.5 Vztah vatovce a ostatních hub k substrátu	13
2.5.1 Zdroje uhlíku a dusíku.....	14
2.5.2 Využívání polymerních látek	16
2.6 Interakce bazidiomycetů s ostatními organismy	21
2.5.1 Interakce s bakteriemi.....	21
2.5.2 Interakce s bezobratlými.....	23
2.5.3 Interakce s jinými houbami	24
3. MATERIÁL A METODIKA	25
3.1 Materiál.....	25
3.2 Kultivace.....	26
3.3 Zpracování získaných dat	27
3.4 Rozdělení charakteru růstu	28
3.5 Příprava pevného média pro detekci chitinázové aktivity.....	29
3.6 Posouzení kultivačních nároků na umělých živných médiích.....	30
3.6.1 Růst mycelia vatovce na různých zdrojích organického uhlíku.....	30
3.6.2 Růst mycelia na různých koncentracích kyseliny p-hydroxybenzoové	31
3.6.3 Růst mycelia vatovce na různých zdrojích dusíku	31
3.6.4 Růst mycelia vatovce na nitratovém, amonném a organickém dusíku	32
3.6.5 Vliv různých poměrů nitratového a amonného dusíku na růst mycelia	33
3.6.6 Vliv amoniaku na růst mycelia.....	34
3.6.7 Vliv organické a anorganické formy dusíku a fosforu na růst mycelia.....	35
3.6.8 Růst na DNA (vnitrodruhová variabilita).....	35
3.6.9 Růst na chitinu (vnitrodruhová variabilita)	35
3.6.10 Vliv různých poměrů nitratového dusíku a chitinu na represí chitinázy.....	36
3.6.11 Stanovení průběhu degradace chitinu.....	36
3.6.12 Schopnost mycelia využívat látky obsažené v mravencích (zdroj chitinu).....	36
3.6.13 Schopnost mycelia využívat látky obsažené v buněčných stěnách vybraných hub (zdroj chitinu)	37
3.6.14 Pokus o formulaci selektivního média	38
3.6.15 Schopnost mycelia využívat látky obsažené v bakteriích	38
3.7 Optimalizace kultivace	40
3.7.1 Vliv teploty na růst mycelia	40
3.7.3 Vliv aerace na růst mycelia	40

3.7.4 Vliv pH na růst mycelia.....	41
3.8 Možnosti kultivace vatovce na přírodních substrátech <i>in vitro</i>	41
3.8.1 Růst mycelia na odpadních substrátech – čistírenském kalu a pilinách ze železničních pražců.....	41
3.8.2 Růst mycelia v půdě v přítomnosti chitinu (zdroj energie)	41
4. VÝSLEDKY	43
4.1 Rozdělení charakteru růstu	43
4.2 Posouzení kultivačních nároků na umělých živných médiích.....	43
4.2.1 Růst mycelia vatovce na různých zdrojích uhlíku.....	43
4.2.2 Růst mycelia na různých koncentracích kyseliny p-hydroxybenzoové	45
4.2.3 Růst mycelia vatovce na různých zdrojích dusíku	46
4.2.4 Růst mycelia vatovce na nitrátovém, amonném a organickém dusíku	47
4.2.5 Vliv různých poměrů nitrátového a amonného dusíku na růst mycelia	49
4.2.6 Vliv amoniaku na růst mycelia.....	50
4.2.7 Vliv organického a anorganického dusíku a fosforu na růst mycelia.....	52
4.2.8 Růst na DNA (vnitrodruhová variabilita).....	54
4.2.9 Růst na chitinu (vnitrodruhová variabilita)	56
4.2.10 Vliv různých poměrů nitrátového dusíku a chitinu na represi chitinázy	58
4.2.11 Stanovení průběhu degradace chitinu.....	58
4.2.12 Schopnost mycelia využívat látky obsažené v mravencích (zdroj chitinu).....	58
4.2.13 Pokus o formulaci selektivního média	59
4.2.14 Schopnost mycelia využívat látky obsažené v buněčných stěnách vybraných hub (zdroj chitinu)	59
4.2.15 Schopnost mycelia využívat látky obsažené v bakteriích	63
4.3 Optimalizace kultivace	64
4.3.1 Vliv teploty na růst mycelia	64
4.3.2 Vliv aerace na růst mycelia	67
4.3.3 Vliv pH na růst mycelia.....	68
4.4 Možnosti kultivace vatovce na přírodních substrátech <i>in vitro</i>	68
4.4.1 Růst mycelia na odpadních substrátech – čistírenském kalu a pilinách ze železničních pražců	68
4.4.2 Růst mycelia v půdě v přítomnosti chitinu (zdroj energie)	69
5. DISKUZE.....	70
5.1 Posouzení kultivačních nároků na umělých živných médiích.....	70
5.2 Optimalizace kultivace	73
5.3 Možnosti kultivace vatovce na přírodních substrátech <i>in vitro</i>	74
6. ZÁVĚR	75
SUMMARY	76
7. PŘEHLED LITERATURY.....	77

1. PŘEDMLUVA

Cílem mé diplomové práce je zhodnocení možností kultivace vatovce obrovského *Langermannia gigantea* v půdním prostředí, posouzení jeho kultivačních nároků na umělých živných médiích a optimalizace kultivačního média.

Vatovec obrovský je jedlá houba, která tvoří plodnice velkých rozměrů a k jejich stavbě využívá půdní organickou hmotu. Snaha o kultivaci této houby vyplývá z její možné ekonomické důležitosti v mnoha oblastech, např. masivní mycelium by mohlo být používáno jako krmivo pro zvířata, mohlo by nalézt uplatnění ve farmakologickém průmyslu atd. V minulosti byly zjištěny antibiotické účinky houby i její působení proti některým typům nádorového bujení (produkuje mukoprotein kalvacin s protinádorovými účinky). Houba je navíc schopna extracelulárně produkovat řadu enzymů, z nichž některé by mohly nalézt praktické uplatnění. Tato a řada dalších faktů naznačují, že vatovec obrovský, který dnes není v širokém měřítku prakticky využíván, by mohl být člověku v budoucnu velmi užitečný.

Enzymy vylučované houbami jsou důležité pro rozklad organické hmoty. Stanovení produkce enzymů u hub je zdlouhavé, enzymy musí být získány z čisté kultury. Produkce enzymů se zpravidla zjišťuje testováním enzymatické aktivity extraktu z tekuté kultury. Používání pevných médií však dovolilo rychlé prověřování velkého počtu druhů hub na přítomnost či nepřítomnost určitých enzymů, jejichž aktivita se projevuje změnou zákalu. Vhodná umělá média jsou užitečná pro hledání genetických rozdílů ve vlastnostech izolátů a pro různé ekologické studie, kde se srovnávají enzymatické schopnosti hub a dalších mikroorganismů. Právě testování schopností vatovce tvořit enzym chitinázu na pevném médiu je také součástí mé diplomové práce.

Experimentální práce v Mikrobiologickém ústavu AVČR v Krči zahrnovala:

- 1) pokus o formulaci definovaného média pro izolaci a kultivaci houby pomocí testování různých zdrojů dusíku a organického uhlíku.
- 2) optimalizaci vybraného kultivačního systému zjištěním vlivu aerace, odhadem optimální teploty na růst mycelia a srovnáním růstu na pevném a tekutém médiu.
- 3) kultivaci ve sterilní a nesterilní půdě sledováním vlivu vybraných zdrojů dusíku a organického uhlíku na růst mycelia.

Diplomová práce navazuje na mou bakalářskou práci, kde jsem se zabývala ekofyziologií vatovce obrovského. V diplomové práci se mimo jiné snažím o zodpovězení řady otázek, které u vatovce do této doby nebyly studovány, např. přímé trofické interakce

houby s dalšími půdními organismy (bakterie, houby, členovci) nebo zjištění růstu sbírkových izolátů vatovce na dosud netestovaných substrátech (chitin, DNA aj.).

Na tomto místě bych chtěla poděkovat předně mému školiteli Doc. RNDr. Milanu Gryndlerovi CSc. a poté celému týmu laboratoře biologie hub Mikrobiologického ústavu AVČR, zejména Mgr. Lucii Soukupové, Mgr. Marii Havránkové a RNDr. Haně Hršelové CSc. za odbornou pomoc, ochotu a za vytvoření příjemné atmosféry pro moji práci. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Ondřeji Koukolovi Ph.D. za cenné rady při sepisování diplomové práce a samozřejmě mé rodině za podporu a trpělivost po celou dobu mého studia.

2. ÚVOD

2.1 Taxonomická problematika rodu *Langermannia* (Agaricomycetidae)

Vatovec obrovský patří mezi rouškaté stopkovýtrusé houby (*Basidiomycetes*) do podtřídy *Agaricomycetidae*, do řádu *Lycoperdales* a čeledi *Lycoperdaceae*.

Rod *Langermannia* byl Kreiselem zahrnut do rodu *Calvatia* (Kriesel 1992), který je rozčleněn do 8 sekcí. Podle této práce byly pro rod *Langermannia* Fr.1849 (*Lycoperdaceae*) publikovány oblastní revize např. pro Brazílii, Austrálii a Nový Zéland, Jižní Afriku, Střední Evropu, Jižní Ameriku, Kazachstán, Arménii, Čínu a pro arktické oblasti.

Podle Kriesela (1992) je rod *Calvatia* Fr. omezen na druhy s hyfami kapilicia typu *Lycoperdon*, s většími nebo menšími pravidelnými vzdálenostmi mezi pravými septy. Póry, pokud jsou přítomny, jsou kulaté až eliptické, nikdy šterbinovité. Z této definice vyplývá, že *Calvatia* nezahrnuje morfologicky podobné rody: *Calbovista* Morse 1935 (kapilicium typu *Bovista*, s falešnými septy, bez pórů), *Calvatiella* Chow 1936 (kapilicium typu *Bovista*, pórovité), *Hankea* Kriesel 1989 (kapilicium typu *Lycoperdon*, s žádnými nebo falešnými septy, šterbinovitými póry).

Následující synonyma rodu *Calvatia* podle Kriesela (1992) jsou: *Langermannia* Rostk., nomen rejiciendum. Typové druhy: *Lycoperdon giganteum* Batsch 1786: Pers. 1901. *Hippoperdon* Mont. 1842, nomen rejiciendum. Typové druhy: *H. crucibulum* Mont. 1842. *Lanopila* Fr. 1848. Typové druhy: *L. wahlbergii* Fr. 1848. *Lasiophaera* Reichardt 1870. Typové druhy: *L. fenzlii* Reichardt 1870. *Eriosphaera* Reichardt: Toni 1880, non Lessone 1832. Typové druhy: *Lasiophaera fenzlii* Reichardt 1870. *Hypoblema* C.G. Lloyd 1903. Typové druhy: *Lycoperdon lepidophorum* Ell. a Event. 1885. *Pila* Speg. 1921, non Bertrand a Renault 1892. Typové druhy: *Mycenastrum fragile* Lév. 1844. *Gastropila* Homrich & Wright 1973, nom. Nov. Typové druhy: *Mycenastrum fragile* Lév. 1844.

Jméno *Calvatia* je podle Kriesela (1992) nomen conservandum, které je chráněno proti starším synonymům *Langermannia* Rostk. a *Hippoperdon* Mont., ale už ne proti morfologicky podobnému rodu *Lanopila* Fr. 1848, který byl však Kreiselem (1992) odmítnut.

H. Kriesel (1992) seřadil 35 rozpoznávaných taxonů do 8 sekcí následovně: 1. *Calvatia* sekce *Calvatia*, 2. *Calvatia* sekce *Gastropila*, 3. *Calvatia* sekce *Lanopila*, 4. *Calvatia* sekce *Langermannia*, 5. *Calvatia* sekce *Hypoblema* (C.G. Lloyd) Kriesel,

6. *Calvatia* sekce *Hippoperdon* (Mont.) Kreisel, 7. *Calvatia* sekce *Cretacea* Kreisel, 8. *Calvatia* sekce *Sculpta* Kreisel.

V nedávné době byl zkoumán vývoj plodnice včetně gleby několika druhů čeledi *Lycoperdaceae* světelnou mikroskopickou analýzou mikrotomových řezů v různých ontogenetických stádiích (Gube 2007). Gleba druhu *Langermannia gigantea* se vyvíjí unikátním a dosud neznámým způsobem: palisádové struktury utvářející hymenium se vyvíjí na vějířovitých větvích hyf. Proto byl pro *Langermannia gigantea* zaveden termín vějířovitý vývoj gleby. Jiné rody čeledi *Lycoperdaceae*, včetně rodu *Calvatia*, jsou charakterizovány korálovitým a štěrbínovitým vývojem gleby. Vzhledem k charakteristické ontogenezi předpokládá Gube (2007) ponechání rodu *Langermannia* i nadále odděleného od rodu *Calvatia*. Tuto odlišnost vývoje gleby považuji za zásadní. Proto v mé práci používám vědecké jméno *Langermannia gigantea* (Batsch: Pers.) Rostk. jako výraz taxonomické samostatnosti rodu *Langermannia*.

2.2 Praktické využití vatovce

Kusy gleby ze staré plodnice byly od středověku používány na stavění krve jako lokální hemostatikum. Narkotizující a anestetické vlastnosti má údajně i dým vznikající při pálení plodnice. Houba údajně obsahuje látky, pomáhající při kožních chorobách, zánětech a chudokrevnosti (Gryndler os. sdělení).

V 50. a 60. letech 20. století byla intenzivně studována pro svou protinádorovou aktivitu. Především se pracovalo na extrakci protirakovinného mukoproteinu kalvacinu ze zralých plodnic vatovce. Zájem o extrakty hub z odd. Basidiomycota vychází z českého folklóru, který objevil profesor Lucas, když navštívil malou horskou vesnici v Českém lese blízko hranic s Bavorskem v roce 1934. Dřevorubci v této oblasti věřili, že požívání určitých typů hub, např. *Boletus edulis* (Bull.) Fr., předchází rakovině. Později v roce 1948 byl připraven extrakt z této houby, který byl testován u myší. Ukázalo se, že tento extrakt má výrazné účinky inhibující růst nádorů. Později byl tento aktivní materiál určen jako polypeptid, obsahující nejméně 9 známých aminokyselin. Lze jej získat např. srážením pomocí organického rozpouštědla. *Boletus edulis* rostl v kultuře pomalu a tudíž neprodukoval dostatečné množství protirakovinných látek. Tento fakt vedl k hledání jiných, rychleji rostoucích druhů z odd. Basidiomycota. Bylo testováno velké množství extraktů z dalších hub

a bylo zjištěno, že silné protirakovinné účinky má extrakt z nezralé plodnice *Langermannia gigantea*. Přestože díky folkloru byla přisuzována významná protinádorová aktivita i bazidiosporám vatovce, Lucas prokázal jen malé účinky spor ve zralé plodnici. V několika stovkách plodnic vatovce bylo nalezeno různé množství protirakovinně aktivní látky, která byla testována v letech 1954-1958. Produkce inhibitorů rakoviny byla objevena i u dalších druhů: *Calvatia bovista* (Persk.) Kambly & Lee, *Calvatia craniformis* (Schw.) Fr. a *Calvatia cyathiformis* (Bosc.) Morgan.

Biologicky aktivní mukoprotein z *Langermannia gigantea* byl později pojmenován jako kalvacin. Ten byl testován proti velkému množství různých tumorů u zvířat (myši, křečků) a bylo zjištěno, že se jedná o typ látky se širokospektrovou protirakovinnou aktivitou. Při následných toxikologických testech se zjistilo, že kalvacin vyvolává u psů a u makaků alergické reakce (Beneke 1965).

Když se extrakt testoval na lidech a aplikoval se terminálně nemocným, nastávala u nich regrese nádorů. Bohužel lék působil zástavu srdce, snad kvůli doprovodným toxickým látkám, které se hromadí při zrání plodnice (Gryndler os. sdělení).

V 70. a 80. letech byly učiněny pokusy o pěstování tohoto druhu jako potravin a zdroje bílkovin. Tato houba byla také studována pro několik enzymových aktivit. *Langermannia gigantea* produkuje řadu enzymů, které jí umožňují využívat nejrůznější substráty. Produkuje lipázu (Christakopoulos et al. 1992) a je u ní prokázána schopnost degradovat kondenzované taniny a růst například na kyselině galové, 3,4-dihydroxybenzoové, katechinu a kyselině p-hydroxybenzoové (Galitou-Panayotou a Macris 1986, Galitou-Panayotou et al. 1988), což svědčí o přítomnosti fenoloxidáz. Dále byla popsána amylázová aktivita (Kekos, Galitou-Panayotou a Macris 1987, Kekos a Macris 1987b), která není inhibována v přítomnosti vysokých koncentrací taninu (Kekos a Macris 1987a, Komnikos et al. 1988). Je zajímavé, že v této posledně zmiňované práci se v kultuře objevila vyšší amylázová aktivita tehdy, když byl škrob sterilizován teplem, čili vlastně způsobem, jakým se vyrábí ze škrobu dextrin. Později však zájem o vatovce opadá.

Zástupci čeledi *Lycoperdaceae* (včetně *Langermannia gigantea*) mohou být používáni také jako indikátory znečištění prostředí těžkými kovy a pesticidy (Stijve 2007).

Je možné, že další výzkum chemického složení vatovce obrovského a léčivých účinků látek v něm obsažených bude znamenat nemalý přínos pro lékařskou vědu.

2.3 Biologie a ekologie druhu

2.3.1 Geografický výskyt

Vatovec obrovský je rozšířen kosmopolitně (je doložen ze severní Ameriky, Evropy, z temperátních oblastí Asie, jižní Afriky, Austrálie a Nového Zélandu), velkou rozmanitostí lidových názvů oplývá Mexiko (Kreisel 1994). Vatovec, přestože není běžný, se vyskytuje na území celého Maďarska. V oblasti lesních stepí a dubových lesů lze tento druh najít relativně hojně, také se objevuje v habro-dubových lesech a bučinách. Je to druh charakteristický pro hory středních výšek (Rimózci 1987a).

Vatovec obrovský se na území ČR vyskytuje od nížin až po horský vegetační stupeň. Podle údajů z literatury a vlastních sběrů je roztroušen po celém území ČR (Lamačková 2005) viz obr. 2. Největší nalezená plodnice v Liberci v roce 1955 měřila na obvodu 212 cm a vážila 20,8 kg (Pilát 1958).

Obr. 2: Výskyt *Langermannia gigantea* v ČR (Lamačková 2005)



2.3.2 Morfologie

Plodnice dosahuje průměru 15-50 cm, je kulovitá nebo široce elipsovité (na pólech zploštělá), přisednutá k zemi, bez stopky, se substrátem spojená myceliálními provazci. Peridium (obal) je velmi tenký, lámavý, hladký nebo jemně poprášený, zpočátku bílý, stárnutím nabývá nažloutlý, okrový až hnědý odstín a nepravidelně praská. Gleba (teřich) není rozdělena na část sterilní a plodnou, celá je kompaktně vatovitá a je složena z hustě spletených vláken vlášení a bazidiospor. Na vrcholu plodnice nevzniká ústí na uvolňování výtrusů. Vlákná vlášení jsou dlouhá, přehrádkovaná, řídce perforovaná, spoře dichotomicky větvená, přímá až mírně zprohýbaná, tenkostěnná a průhledná. Dužina je bílá, vatovitá s výraznou příjemnou vůní i chutí. Později žlutne až olivově hnědne a mění se na hnědošedý výtrusný prach. Spory mohou mít alergizující účinky podobně jako pylová zrna, ale jsou na rozdíl od nich daleko menší a tím je průnik do dýchacích cest vyšší. Vatovec obrovský je ve světě hub jednou z nejvýkonnějších „továren“ na spory (Pilát 1958).

2.3.3 Charakteristika habitatu

Vatovec roste po vydatných deštích na loukách, pasekách, zahradách, mezi trávou v parcích, i v hrabance humózních listnatých hájů převážně ve skupinách (Pilát 1958). Ovšem nejčastěji se objevuje na sekundárních ekotopech, seminaturálních a především pseudo-naturálních stanovištích lesostepí a bučin. Objevuje se na území pod stálým vlivem člověka např. na obdělávaných půdách a následuje jejich rozšiřování (Rimózcí 1987a). Také se často nachází na půdách po opuštěných chovech dobytka, blízko hromad hnoje či na vinicích (Nehez 1985). Jeho spontánní výskyt v obdělávaných vinicích a ovocných sadech dává určitou možnost pro jeho kultivaci (Rimózcí a Geml 1999).

Vyskytuje se na všech půdách kromě bazických (Rimózcí 1987a). Dává přednost dobře vyhnojeným půdám (Rimózcí 1985) s vysokým obsahem dusíku (Pilát 1958, Nehez 1985) pod akátem, bezem a kopřivami. Nároky na půdu byly studovány Rimózcím (Rimózcí 1985), který se snažil o umělou kultivaci houby. Na 53 nalezištích prováděl chemickou analýzu stromového opadu a půdy v hloubce 5, 10 a 20 cm. Zjistil, že jde o acidofilní až subacidofilní druh (s optimem pH 5,7-5,9), který dává přednost tvrdým půdám. Ve všech případech bylo zjištěno, že půda na nalezišti byla bohatá na humusem vázaný amonný (průměrně 62 mg/kg) a nitrátový (122 mg/kg) dusík, fosfor (493 mg/kg), draslík (394 mg/kg) a mikroprvky (7,23 mg/kg Cu, 16,9 mg/kg Zn). Množství těchto minerálů bylo přímo na nalezišti vždy významně vyšší, než ve vzdálenosti 15 a 25 metrů od něj. Naopak,

na nalezištích byl pozorován snížený obsah hořčíku (průměrně 288 mg/kg) a manganu (127 mg/kg). Průměrný obsah humusu činil 5,65 %. Výsledky ukazují vysokou toleranci druhu pro půdy různého složení i když Rimózci (1987a) konstatuje, že jeho výskyt závisí zejména na půdních faktorech a klimatické faktory jsou méně důležité.

Rimózci (1987a) uvádí, že rostlinná společenstva, v nichž se vatovec vyskytuje, odpovídají vysokému obsahu živin v půdě. Mnohotvárnost životních forem zjištěných na studovaných stanovištích ukázala na různorodost stanovišť vatovce, což vylučuje možnost jeho úzce specifického mykorhizního spojení se stromy a vytrvalými bylinami. Rostlinná společenstva byla studována ve čtvercích o rozměrech 10x10 m, v jejichž středu se nacházela plodnice. Tímto způsobem nebyl zjištěn žádný rostlinný druh konstantně se vyskytující současně se sledovanou houbou. Vatovec se často nachází v přítomnosti těchto doprovodných rostlinných druhů: kopřivy dvoudomé (*Urtica dioica*) trnovníku akátu (*Robinia pseudoacacia*), bezu černého (*Sambucus nigra*), kuklíku městského (*Geum urbanum*), svízele přítuly (*Galium aparine*), měrnice černé (*Ballota nigra*) a smetanky lékařské (*Taraxacum officinale*). Podle této studie je z fytoecologického hlediska vatovec obrovským charakteristickým druhem pro asociace *Quercus-Fagea*, *Molinio-Arrhenathera*, *Chenopodio-Sclerantha* a antropogenní lesy, zejména *Bromo sterili-Robinetum*.

Rimózci a Geml (1999) zkoumali po dobu 10 let více než 81 stanovišť vatovce a zjistili, že výskyt tohoto druhu není těsně vázán na žádný typ vegetace, a proto by jeho případná rozsáhlá kultivace nebyla vázána na určitý typ krajiny. V počátečních fázích fruktifikace potřebuje úplné zastínění, a i později zůstává stínomilný, přestože toleruje silné osvětlení (Rimózci a Geml 1999, Rimózci 1987a).

Z hlediska vlhkostních nároků je to mezofilní druh, který má xerofilní charakter při růstu plodnic (Rimózci 1987b) a preferuje středně vlhké půdy (Rimózci 1987a). V Dánsku bylo pozorováno, že ke spuštění tvorby plodnic vatovce obrovského je třeba, aby v období od dubna do srpna spadlo nejméně 150 mm srážek (Sorensen a Thorbek 1980). Podle údajů z Maďarska (Rimózci 1987b) potřebuje k tvorbě plodnic vatovec v průběhu 2 měsíců minimálně 40-50 mm srážek ve 30 dávkách, nejlépe ve 2 vlnách. Optimální srážkový úhrn pro tuto dobu je však 150 až 200 mm. Dvou- až třítydenní sucho nevádí, houba je dobře snáší i když zasahuje do hloubky 20-25 cm. Vydrží 5 až 6 týdnů bez poškození, pokud má alespoň minimální dávku vody. Plodnice se objevily 9 až 13 dnů po dešti, při němž spadlo 24-74 mm vody. Houba velmi dobře snáší velké kolísání teploty. Vatovec obrovský má vytrvalé mycelium, které přežívá do další vegetační sezóny. Teplota půdy v myceliální zóně (hloubka

10-20 cm) byla asi 18,5 °C a byla stabilnější než teplota vzduchu. V říjnu tato teplota klesla na 12,5 °C.

2.3.4 Způsob života

Vatovec obrovský je všeobecně považován za typickou saprotrofytickou houbu a i když je případná fakultativní mykorhiza nepravděpodobná (Rimózczi 1987a), některé její blízkce příbuzné houby jsou domněle schopny žít v mykorhizní symbióze s kořeny dřevin, nebo se alespoň vyskytovat v blízkosti jejich kořenů. Jsou to *Calvatia bovista* na *Picea abies* a *Pinus strobus* (McArdle 1932), *Calvatia bovista* na *Pinus silvestris* (Dominik 1961) a *Lycoperdon perlatum/gammatum* na *Quercus spp.* (Klyushnik 1951), na *Picea abies* a *Pinus strobus* (McArdle 1932), a na *Pinus nigra*, *Eucalyptus spp.* a *Pseudotsuga menziensii* (Rawlings 1951). Proto byl učiněn pokus o vytvoření mykorhizního vztahu mezi vatovcem obrovským a borovicí *Pinus resinosa* (Richter a Bruhn 1989) ve sterilních podmínkách na směsi rašeliny a vermikulitu, který nebyl úspěšný. I když se tvorba mykorhiz neprokázala a i svou enzymovou výbavou se vatovec obrovský podobá spíše saprofytům, nelze tento neúspěch považovat za potvrzení plně saprotrofytického způsobu života houby, neboť tvorba mykorhiz po inokulaci evidentně mykorhizními houbami za kontrolovaných podmínek často selhává.

Vztah vatovce obrovského k živým rostlinám naznačuje i to, že na Novém Zélandu je považován za kořenového parazita některých trav (snad dokonce i na golfových hřištích): jílku vytrvalého - *Lolium perenne*, kostřavy načernalé - *Festuca nigrescens* (Arnold a Brien 1961) a psinečku rozkladitého - *Agrostis capillaris* (Arnold a Brien 1960).

Vatovec tvoří také tzv. čarodějné kruhy (Sorensen a Thorbek 1980). To znamená, že se jeho plodnice nacházejí v časech se zvětšujícími kruhy, jejichž poloměr roste rychlostí asi 90 cm za rok. Ačkoli se těmto kruhům říká čarodějné, jsou ve skutečnosti přirozeným výsledkem způsobu, jakým se mycelium houby v půdě šíří. Počátkem každého kruhu je pravděpodobně jediná bazidiospora, která přistane v trávě a vyklíčí. Bazidiospora vytvoří myceliální síť, která prorůstá půdou do okolí. Když nejstarší části mycelia ve středu vyčerpají dostupné živiny, odumřou. Plodnice se pak tvoří po okrajích stále se rozrůstajícího mycelia, a tak vytvářejí kruh. Může mít v průměru více než 30 metrů, ale v té době jeho stáří už dosahuje i několika desetiletí (http://archiv.neviditelnypes.zpravy.cz/clanky/2002/08/23914_10_0_0.html).

2.4 Růst a možnosti kultivace vatovce

2.4.1 Klíčení bazidiospor

Růst mycelia v přírodě začíná pravděpodobně vyklíčením bazidiospory. Plodnice vatovce obrovského obsahuje značné množství bazidiospor, jejich klíčivost je však velmi nízká a nezvyšuje se i když jsou spory vystaveny alkoholu, zvýšené teplotě, kyselině sírové, mechanickému narušení, detergentu (žlučovým solím), střídání tepla a mrazu a proteáz. Bazidiospory vyklíčily pouze v extraktu z ječmene. K tomuto extraktu bylo přidáno 100 mg/l chloramfenikolu a byl vyautoklávován a zaočkován suspenzí spor získaných homogenizací zralé plodnice. Rostoucí mycelium vatovce se objevilo až po 9 týdnech inkubace a bylo přeneseno na agarové médium. Není jasné, zda toto médium obsahovalo chloramfenikol. Kolonie rostoucí na tomto médiu měly průměr 2 až 3,5 mm. Tímto způsobem vyklíčila zhruba 1 bazidiospora z 20 milionů. Nikdy však nebyl pozorován růst nového mycelia z hyf kapilicia (Bulmer a Beneke 1961).

Přítomnost chloramfenikolu klíčení podstatně zlepšovala, což může znamenat negativní vliv některých bakterií na klíčení. Podstatně se klíčení zlepšilo (1 klíčící bazidiospora z milionu), pokud byly bazidiospory vatovce rozetřeny na povrchu sladínového agaru, který byl ve 4 bodech zaočkován kvasinkou *Rhodotorula mucilaginosa var. sanguinea*. Tato kvasinka není schopna zkvašovat cukry. Bylo pozorováno, že klíčení může být spouštěno na sladínovém agaru také některými kontaminujícími bakteriemi, které plně nahrazují kvasinku a které snad pocházejí z původní plodnice. Na sladínovém agaru v nepřítomnosti bakterie a kvasinky bazidiospory nevyklíčily vůbec. Vitamíny (biotin, thiamin, pyridoxin, riboflavin) a inozitol klíčení nespustily (Bulmer a Beneke 1961).

Metoda stimulace klíčení bazidiospor na 1,5% sladínovém agaru v přítomnosti *Rhodotorula mucilaginosa* byla úspěšná u dalších 41 druhů pýchavkovitých hub a má tedy pro tuto skupinu zřejmě obecnou platnost (Bulmer 1964).

Chloramfenikol byl také v koncentraci 6 mg/l použit v agarovém médiu (2% malt extrakt), do něhož byly vpraveny bazidiospory vatovce obrovského. V přítomnosti *Rhodotorula mucilaginosa* byl sledován vliv koncentrace bazidiospor na jejich klíčení. Největší počet vyklíčených bazidiospor (vzniklých kolonií) byl pozorován, když jich bylo na 1 Petriho misku vyseto asi 1 až 6 milionů. V tomto případě klíčily 3 až 4 spory z milionu. Nejvhodnější teplota pro klíčení ležela v rozmezí 24-26 °C (Bulmer a Beneke 1962).

Spory z různých plodnic klíčí odlišně a pravděpodobně se liší i spory jiných částí téže plodnice, jak bylo ukázáno na jiných pýchavkovitých houbách (Bulmer a Beneke 1964).

Spory vatovce byly testovány s dalšími sporami hub jako mikrosféry pro stanovování absolutních buněčných počtů. Bylo zjištěno, že spory *Calvatia gigantea* jsou použitelné jako vysoce uniformní částičky s referenčními rozměry (Klapper 1962).

2.4.2 Mycelium

Myceliální kulturu vatovce obrovského lze získat nejen klíčením spor, ale (snadněji) i kultivací asepticky odebraných kousků vnitřních částí mladé plodnice. Takto získané izoláty se pravděpodobně fyziologicky neliší od kultur získaných klíčením bazidiospor (Bulmer a Beneke 1964).

Bez možnosti studovat dikaryotizaci by nebyla čeleď *Lycoperdaceae* dobrým objektem pro cytologicko-genetický výzkum. Duncan a Keay (1990) proto zkoumali cytologické vlastnosti dikaryontů 5 rodů: *Bovista*, *Calvatia*, *Langermannia*, *Lycoperdon* a *Vasscelum* a pozorovali v nich výskyt trojjaderných buněk. Zjistili, že trojjaderné buňky se u všech izolátů objevují příležitostně v celém myceliu. V izolátech, kde se objevují tyto buňky v hojném počtu, jsou nalézány i čtyřjaderné buňky. Mechanismem degradace jádra v čtyřjaderné buňce dochází k tvorbě trojjaderného stavu buněk. Stejný mechanismus umožňuje přeměnu trojjaderných buněk na dvojjaderné. Tento stav je charakteristický pro typické dikaryonty.

Vatovec obrovský byl pokusně použit spolu s dalšími houbami a kvasinkami při likvidaci pivovarnických odpadů, které tak sloužily jako kultivační médium (Shannon a Stevenson 1975). Byly použity 3 různé odpady: tekutina vylisovaná z odpadních zbytků zrna a klíčků při výrobě sladiny, tekutina vylisovaná ze sraženiny vzniklé přidáním chmele a zahřátím a tekutina vylisovaná z kvasného kalu. Všechny tyto odpady byly schopné podporovat mikrobiální růst, přestože byl nalezen významný rozdíl v získaném výtěžku na každém z těchto substrátů. Odlišná schopnost růstu byla zaznamenána i mezi různými druhy rostoucími na stejných substrátech. Lze tedy předpokládat, že některé organismy využívají jiné zdroje uhlíku na substrátech s přísadkou redukujících cukrů. Tyto tekutiny obsahovaly 30, 55 a 9 g redukujících cukrů v litru. V prvních dvou případech vatovec využíval nejlépe z použitých hub cukr z tekutiny (84 % a 64 %). Ve druhém odpadu dosáhl nejvyšší koncentrace biomasy ze všech použitých organismů (28 g suché hmotnosti v litru tekutiny). Zde byl obsah bílkovin v sušině 17,5 %. I když mycelium vatovce obsahovalo poměrně nízké

koncentrace proteinu, celková proteinová produkce byla stejná nebo dokonce překračovala produkci jiných organismů.

Aby mycelium dobře rostlo, musí mít nejen dostatek dusíku, ale také dostatek fosforu a draslíku. Příliš vysoká koncentrace dusíku může vadit. Vhodnou výživou je sušené mléko, šrot z vojtěšky, kukuřice a řapíky křenových listů, které byly smočeny tekutinou obsahující 2 % minerálního hnojiva a 2 % laktózy. Samotné listí ze stromů není údajně jako substrát vhodné. Vyhovující je ale směs 1 dílu slámy a jednoho dílu hrabanky listí z dubu, do níž se přidá 2 % mouky z kukuřice, 2 % mouky z vojtěšky a 2 % sušeného mléka. Je také možno použít vyplozený sterilizovaný substrát po žampionech, do něhož se přidá 60 % uhličitanu vápenatého. Uhličitan vápenatý podstatně urychluje růst. Pro růst mycelia je třeba, aby teplota byla vyšší než 5 °C a vhodná kultivační teplota je mezi 20 a 25 °C (Néhez 1985).

O domestikaci vatovce se jako první pokoušeli v Krefeldu v Německu (Sous-Dorn 1979). Tento pokus nebyl úspěšný, protože firma vatovce obrovského nenabízí ani jako produkt ani jako komerční inokulum. Houba jim rostla nejlépe na médiu obsahujícím extrakt z plodnic a na sladovém extraktu v submerzní kultuře. Sterilizovaný kompost komunálního odpadu nebyl pro vatovce vhodným substátem a inokulum v nesterilním substrátu přerůstalo jinými mikroorganismy.

Při převodu kultury do nesterilní půdy je třeba nejdříve půdu (nejlépe z naleziště vatovce) vysterilizovat autoklávováním a takto připravenou půdu zaočkovat agarovým inokulem. Po 6 až 8 týdnech houba zcela proroste půdu, kterou je možno použít k inokulaci půdy pasterizované nebo úplně nesterilní. Mycelium prorůstá nesterilní půdou, ale po asi 2 týdnech stagnuje a mizí. Je to způsobeno snad požerem půdními živočichy (Gryndler osob. sdělení).

2.4.3 Plodnice

Neexistují pozorování zachycující zakládání plodnic vatovce obrovského v přírodě. Byl však popsán způsob vzniku plodnice příbuzného druhu *Calvatia saccata* (Schwarz 1933). První známkou začínajícího vzniku plodnice je vytvoření laterálního nebo terminálního výrůstku na myceliálním provazci. Tento výrůstek se zvětšuje a nabývá tvaru malé hlízky, která je přímo spojena s hrubými hyfami vnější části myceliálního provazce a je jimi obalena. Toto primordium plodnice se zvětšuje, neboť se množí hyfy vnitřní části plodnice. V krátké době se objevují specializované hyfy, které rostou směrem nahoru a při povrchu primordia se větví. Z těchto hyf u špičky primordia vzniká peridium. Pak se plodnice začíná

rychle zvětšovat, peridiální hyfy se přeměňují na pseudoparenchym a tloušťka peridia se zvětšuje. Gleba vzniká z vnitřních hustě propletených hyf primordia. Jak plodnice roste, hyfy gleby jsou řídkěji propleteny a postupně mezi nimi vznikají větší dutiny. Jsou ohraničeny paralelně uspořádanými hyfami (tzv. tramové hyfy), které vedou od báze plodnice a při svém růstu směřují k jejímu vrcholu. Jak se dutiny zvětšují, tyto hyfy se zmnožují a jejich větve se po povrchu dutin rozbíhají na všechny strany, takže zde nakonec tvoří souvislou palisádu terminálně ztlustělých hyf, vznikajících bazidií. Tím vzniká tzv. výtrusorodá vrstva (hymenium). Dalším větvením těchto tramových hyf pak vzniká pod výtrusorodou vrstvou další souvislá vrstva hyf, tzv. subhymeniální vrstva. Bazidiospory se objevují poté, co dutina dosáhla maximální velikosti. Jsou 4 na každé bazidii. Tramové hyfy se později mění na vlášení (kapilicium), což jsou vytrvalá vlákna, která přetrvávají ve zralé plodnici po rozložení ostatních hyf. Vývoj plodnice vatovce obrovského by se mohl naznačenému vývoji do značné míry podobat, pravděpodobně však s výjimkou způsobu vzniku hymenia.

Vývoj hymenia je u druhu *Langermannia gigantea* odlišný od vývoje hymenia ostatních druhů čeledi *Lycoperdaceae* (Gube 2007). V glebě vatovce nejsou vytvořeny např. primární dutiny. Palisády jsou stejné jako u ostatních hub čeledi *Lycoperdaceae*. V raných stádiích vývoje je palisádová vrstva nesena vějířovitými hyfami. Pro tyto hyfy je Gubem nově zaveden termín vějířovité struktury. Ty vytváří brzy nepravidelně se rozvíjející laločnatou zónu s palisádami hyf rostoucích vně nediferenciovaného plektenchymu a bočně se utvářejí sekundární dutiny. Během růstu primordia se v něm objevuje stále více palisádových vrstev, které se vmezeřují do nediferencovaného plektenchymu. Takto utvářená gleba byla nazvána jako vějířovitá. Exo- a endo-peridie nejsou ostře rozlišitelné a také vznik hranice mezi plektenchymem gleby a peridií nebyl objasněn.

Růst plodnice vatovce trvá při teplotě 17,5 °C asi 9 až 11 dnů (Rimózczi 1987 b). Při kolísání teploty vzduchu 19 až 22 °C (při průměrné teplotě 17,5 °C) dorostly plodnice do průměru 25 cm. Při kolísání teploty vzduchu ± 10 až 12 °C (při průměrné teplotě 22,2 °C) pak dorostly do průměru 27 až 29 cm. Relativní vlhkost vzduchu růst neovlivnila.

2.5 Vztah vatovce a ostatních hub k substrátu

Houby se velmi liší v minimálních požadavcích na zdroje organického uhlíku, dusíku, fosforu a dalších minerálů, vitamínů a růstových faktorů. Předpokládá se, že zjištění substrátových požadavků hub v laboratorních podmínkách má přímou souvislost s jejich chováním v přirozeném prostředí (Cooke a Whipps 1993).

Proto je důležité zjistit, které látky slouží vatovci jako majoritní zdroje živin a pokusit se díky těmto znalostem definovat selektivní médium a zlepšit kultivační podmínky.

Schopnost využívat různé substráty umožňuje organismu obsadit širokou škálu habitatů a ekologických nik. Saprotrofní houby (stejně jako vatovec), získávají primární zdroje energie z neživých organických materiálů živočišného nebo rostlinného původu. Porozumění výživě hub a funkcím těchto živin na biochemické úrovni poskytuje možnosti maximalizovat využití hub (například výtěžek biomasy atd.). Navíc houby jsou ideální experimentální organismy pro studování biochemických základů vývojových a fyziologických procesů, protože metabolismus hub není komplikován přítomností fotosyntézy. Tyto informace mohou být důležité nejen pro fyziology, ale též pro mykology, mikrobiology a další (Garraway a Evans 1984).

2.5.1 Zdroje uhlíku a dusíku

Zdrojem uhlíku pro houby mohou být jak soli organických kyselin, tak sacharidy (mono-, di-, tri- a polysacharidy), lipidy, aminokyseliny, peptidy a bílkoviny. Různé druhy či kmeny mohou využívat jen ty zdroje organického uhlíku, pro jejichž zpracování mají enzymové vybavení. Některé houby dávají přednost určitým uhlíkatým zdrojům a teprve po jejich vyčerpání používají další. Pokud je zdrojem uhlíku některý z nerozpustných polymerů, např. škrob, pektin, hemicelulózy, celulóza, lignin, které jsou v přírodě hlavním zdrojem uhlíkaté výživy většiny hub, je třeba je nejdříve extracelulárními enzymy rozložit na látky jednodušší, tj. monosacharidy ve vodě rozpustné, jež mohou projít cytoplazmatickou membránou do buňky. Většina uhlíkatých sloučenin slouží houbám též jako zdroj energie (Klán 1989).

Podle údajů v literatuře je vatovec obrovský schopen ke své obživě využívat nejrůznější zdroje sacharidů. Růst na těchto látkách se však u jednotlivých izolátů poněkud lišil. Pentózy byly metabolizovány jako zdroj uhlíku hůře než většina hexóz a nejlepším zdrojem z pentóz byla ribóza. Xylóza sterilizovaná autoklávem byla lepším zdrojem než xylóza sterilizovaná filtrací a izomery arabinózy nevyvolaly úspěšný růst. Vatovec dobře rostl na fruktóze, manóze a glukóze. Použití galaktózy závisí na schopnosti přeměnit tuto hexózu na fosforylovaný derivát glukózy, který vstupuje do běžného dýchacího řetězce. Galaktóza se ukázala být špatným zdrojem výživy a ramnózu a sorbózu nebyl vatovec schopen využít vůbec. Naopak úspěšného růstu bylo dosaženo na maltóze, trehalóze a celobióze. Velmi dobrým zdrojem byl i invertní cukr, ve většině případů dokonce lepší než samotná glukóza. Sacharóza pro vatovce nebyla vhodná, což může být způsobeno tím, že vatovec produkuje

sacharózu hydrolyzující enzym velmi pomalu nebo v malém množství. Stejně tak dobrým zdrojem nebyla ani laktóza, melibióza a rafinóza (Sedlmayr et al. 1961 b).

Zdrojem živin pro nejrůznější organismy včetně vatovce mohou být také lipidy. Značné množství lipidů se nachází v zásobních a membránových složkách organismů. Mastné kyseliny se liší v délce alifatického řetězce, pozicí dvojných vazeb atd. Některé mohou být fosforylovány jako estery a jiné mohou tvořit lipoproteinové komplexy. Jednoduchý enzym lipáza může katalyzovat hydrolýzu většiny ve vodě nerozpustných triglyceridů a uvolňuje mastné kyseliny, částečně diglyceridy a glycerol. U hub jsou lipázy obecně přítomny v buněčné stěně a jsou inhibovány přítomností monosacharidů, disacharidů nebo glycerolu a indukovány jsou triglyceridy, mastnými kyselinami a lecitinem. Různé formy tohoto enzymu mají různou substrátovou specifitu. Většina lipáz jsou glykoproteiny, které jsou pevně vázané v hydrofóbních površích. Rozklad lipidů je důležitý především pro některé entomopatogenní houby spolu s rozkladem chitinu a proteinů, které tvoří většinou složku kutikuly členovců (Cooke a Whipps 1993). Produkce lipázy byla zjištěna též u vatovce (Christakopoulos et al. 1992).

Jako zdroje dusíku jsou pro houby vhodnější organické sloučeniny před anorganickými, např. bílkoviny, pepton, aminokyseliny a močovina. Houby ale využívají i amonné soli organických kyselin, dále dusičnan, amoniak aj. Zdroj dusíku je nezbytný pro růst a vývoj hub. Aminokyseliny fungují v buňce jako donory dusíku ke stavbě komplexních molekul. Určitý zdroj dusíku v médiu musí být nejdříve přeměněn na aminokyselinu předtím, než je využit organismem. Houby jsou rozděleny do 3 nebo možných 4 skupin na základě jejich schopnosti využívat nitrát, nitrit, amoniak a organické sloučeniny. Většina experimentálních prací byla prováděna s nitrátem, nitritem, amoniakem, aminokyselinami a močovinou. Tyto látky jsou vzájemně přeměnitelné (Garraway a Evans 1984).

Fosfodiestery, včetně nukleových kyselin, jsou nejhojnějšími zdroji fosforu v čerstvém detritu rostlinného, živočišného a mikrobiálního původu. Slouží též jako významné zdroje uhlíku a dusíku (Leake a Miles 1996).

Na základě zjištěných fakt, viz kapitola 2.3.3, se snažím ve své práci obsáhnout širší spektrum látek (včetně DNA), které by mohly nitrofilnímu vatovci sloužit jako zdroje živin s důrazem především na dusík.

Aminokyseliny, pepton a bílkoviny mohou být pro mnohé houby zároveň zdrojem organického uhlíku a energie. Makromolekuly bílkovin a jejich neúplný lyzát pepton, které neproniknou buněčnou stěnou, musí být proteolytickými enzymy zpravidla nejprve rozštěpeny na aminokyseliny. Úloha zdrojů dusíku spočívá především v tvorbě aminoskupin

(-NH₂) a iminoskupin (=NH), které se vyskytují v molekulách aminokyselin, nukleotidů, heterocyklických bází a jiných sloučenin, jež jsou složkami cytoplazmy. Některé bazidiomycety jsou odkázány pouze na amoniakální dusík, neboť jim enzym nitrátoreduktáza chybí. Metabolismus dusíku je do značné míry spjat s přítomností vitamínu thiaminu (Klán 1989).

Právě tento vitamín (thiamin) potřebuje mycelium vatovce ke svému růstu a to v koncentraci do 50 mg/l. Další zvyšování koncentrace růst nezlepšuje. Nízká koncentrace thiaminu obsažená v komplexních médiích (sladina/malt extrakt, extrakt z ječmene, kvasničný extrakt) ve většině případů stačí pro růst houby. Při deficitu thiaminu a přidavku biotinu, pyridoxinu nebo inozitolu k bazálnímu médiu nebyl růst pozorován a když, tak mycelium bylo velmi řídké. Z toho vyplývá, že druhy vatovce jsou heterotrofní s důrazem na thiamin (Sedlmayr et al. 1961a).

2.5.2 Využívání polymerních látek

Saprotrofní bazidiomycety využívají organickou hmotu, která je složena především z polysacharidů buněčných stěn a jiných biopolymerů, včetně polymerů buněčných stěn rostlinného (celulóza, hemicelulózy, lignin, pektin) a houbového (chitin) původu, zásobních polysacharidů (škrob) a proteinů. Rozklad některých biopolymerů (celulóza, škrob aj.) poskytuje organický uhlík a energii pro růst, zatímco např. lignin může být využíván jen spolu s jinými substráty. Rozklad proteinů, které představují jednoduše dostupný zdroj dusíku a uhlíku, je rozšířený mezi mnoha organismy. Pro saprotrofní způsob života je však podstatnou podmínkou úspěšnosti také tvorba extracelulárních enzymů, které rozkládají biopolymery nebílkovinného charakteru. Tvorba extracelulárních enzymů je detailně studována u dvou ekologických skupin saprotrofních bazidiomycetů - dřevokazných a půdních (Boddy et al. 2008).

V této práci věnuji zvýšenou pozornost především polysacharidům, protože je v přírodě každým rokem syntetizováno 4×10^{11} tun sacharidů převážně ve formě biologických polymerů – polysacharidů (Čopíková a Synysia 2005). Extracelulární enzymy, které rozkládají biopolymery, jsou jednou z hlavních charakteristik saprotrofních bazidiomycetů (Boddy et al. 2008).

Polysacharidy mají důležitou roli při stavbě biomasy rostlin, živočichů, hub a dalších mikroorganismů (celulóza, chitin, pektin, hemicelulózy) a jsou zdrojem energie pro různé

biochemické reakce (škrob). Na jejich tvorbě se podílí pouze několik monosacharidů a jejich derivátů, převážně D-glukóza, D-galaktóza, D-mannóza, D-xylóza, L-arabinóza, 2-amino-2,6 deoxyglukóza a další. Tyto monosacharidy se vyskytují jako α nebo β anomery a jsou nejčastěji vázány glykosidovými vazbami. Zejména stavební polysacharidy jsou lineární, avšak obecně mohou být více či méně větveny (Čopíková a Synysia 2005).

Významnými zdroji uhlíku pro vatovec byly z dosud testovaných polysacharidů především glykogen a škrob. Nejlepším zdrojem byl dextrin, naopak vatovec špatně využíval inulin a celulózu. Důvod rozdílu mezi škrobem a dextrinem jako zdrojem uhlíku není jasný (Sedlmayr et al. 1961 b).

Důležitý rozdíl mezi zásobními a strukturními látkami se týká jejich dostupností pro houby v čase a prostoru. Škrob, inulin, glykogen a lipidy jsou hojné v rostlinných a živočišných buňkách a mohou být využívány širokým spektrem hub. Rostlinné a mikrobiální buněčné stěny a další strukturální složky mikroorganismů, rostlin a živočichů mohou představovat zdroje organického uhlíku pro patogeny a primární kolonizátory (Cooke a Whipps 1993).

Pro porozumění vztahu hub k těmto v přírodě tolik významným látkám (biopolymerům) jako substrátu považuji za nutné zde uvést základní fakta. Polymery se dělí na 2 velké skupiny:

A) Zásobní polymery

Přestože jsou škrob a glykogen považovány za typické zásobní polysacharidy rostlin a živočichů, obě látky se nacházejí i v houbách. V příslušných degradačních procesech je zahrnuta řada enzymů a k úplnému rozkladu je zapotřebí jejich kooperace. Tyto reakce závisí na struktuře substrátu a na podmínkách prostředí a navíc rozdíly v enzymové výbavě se objevují již u různých izolátů stejného druhu (Cooke a Whipps 1993).

Škrob se vyskytuje jako zásobní polysacharid zejména v parenchymatických buňkách. Hlavní enzym, který rozkládá škrob se nazývá amyláza (1,4- α -glukozidáza) a byl zjištěn u mnoha dřevokazných (*Schizophyllum commune*, *Phanerochaete chrysosporium*) i půdních hub např. *Coprinus* (Boddy et al. 2008) nebo *Calvatia* (Kekos, Galitou-Panaytou a Macris 1987, Kekos a Macris 1987b). Produkce může být vyvolána interakcí se saprotrofními houbami a bezobratlými živočichy, ale ekologický význam tohoto enzymu není dostatečně prozkoumán.

B) Strukturní polymery

V přírodě lze považovat houby za možné kolonizátory různých substrátů. Prakticky každá strukturní složka může být náchylná k rozkladu, ovšem mnohdy velmi pomalému (Cooke a Whipps 1993).

Ze základních strukturních polymerů připadá v úvahu růst vatovce na těchto látkách (z níže uvedených strukturních látek byla dříve testována jako zdroj živin pouze celulóza):

1) Pektin

Pektin je velmi důležitá látka v rostlinné struktuře a slouží jako zdroj živin pro velké množství hub s širokým spektrem životních strategií. Schopnost rozkládat pektin u patogenů může hrát klíčovou roli k získání přístupu k ostatním složkám buněčné stěny. Když jsou houby pěstovány na izolovaných buněčných stěnách rostlin, jako první jsou produkovány pektinolytické enzymy. Následně po nich jsou vylučovány hemicelulázy a celulázy. Monomery, které jsou odštěpovány působením nízkých hladin pektinolytických enzymů jsou přijímány a indukují další vylučování enzymů (tj. autokatalytická indukce). Naopak asimiláty (např. glukóza a jiné cukry) ve velkém množství způsobují represi těchto enzymů. Proces indukce a represe kontroluje vylučování mnoha dalších enzymů rozkládajících především polymerní sloučeniny. Pektin je polysacharid obsahující jako monomerní jednotky kyselinu galakturonovou, její estery a rhamnózu. Je rozšířen v rostlinné říši, kde je vázán na polysacharidy buněčných stěn a tvoří tzv. buněčný tmel - střední lamelu (Cooke a Whipps 1993).

Pektiny se enzymaticky odbourávají ve dvou stupních. Esterázy hydrolyzují estery, vzniká kyselina pektinová a methanol. Pektinázy, případně polygalakturonidázy hydrolyzují glykosidické vazby a vznikají pektinové kyseliny s kratšími řetězci (<http://www.biotox.cz/naturstoff/chemie/ch-sach-poly.html>).

Pektinolytické enzymy jsou produkovány i bazidiomycety, a to především fytopatogenními druhy. Ty produkují tyto enzymy, aby se dostaly do rostlinných tkání bohatých na pektin. Tvorba pektináz je prokázána i u dřevokazných hub (Boddy et al. 2008).

2) Celulóza

Celulóza, starším názvem též buničina, je polymer glukózy. Je nejrozšířenějším biopolymerem na zemském povrchu a ročně jí vzniká až 10^{11} tun. Jednotlivé glukózové jednotky jsou spojené vazbou β - 1,4 a tvoří dlouhé, nerozvětvené řetězce, které jsou zcela nerozpustné ve vodě. Celulóza je hlavní stavební látkou rostlinných primárních buněčných stěn a spolu s ligninem se podílí na stavbě sekundárních buněčných stěn. V buněčných stěnách rostlin jsou jednotlivá celulózová vlákna dále spojena vodíkovými můstky a zanořena

do sacharidové matrix. To buněčným stěnám propůjčuje nutnou tuhost a pevnost. Na rozdíl od dalšího rostlinného polysacharidu, škrobu, se polymer nevětví ani nekrotí, ale zůstává ve formě dlouhých rovných řetězců. Je syntetizován extracelulárně z aktivované formy glukózy (UDP-glukóza), přesný mechanismus není ještě znám. Živočichové nemají enzymy, které by dokázaly rozštěpit β - 1,4 vazby mezi jednotlivými glukózovými jednotkami celulózy. Bakterie a houby naproti tomu mají schopnost celulózu štěpit a metabolizovat. Při hydrolytickém štěpení celulózy vznikají různé štěpné produkty (celopentóza, celotetróza, celotrióza, celobióza) až po glukózu (<http://cs.wikipedia.org/wiki/Celul%C3%B3za>).

Řada informací o enzymologii celulózy pochází z *in vitro* studií. Houby se liší ve schopnosti rozkládat celulózu. Některé houby odd. Basidiomycota a Ascomycota (houby bílé hniloby) rozkládají všechny složky dřeva v přibližně stejném poměru na rozdíl od hub měkké a hnědé hniloby. Na rozkladu celulózy se podílí celá řada enzymů. Syntéza celuláz *in vitro* je indukována celulórou a inhibována glukózou a dalšími využitelnými cukry, ale tato indukce není podrobně prozkoumána *in vivo*. Endocelulázy jsou produkovány před exocelulázami a průběh vylučování enzymů se zdá být velmi dobře koordinován. Následné vylučování těchto dvou enzymů je synergické (Cooke a Whipps 1993).

Houby schopné štěpit celulózu jsou většinou enzymově vybaveny i na štěpení hemicelulóz (Klán 1989).

3) Chitin

Chitin je po celulóze druhým nejhojnějším biopolymerem. Hlavními průmyslovými zdroji chitinu jsou exoskelety suchozemských a vodních bezobratlých. Nachází se ojedinele i v hnědých řasách. Je charakteristickou složkou buněčných stěn všech vláknitých hub s výjimkou oomycetů. Je přítomen v myceliu i plodnicích. Má zejména stavební a ochrannou funkci. Svou stavbou se podobá celulóze, místo jednotek glukózy jsou zde však přítomny jednotky 2-acetylamino-2-deoxy-D-glukopyranózy, vázané podobně jako glukóza v celulóze vazbou β - 1,4 (<http://www.biotox.cz/naturstoff/chemie/ch-sach-poly.html>).

Spolu s chitosanem (deacetylovaná forma chitinu) může tvořit 4-60 % sušiny buněčné stěny hub a více než 80 % kutikuly bezobratlých. Ve vodním prostředí rozkládají chitin zejména bakterie a aktinomycety, na souši především houby. Chitinolytické schopnosti jsou v přírodě velmi rozšířené a vztahují se k určitým ekologickým skupinám organismů, např. hmyzím patogenům a obyvatelům hmyzí kutikuly. Chitin se nachází v kutikule spolu s lipidy a proteiny, a proto pro degradaci chitinu je potřeba i proteáz a lipáz.

Chitosan je štěpen endo-chitosanázou na glukózamin a jeho oligomery. Glukózamin je dále přijímán myceliem a potom přeměněn na glukózu intracelulární deaminací (Cooke a Whipps 1993).

Rozklad chitinu je zahájen endochitinázou, která hydrolyzuje vazby mezi molekulami N-acetylglukózáminu po celé molekule a tvoří oligosacharidy různých délek. Tyto oligomery dále rozkládají enzymy β -N-acetylhexozamináza a chitobiáza (Boddy et al. 2008).

Chitin objevil v roce 1811 profesor Henri Braconnot, který byl ředitelem botanické zahrady akademie věd v Nancy ve Francii. Obrovský zájem o využívání chitinu nastal ve 30. a 40. letech 20. století. Potenciál chitinu a jeho derivátů je obrovský, jejich důležité vlastnosti je činí ideálními pro využití v mnoha oblastech (výživa, kosmetika, biomedicína, zemědělství, filtrace vody atd.). Chitin má silné fungicidní, antibakteriální a antivirové účinky, využitelné v oblasti medicíny (obinadla, obvazy, chirurgické stehy, ošetření ozubice). Rozsáhlý výzkum dokázal, že chitin a jeho deriváty nejsou alergenní a toxické. Navíc je chitin úplně rozložitelný a tudíž k přírodě šetrný. Dnes používá chitin a chitosan jako doplněk stravy více než 2 miliony lidí zejména v USA a Japonsku. V Japonsku považují lékaři chitin za látku, která pomáhá v případě alergií, vysokého krevního tlaku, artritidy, vysokého obsahu krevního cholesterolu. Studie v Japonsku, USA a Evropě ukázaly, že chitin a jeho deriváty pomáhají v procesech podporující trávení a napomáhají růstu prospěšných střevních bakterií (Bifidobakterií) důležitých pro procesy trávení a vylučování odpadních látek. Výsledky ukazují, že chitin může preventivně působit proti tumorům nebo intestinálním polypům, které jsou často prekuzory rakoviny střeva a konečníku (www.patentstorm.us/patents/6407040-description.html).

Chitin je většinou složkou buněčných stěn hub a slouží jako cílová molekula při rozpoznávání potenciálních patogenů přirozeným imunitním systémem rostlin a živočichů. U rostlin jsou oligomery chitinu známy svou schopností navodit obranné odpovědi rostlinných buněk (Kaku et al. 2006).

Chitinolytické houby izolované z půd se řadí nejčastěji do rodů *Mortierella*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Verticillium*, *Humicola* aj. (Carlile et al. 2001).

U saprotrofních bazidiomycetů výskyt chitinázy zatím přitahuje pozornost zejména u dřevokazných druhů. Produkce extracelulární chitinázy je doložena u hub tzv. bílé hniloby (např. *Phanerochaete cinnabarinus*), kořenových parazitů (např. *Armillaria ostoyae*) a několika ektomykorhizních hub. Všechny zprávy o výskytu chitinolytických enzymů, ale nemusejí nutně znamenat, že je houby využívají jen při své výživě. Chitinolytické enzymy zapojují také do přestavby své buněčné stěny. U některých druhů sekundárních dřevokazných

hub bylo zjištěno, že tyto houby rozkládají jak své buněčné stěny, tak hyfy primárních kolonizátorů dřeva (Boddy et al. 2008).

2.6 Interakce bazidiomycetů s ostatními organismy

Ve své práci studuji nejen růst vatovce na různých substrátech, ale snažím se i o zjištění takových přímých trofických interakcí s jinými organismy, které vyplývají z jeho substrátových požadavků (tzn. využívání vybraných odumřelých organismů jako zdrojů živin pro houbu). Obecně lze shrnout poznatky o interakcích bazidiomycetů takto:

Pro většinu přírodních stanovišť je těžké vyjádřit vztahy mezi houbami a mezi nimi a jinými mikroorganismy. Používání laboratorních pokusů umožňuje objevit fakta týkající se antibiotických a jiných antagonistických vztahů hub. Význam znalostí o interakcích organismů získaných v laboratoři pro pochopení procesů ve společenstvu ale není dosud zřejmý. Je nemožné ignorovat hlavní rysy jednotlivých vztahů mezi houbami a jinými mikroorganismy. Pokud ale nebudeme chápat tyto vztahy v souvislosti s celým společenstvem, budou získané poznatky útržkovité (Boddy et al. 2008).

2.5.1 Interakce s bakteriemi

Houby se ve svém přirozeném prostředí dostávají do kontaktu s bakteriemi a aktinomycetami prakticky nepřetržitě. Ekologický význam některých interakcí je však nedoceněn (Cooke a Whipps 1993).

Bakterie hrají důležitou roli ve fungování dřevokazných bazidiomycetů. Mohou mít negativní vliv na růst a aktivitu hub, protože s houbami soutěží o nízkomolekulární látky, které jsou uvolňovány extracelulárními houbovými enzymy (Boddy et al. 2008). Existují i mykofágní bakterie. Na druhou stranu mohou mít bazidiomycety z přítomnosti bakterií užitek. Mohou využívat jimi uvolněné dusíkaté látky či mohou využívat bakteriální detoxifikaci fungitoxických látek (De Boer et al. 2005).

Během rozkladu dřeva se podmínky prostředí stávají pro bakterie velmi selektivními (silná acidifikace, přítomnost toxických sekundárních metabolitů, produkce kyslíkových radikálů). Bakterie, které tyto podmínky přežívají, musí mít zvláštní schopnosti, tato oblast zatím není detailně prozkoumána. Hlubší znalosti o interakcích mezi saprotrofními bazidiomycety a bakteriemi nejsou důležité jen z vědeckého pohledu, ale mohou otevřít nové možnosti pro aplikace pro konzervaci dřeva a při objevování z lékařského hlediska cenných metabolitů. Jak kultivační tak molekulární metody jsou potřebné pro studium interakcí

s bakteriemi. První metodou se zjišťuje fyziologická charakteristika kultivovaného organismu, která může vyústit do objevení nového metabolitu. Druhá z metod může detegovat nové druhy bakterií, které žijí ve spojení s bazidiomycety (Boddy et al. 2008).

V některých případech může mít ekologický význam i antagonistické působení hub na bakterie. Rozklad a využívání bakteriální biomasy hraje zřejmě důležitou roli v zásobování živinami u dřevokazných a opad kolonizujících hub (Cooke a Whipps 1993).

Fungicidní působení bakterií a aktinomycetů je často studováno s důrazem na jejich aplikaci v biologickém boji proti kořenovým a listovým houbovým patogenům rostlin. Antagonismus se projevuje různými způsoby a zahrnuje kompetici o živiny, přímý parazitismus a antibiózu. Díky krátké generační době jsou bakterie schopné soutěžit s houbami o živiny. V blízkosti semen a kořenů mohou bakterie vytlačovat houby od zdrojů živinově bohatých exudátů. Kompetice může být ještě usnadněna přichycením bakterií na povrch hyfy. Například *Enterobacter cloacae* produkuje aglutininy, kterými se váže na mycelium *Pythium ultimum* a *Rhizopus stolonifer*. Následně dochází k inhibici růstu houby (Cooke a Whipps 1993).

Je potvrzeno, že houby mohou napadat a stravovat hlísty, améby, vířníky a jiné mikroorganismy vyskytující se ve vodě, půdě a organických zbytcích. Bakterie představují rozsáhlou složku biomasy a poskytují důležitý zdroj potravy pro půdní mikrofaunu. Mrtvé bakterie mohou samy o sobě představovat zdroj potravy pro nespočet hub. Některé druhy bazidiomycetů jsou částečně schopny na bakteriální biomase růst. Například *Agaricus bisporus* pravděpodobně usmrcuje bakterie druhu *Bacillus subtilis* i jiných, a využívá je jako zdroj živin. Substrát pro růst a kultivaci této houby je připravován v procesu kompostování, kdy narůstá velká mikrobiální biomasa. Předpokládá se, že takto nahromaděná mikrobiální biomasa může sloužit houbě jako zdroj dusíku, uhlíkatých látek, minerálů a vody (Carrol a Wicklow 1992).

Ukázalo se, že houby produkují enzymy, kterými rozkládají mrtvé bakterie a využívají je jako zdroj živin. Houby rodu *Agaricus* lyzují jak grampozitivní tak i gramnegativní bakterie. Byla objevena řada zástupců hub z odd. Ascomycota, Deuteromycota a Zygomycota, kteří rozkládali také buňky druhu *Bacillus subtilis*. Tento typ výživy se patrně uplatňuje zejména u pomalu rostoucích bazidiomycetů. Ve srovnání s kultivací na standardním médiu se morfologie bazidiomycetů při růstu na bakteriální biomase nezměnila (Carrol a Wicklow 1992).

Naopak zástupci odd. Deuteromycota (*Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicilium*) rostli na bakteriích jako zdroji živin atypicky (Carrol a Wicklow 1992). Z toho lze podle citovaných

autorů vyvodit závěr, že využívání bakterií (živých nebo mrtvých) může představovat pro houby významný zdroj živin pouze v určitých ekologických nikách.

Bylo také prokázáno, že hyfy dřevokazné houby *Pleurotus ostreatus*, jsou v prostředí chudém na živiny přitahovány k mikrobiálním koloniím (*Pseudomonas*, *Agrobacterium*), dostávají se dovnitř buněk, způsobují lyzi a využívají buňky jako zdroj živin. Tuto schopnost napadat živé bakterie mají i druhy *Lepista nuda* a *Coprinus quadrifidris*. Vystává otázka, zda tedy jde o náhodný vztah nebo zda je využívání bakteriální biomasy evoluční selekcí, která by zvýhodňovala ty houby, které jsou schopny napadat bakterie. Je zřejmé, že tato schopnost může poskytovat houbám výhodu za nepříznivých podmínek. Podobně mohou dřevokazné houby napadat i mrtvé hlísty (Carrol a Wicklow 1992).

Při osidlování koprofilních substrátů bylo zjištěno, že pozdní kolonizátoři jsou efektivnější v rozkladu celulózy a dekompozice je rychlejší, pokud působí houby s bakteriemi. Rozklad bakteriálních buněk houbami může být důležitý v kolonizaci hnoje a v koloběhu živin (Carrol a Wicklow 1992).

Výživa vatovce v přírodě by mohla být spojena s využíváním biomasy ostatních půdních mikroorganismů a mohla by se tak podobat do jisté míry výše zmíněným způsobům výživy druhů *Agaricus bisporus* nebo *Pleurotus ostreatus*. Dokonce je možné, že by DNA obsažená v mikrobiálních buňkách mohla sloužit jako důležitý potenciální zdroj fosforu.

2.5.2 Interakce s bezobratlými

Basidiomycota jsou ve většině suchozemských ekosystémů primárními rozkladači organické hmoty. Hrají klíčovou roli v ekosystému, kde se vzájemně často ovlivňují s bezobratlými živočichy. Tyto interakce mohou být přímé a nepřímé a mohou být prospěšné či škodlivé jednomu nebo oběma partnerům. Půdní biomasa bezobratlých se liší na různých lokalitách, ale může přesahovat i 0,5 tuny/ha. Nejdůležitějšími podzemními bezobratlými jsou hlísti, členovci a měkkýši. Saprotrofní houby jsou ve většině suchozemských ekosystémů ovlivňovány těmito bezobratlými prostřednictvím řady mechanismů. Velké množství jejich zástupců jsou mykofágové (Boddy et al. 2008).

Přímé interakce jsou především ty, kde houba slouží bezobratlým jako zdroj potravy a habitatu (mycelium, plodnice) a naopak, když houby zabíjejí a využívají látky z těla bezobratlých. Nepřímé interakce se týkají například změn v distribuci živin v půdě a změn v rychlosti dekompozice. Také těkavé produkty hub mohou ovlivňovat chování a potravní strategie bezobratlých (Boddy et al. 2008).

2.5.3 Interakce s jinými houbami

Kompetice hub s jinými houbami a jejich interakce mohou být zprostředkovány přímým kontaktem na úrovni hyf a mycelia. Vzájemné antagonistické působení je ovlivňováno produkovanými chemickými látkami (enzymy, toxiny, antifungicidními metabolity). Například houbové chitinázy mohou hrát roli v mezidruhových interakcích. Antagonismus se projevuje nejčastěji parazitismem nebo vznikem růstových bariér. Vzájemné působení je studováno na umělých médiích, kde jsou však problémy s interpretací výsledků, protože půdní prostředí je ovlivňováno mnoha faktory, které tyto interakce mohou měnit a které nelze jednoduše v umělých prostředích simulovat (Boddy et al. 2008).

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1 Materiál

Výchozím materiálem mé práce bylo 7 izolátů druhu *Langermannia gigantea* ze sbírky laboratoře biologie hub v Mikrobiologickém ústavu AVČR v Krči, které izoloval Doc. Gryndler. Do sbírky jsem zařadila i vlastní sběr, tj. izolát CG 17, který jsem izolovala osobně. Data a místa nálezů izolátů jsou zobrazeny v následující tabulce (Tab. 1). U některých kmenů jsou známy sekvence DNA z oblasti ITS v kazetě genů pro rRNA (Tab. 2).

Tab. 1: Data a místa nálezů izolátů.

izoláty	místo sběru	datum izolace
CG 1	České Středohoří Hořidla	7. 8. 2001
CG 2	České Středohoří Hořidla	7. 8. 2001
CG 11	České Středohoří Hořidla	8. 8. 2001
CG 13	České Středohoří Horní Nezly	19. 7. 2005
CG 14	České Středohoří Horní Nezly	19. 7. 2005
CG 15	České Středohoří Horní Nezly	18. 7. 2005
CG 16	České Středohoří Horní Nezly	18. 7. 2005
CG 17	Mělník Mšeno	13. 8. 2006

Tab. 2: Přístupové kódy ITS sekvencí u používaných kmenů *Langermannia gigantea* v databázi GenBank.

izoláty	kódy
CG 2	EF 190314
CG 11	EF 190316
CG 13	EF 190317
CG 17	EF 190318

3.2 Kultivace

Sbírkové izoláty druhu *Langermannia gigantea* byly kultivovány na médiu LG 2 (dle Doc. Gryndlera nepublikováno) připraveného podle tabulky 3 a 4. Médium mělo pH nastaveno na hodnoty 6-6,5 pomocí 1 M KOH a HCl. Izoláty byly inkubovány ve tmě v termostatu při 25 °C. Kmeny, které byly dále testovány v rámci pokusů, byly kultivovány na Petriho miskách (v případě kultivace na pevném médiu) po dobu 30-90 dní za různě modifikovaných podmínek (modifikace média LG 2, teplota, pH aj.) dle cíle pokusu. Sterilizace probíhala v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 25 minut. Vysoušení vzorků pro stanovení biomasy probíhalo v sušárně při 105 °C po dobu 5 hodin.

V případě kultivace v půdním prostředí byla použita vysušená zemina z naleziště vatovce o zrnitosti 5 mm, která byla ovlhčena na 30 % obsahu vody. Půda o zrnitosti 5 mm byla získána přeseťím přes síto o velikosti ok 5 mm (Lamačková 2005).

Tab. 3: Složení média LG 2 pro kultivaci *Langermannia gigantea* (dle Doc. Gryndlera nepublikováno).

množství média	1 liter
destilovaná voda	900 ml
0,1 M Sonneveldův roztok	100 ml
KH ₂ PO ₄	100 mg
roztok C ¹ (FeNaEDTA)	10 ml
roztok E ² (mikroprvky)	10 ml
bakteriologický pepton	2 g
sladový extrakt	2 g
kvasničný extrakt	1 g
glukóza	8 g
agar	8 g

Tab. 4: 0,1 M Sonneveldův roztok (Sonneveld et al. 1989):

množství roztoku	1 liter
destilovaná voda	1 l
Ca (NO ₃) ₂ .4H ₂ O	2,922 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,972 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,957 g
K ₂ HPO ₄	0,045 g
KH ₂ PO ₄	0,006 g
Na ₂ SO ₄	0,704 g
K ₂ SO ₄	0,384 g
KNO ₃	0,193 g
NH ₄ NO ₃	0,025 g

3.3 Zpracování získaných dat

Získané údaje byly zpracovávány programem Microsoft Excel 2003. Pro vytvoření grafů a pro statistické zpracování dat (95% interval spolehlivosti) byl použit stejný program. Počet opakování byl roven 4-8 dle konkrétního pokusu. Narostlé mycelium na pevném médiu bylo měřeno vždy v 8 směrech (Obr. 3) a z těchto měření byl vypočítán a vyhodnocen průměrný poloměr narostlé myceliální kolonie.

¹ **Roztok C:** 800 mg FeNaEDTA na 1 liter H₂O

² **Roztok E:** 0,73 g MnSO₄. 5 H₂O; 0,26 g ZnSO₄. 7 H₂O; 0,15 g H₃BO₃; 0,013 g CuSO₄.5H₂O; 0,24 mg (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O; destilovaná voda 1 l

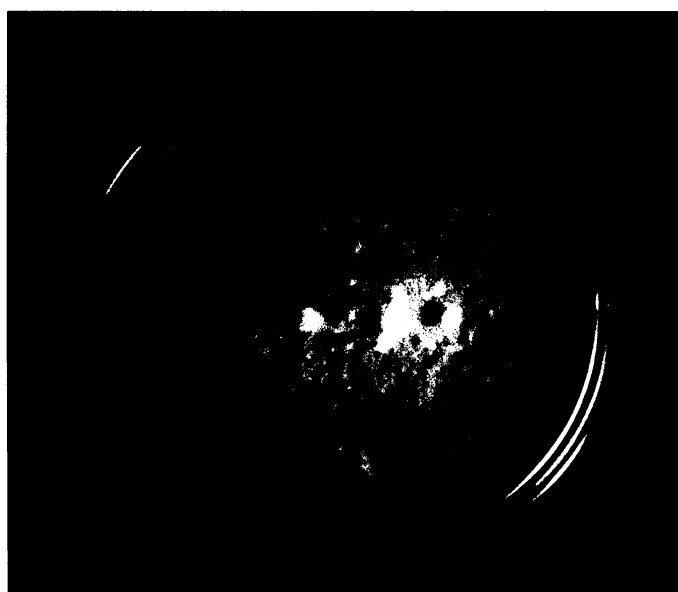


Obr. 3: Růst izolátu LG 2 na amonné formě dusíku - NH_4Cl . Modré linie na obrázku ukazují směry měření růstu (foto Görnerová).

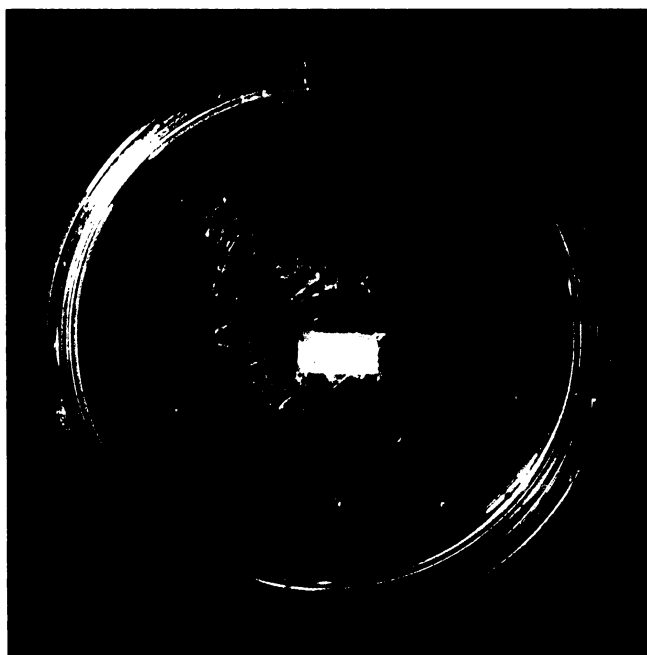
3.4 Rozdělení charakteru růstu

Charakter růstu mycelia byl rozdělen vizuálně na 3 typy růstu (Tab. 19):

- 1) **charakter růstu I.** tzn. normální růst (Obr. 4)
- 2) **charakter růstu II.** tzn. řídký a vatovitý růst (Obr. 5)
- 3) **charakter růstu mezi I. a II.** (Obr. 6)



Obr. 4: Normální růst na médiu LG 2 (foto Görnerová).



Obr. 5: Růst na celulóze (foto Görnerová).



Obr. 6: Růst na DNA (foto Görnerová).

3.5 Příprava pevného média pro detekci chitinázové aktivity

Ve všech pokusech (kromě pokusu v půdě 3.8.2, kde byl použit práškový chitin) byl používán koloidní roztok chitinu připravený z práškového chitinu z krabích schránek (Koch-Light). Chitin byl rozpuštěn ve 200 ml 50% kyseliny sírové a byl dále přes minerální vatu

přefiltrován do 3 litrů (15 objemů) destilované vody, kde se vysrážel. Vysrážený chitin byl oddělen centrifugací. Promytím destilovanou H₂O a centrifugací byly odstraněny zbytky kyseliny. Nakonec byl chitin suspendován ve vodě a vysterilizován v autoklávu (Hankin a Anagnostakis 1975). Vzorek o objemu 2 ml byl vysušen a zvážen pro zjištění koncentrace sušiny. Koloidní roztok chitinu byl pak přidán do média LG 2 – N (Tab. 6) tak, aby obsahovalo 0,05 hmotnostního procenta sušiny chitinu. Na tomto médiu byly pozorovány číré zóny v agaru kolem kolonií schopných rozkládat chitin (Obr. 7).



Obr. 7: Číré zóny v agaru kolem rostoucí kolonie vatovce (izolát LG 1) pozorované na modifikovaném médiu LG 2 - N s 5 g/l chitinu a 0,2 mmol N/l ve formě nitrátu (foto Görnerová).

3.6 Posouzení kultivačních nároků na umělých živných médiích

3.6.1 Růst mycelia vatovce na různých zdrojích organického uhlíku

Bylo testováno 5 zdrojů organického uhlíku: celulóza, pektin, dextrin, kys. para-hydroxybenzoová a kys. 2,3-dihydroxybenzoová, které byly přidávány do média LG 2 - C (Tab. 5) v množství 13 g/l jako jediné zdroje organického uhlíku. Médium bylo zaočkováno izolátem CG 2.

Tab. 6: Složení média LG 2 - N.

složka	množství v 1 litru
destilovaná voda	900 ml
0,1 M Sonneveldův roztok – N	100 ml
KH ₂ PO ₄	100 mg
roztok C (FeNaEDTA)	10 ml
roztok E (mikrobiogenní prvky)	10 ml
glukóza	doplněno do 5 g dle zdroje N
agar	8 g

Tab. 7: Zdroje dusíku přidávané do média LG 2 - N.

zdroje N	koncentrace g/l
DNA	5 g
chitin	5 g
N-acetylglukózamin	5 g
močovina	0,68 g
želatina	5 g
kys. močová	0,95 g
salicylanilid	4,8 g
kys. 3,5-dinitrosalicylová	2,78 g

Tab.8: Složení 0,1 M Sonneveldova roztoku – N.

složka	množství
KCl	0,15 g
destilovaná voda	do 1 l
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,89 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,957 g
Na ₂ SO ₄	0,704 g
K ₂ SO ₄	0,384 g

3.6.4 Růst mycelia vatovce na nitrátovém, amonném a organickém dusíku

Byly testovány 3 různé formy dusíku ve 3 variantách: nitrátový [(KNO₃ + Ca(NO₃)₂)], amonný (NH₄Cl) a organický (aminokyselina asparagin). Dusíkaté látky byly vždy jednotlivě přidávány do média LG 2 - n (Tab. 9) v množství obsahujícím 27 mmol/l dusíku (Tab. 10). Médium takto obohacené o zdroj dusíku bylo vysterilizováno a zaočkováno izolátem CG 2. Byl proveden další pokus, kdy testované formy dusíku ve 3 variantách: nitrátový [KNO₃ + Ca(NO₃)₂], amonný (NH₄Cl) a organický (aminokyselina asparagin) byly přidávány

do média v množství nahrazující 2,7 mmol/l dusíku. Postup byl stejný jako v případě látek přidávaných do média v množství 27 mmol/l dusíku.

Tab. 9: Složení modifikovaného média LG 2 - n.

složka	množství
destilovaná voda	900 ml
0,1 M Sonneveldův roztok - N	100 ml
KH ₂ PO ₄	100 mg
roztok C (FeNaEDTA)	10 ml
roztok E (mikroprvky)	10 ml
glukóza	8 g
agar	8 g

Tab. 10: Množství nitrátové, amonné a organické formy dusíku přidávané do média LG 2 - n.

27 mM N varianta	KNO ₃ v g/l	Ca(NO ₃) ₂ v g/l	NH ₄ Cl v g/l	asparagin v g/l
nitrátový N	0,193	2,922	-	-
amonný N	-	-	1,43	-
organický N	-	-	-	2

3.6.5 Vliv různých poměrů nitrátového a amonného dusíku na růst mycelia

Byly testovány různé poměry nitrátového dusíku KNO₃, Ca(NO₃)₂ a amonného dusíku NH₄Cl na růst mycelia. Nitrátový dusík byl vždy přidáván do média LG 2 - n (Tab. 9) tak, aby celková koncentrace v médiu byla 27 mmol/l (Tab. 10). Spolu s nitrátovým dusíkem byl do média přidáván amonný dusík v 6 různých variantách 0-2,7 mmol N/l (Tab. 11). Celková koncentrace dusíku byla na všech stanovených variantách stejná, tj. 27 mmol/l. Kontrolní varianta obsahovala pouze nitrátový dusík. Médium LG 2 - n takto obohacené o zdroj dusíku bylo zaočkováno izolátem CG 2.

Tab. 11: Množství amonného dusíku přidávaného společně s nitrátovým do média LG 2 – n.

koncentrace N (mM)	NH₄Cl v mg/l
2,7	7,5
1,9	5,25
1	3
0,27	0,75
0,1	0,3
0,027	0,075
0 (kontrola)	0

3.6.6 Vliv amoniaku na růst mycelia

Do jedné poloviny Petriho misky bylo připraveno médium LG 2 – org + ž, kde želatina sloužila jako jediný zdroj uhlíku a dusíku a také jako zdroj plynného amoniaku (Tab. 12). Do druhé poloviny bylo připraveno médium LG 2 – org + g (Tab. 13). Obě média byla současně zaočkována izolátem CG 2. Kontrolní misky obsahovaly pouze médium LG 2 – org + g .

Tab. 12: Složení média LG 2 – org + ž.

množství média	1 liter
destilovaná voda	900 ml
0,1 M Sonneveldův roztok - N	100 ml
agar	8 g
želatina	5 g

Tab. 13: Složení média LG 2 – org + g.

množství média	1 liter
destilovaná voda	900 ml
0,1 M Sonneveldův roztok	100 ml
agar	8 g
glukóza	5 g

3.6.7 Vliv organické a anorganické formy dusíku a fosforu na růst mycelia

Byla testována organická (DNA) a anorganická forma dusíku a fosforu na růst mycelia při zachování stejného poměru N:P (15,5:9,6) vypočítaného ze složení DNA tak, aby celkové množství C:N:P zůstalo stejné³. Byly založeny 4 varianty s dusíkem a fosforem (Tab. 14) a kontrolní varianta s 5 g/l glukózy, se základním médiem LG 2 – N (Tab. 6). Agarové médium kontrolní varianty a varianty obohacené o zdroj organické formy dusíku a fosforu bylo zaočkováno izolátem CG 2. Tekuté⁴ médium obohacené o anorganickou formu dusíku a fosforu bylo nalito v množství 25 ml do Erlenmeyerových baněk (50 ml) a zaočkováno izolátem CG 2 .

Tab. 14: Anorganická a organická forma dusíku a fosforu přidávaná do média LG 2 – N.

varianta č.	DNA g/l	DNA g/l	Ca(NO ₃) ₂ + KH ₂ PO ₄ + glukóza v g/l	Ca(NO ₃) ₂ + KH ₂ PO ₄ + glukóza v g/l
1	5	-	-	-
2	-	15	-	-
3	-	-	6,53 + 2,11 + 3,745	-
4	-	-	-	19,7 + 6,316 + 11,235

3.6.8 Růst na DNA (vnitrodruhová variabilita)

Byl testován růst 7 kmenů *Langermannia gigantea* (Tab. 1, mimo izolátu CG 17) na DNA jako jediném zdroji dusíku. DNA byla přidána do média LG 2 - N (Tab. 6) v množství 5 g/l. Připravené médium bylo zaočkováno sbírkovými izoláty.

3.6.9 Růst na chitin (vnitrodruhová variabilita)

Byl testován růst 7 kmenů *Langermannia gigantea* (Tab. 1, kromě izolátu CG 17) na chitin jako jediném zdroji dusíku. Chitin (viz příprava chitinu 3.5) byl přidán do média LG 2 – N (Tab. 6) v množství 5 g/l. Připravené médium bylo zaočkováno sbírkovými izoláty.

³ tj. 0,775 g/l N a 0,480 g/l P pro variantu č. 1 a 3; (3x větší koncentrace) 0,2325 g/l N a 1,440 g/l P pro variantu č. 2 a 4.

⁴ Agarové médium neztuhlo zřejmě vlivem vysokých koncentrací minerálních látek, proto bylo použito médium bez agaru.

3.6.10 Vliv různých poměrů nitrátového dusíku a chitinu na represi chitinázy

Byly testovány různé poměry nitrátového dusíku [ve formě KNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$] a chitinu na růst mycelia. Nitrátový dusík byl přidáván do média LG 2 – N (Tab. 6) s 5 g/l chitinu v množství 0-27 mM N. Byly založeny 4 varianty a kontrola (Tab. 15). Médium takto obohacené o zdroje dusíku bylo zaočkováno izoláty CG 1 a CG 15. V rámci pokusu byl testován také vliv glukózy na represi chitinázy. Byla založena pokusná varianta s glukózou a kontrolní varianta bez glukózy. Glukóza byla přidávána do média LG 2 – N s 5 g/l chitinu (Tab. 6) v množství 5 g/l. Médium bylo zaočkováno izolátem CG 1 a CG 15.

Tab. 15: Různé množství nitrátového dusíku přidávaného do média LG 2 - N (5 g/l chitinu jako zdroj C a N).

varianta č.	chitin v g/l	koncentrace (mM) nitrátového N ve formě [KNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$]
1 - kontrolní	5	0
2	5	0,2
3	5	1
4	5	5,4
5	5	27

3.6.11 Stanovení průběhu degradace chitinu

Koloidní roztok chitinu (viz příprava chitinu 3.5) byl nejprve zhomogenizován v mixeru a poté byl přidán do média LG 2 – N bez agaru (Tab. 6). Médium (20 ml) v 50 ml Erlenmeyerových baňkách bylo vysterilizováno a byla změřena výchozí absorbance (v kyvetě 1 ml 10x ředěného média). Potom bylo médium zaočkováno izolátem CG 1. Stanovení průběhu degradace chitinu bylo zaznamenáváno měřením absorbance při 620 nm (Thomson 2001) po 24 hodinových intervalech po dobu 30 dní.

3.6.12 Schopnost mycelia využívat látky obsažené v mravencích (zdroj chitinu)

Byla testována schopnost mycelia využívat látky obsažené v mravencích (např. chitin) odchycených z naleziště vatovce. Byly založeny 2 varianty: 1) celí mravenci, 2) pouze exoskelet mravenců. 30 mravenců bylo usmrceno při $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Varianta 1): 15 mravenců bylo

rozdrceno ve třecí misce s přidavkem 2 ml destilované H₂O a v mikrozkuhavce vysterilizováno. Bylo připraveno médium podle Tab. 16. Do středu sterilního ztuhlého média byli přidáni rozdrčení mravenci pipetou. Varianta 2): 15 mravenců bylo rozdrčeno ve třecí misce s přidavkem 2 ml destilované H₂O a umístěno do mikrozkuhavky, 3x promyto destilovanou H₂O a zcentrifugováno (1000 g/ 1,5 min.). Zbylé nerozpustné části hmyzího těla byly suspendovány ve 2 ml destilované H₂O a vysterilizovány. Do středu ztuhlého sterilního média byla přidána chitinová kostra mravenců pipetou v objemu 200 µl. V obou variantách bylo médium LG 2 – org s usmrčenými mravenci zaočkováno izolátem CG 1. Interakce s mravenci se vyhodnocovala pomocí světelného mikroskopu.

Tab. 16: Složení média LG 2 – org.

množství média	1 litr
destilovaná voda	900 ml
0,1 M Sonneveldův roztok – N	100 ml
agar	8 g

3.6.13 Schopnost mycelia využívat látky obsažené v buněčných stěnách vybraných hub (zdroj chitinu)

Byla testována schopnost mycelia využívat látky obsažené v buněčných stěnách hub. Jako modelové organismy bylo vybráno 6 rodů hub: *Penicillium spinulosum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Trichoderma sp.*, *Chrysosporium pannorum*, *Fusarium solani* a *Aspergillus versicolor*. Houby byly kultivovány v tekutém médiu PDA (nezpevněná složka bramboro-glukózového agaru v koncentraci 12 g/l, Sigma) po dobu 14 dní ve tmě při teplotě 25 °C a poté sterilizovány 25 minut při teplotě 121 °C. Vzorky sterilizovaného mycelia hub (Tab. 17) byly v mikrozkuhavkách promíchány s přidavkem 1,5 ml destilované H₂O, 3x centrifugovány (1000 g/ 1,5 min.) a 3x promyty destilovanou H₂O tak, aby zbyly jen nerozpustné části hub, zejména buněčná stěna. Takto připravený vzorek byl umístěn na povrch média LG 2 – org (Tab. 16) v Petriho miskách. Na povrch média, 1 cm od promytého mycelia vláknité houby byl zaočkován izolát CG 1. Interakce s buněčnými stěnami hub se vyhodnocovala pomocí světelného mikroskopu.

Tab. 17: Hmotnost vláknitých hub přidávaných do média 1 Petriho misky.

druh houby	hmotnost/mg
<i>Penicillium spinulosum</i>	3
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	10
<i>Trichoderma sp.</i>	6
<i>Chrysosporium pannorum</i>	3
<i>Fusarium solani</i>	5
<i>Aspergillus versicolor</i>	2

3.6.14 Pokus o formulaci selektivního média

Byla testována schopnost vybraného média LG 2 – N s 5 g/l chitinu (Tab. 6) selektivně podporovat růst *Langermannia gigantea*. Kontrolní variantu představovalo médium LG 2 – N (Tab. 6) s 5 g/l kvasničného extraktu. Půda byla zhomogenizována v třecí misce a z 1 gramu půdy byla připravena půdní suspenze (3 varianty ředění: 10^2 , 10^3 , 10^4). Na obě sterilní média bylo v každém místě rozetřeno 200 μ l půdní suspenze po celém povrchu. Média byla zaočkována izolátem CG 1. Vyhodnocení bylo provedeno vizuálně srovnáním počtu vyrostlých mikrobiálních kolonií s kontrolní variantou příslušného ředění a schopnosti růstu mycelia spolu s ostatními mikroorganismy za daných podmínek.

3.6.15 Schopnost mycelia využívat látky obsažené v bakteriích

Byla testována schopnost mycelia využívat látky obsažené v bakteriích a aktinomycetách izolovaných z půdy. Půda byla zhomogenizována v třecí misce a z 1 gramu půdy byla připravena půdní suspenze (3 varianty ředění: 10^4 , 10^5 , 10^6). Bylo připraveno médium na pěstování bakterií (Tab. 18) a pH bylo nastaveno na 7. Na médium bylo skleněnou tyčinkou („hokejkou“) rozetřeno 200 μ l půdní suspenze po celém povrchu. Narostlé bakteriální kolonie byly po 3 týdnech inkubace přeočkovány a ponechány inkubovat opět 3 týdny. Pod mikroskopem byla vybrána vždy 1 oddělená mikrobiální kolonie (Obr. 7), která byla přeočkována a inkubována 3 týdny (Obr. 8). Tato kolonie byla poté přemístěna do 100 ml Erlenmeyerových baněk do tekutého média (25 ml) a inkubována další 3 týdny. Pomocí odpařené poměrné části promyté bakteriální kultury byla vypočítána koncentrace bakterií (32 mg/25 ml) a aktinomycetů (53 mg/25 ml) v suspenzi. Narostlé bakterie byly odcentrifugovány

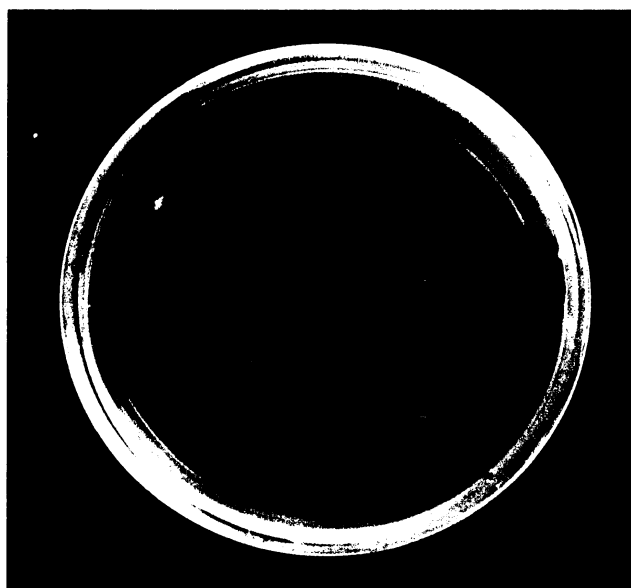
(15 000 g/ 10 min.), promyty destilovanou H₂O (Fermor a Wood 1981) a přidány do média LG 2 - org (Tab. 16). Médium bylo zaočkováno izolátem CG 2.

Tab. 18: Médium pro pěstování bakterií.

množství média	1 liter
destilovaná voda	900 ml
Sonneveldův roztok 0,1 M	100 ml
malt extrakt	1 g
agar	8 g



Obr. 7: Narostlé bakteriální kolonie po 3 týdnech inkubace a zakroužkovaná 1 oddělená kolonie (foto Görnerová).



Obr. 8: Bakteriální kultura narostlá z jedné mikrobiální kolonie po 3 týdnech (foto Görnerová).

3.7 Optimalizace kultivace

3.7.1 Vliv teploty na růst mycelia

Experimentálně bylo stanoveno 5 různých kultivačních teplot: 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C. Sterilní médium LG 2 (Tab. 3) bylo zaočkováno izolátem CG 15. Inkubace probíhala v termostatech za experimentálně stanovených teplot. Byl vyhodnocován průměrný poloměr kolonie a narostlá biomasa (sušina). Při stanovení sušiny se vyřízl agarový bloček s inokulem a narostlá myceliální kolonie byla v baňce s 20 ml destilovanou H₂O a 2 ml NaOH zahřáta v mikrovlnné troubě po dobu 2 minut a 3x promyta destilovanou H₂O. Obsah baňky byl přefiltrován a mycelium bylo vysušeno.

V rámci ověření teplotního optima byly testovány další 3 sbírkové izoláty CG 1, CG 11 a CG 17 z jiných lokalit (Tab. 1). Postup byl stejný jako v případě odhadu teplotního optima izolátu CG 15.

3.7.3 Vliv aerace na růst mycelia

Byla stanovena varianta v třepané kultuře a kontrolní (bez třepání). Médium LG 2 (Tab. 3) bez agaru (100 ml) ve 250 ml Erlenmeyerových baňkách bylo vysterilizováno a zaočkováno izolátem CG 15. Byl vyhodnocován průměrný nárůst biomasy. Při stanovení sušiny bylo narostlé mycelium spolu s médiem zahřáto v mikrovlnné troubě

po dobu 2 minut a byla přidána kapka NaOH. Mycelium bylo pak promyto destilovanou H₂O, přefiltrováno a vzniklý koláč z filtru byl vysušen.

3.7.4 Vliv pH na růst mycelia

Experimentálně bylo stanoveno 6 různých hodnot pH: 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0. Do média LG 2 (Tab. 3, bez agaru) byly přidány pufrы (10 mM HEPES, 10mM BIS-TRIS, 10mM MES). Poté byla nastavena požadovaná hodnota pH. Sterilní médium LG 2 (50 ml) ve 100 ml Erlenmeyerových baňkách bylo zaočkováno izolátem CG 2. Byl vyhodnocován průměrný nárůst biomasy. Při stanovení sušiny byla do média s myceliem přidána kapka NaOH. Obsah baňky byl ohříván v mikrovlnné troubě po dobu 2 minut. Mycelium bylo 3x promyto destilovanou H₂O, přefiltrováno a vysušeno.

3.8 Možnosti kultivace vatovce na přírodních substrátech *in vitro*

3.8.1 Růst mycelia na odpadních substrátech – čistírenském kalu a pilinách ze železničních pražců

Byla testována schopnost růstu mycelia na 2 odpadních substrátech: čistírenském stabilizovaném kalu a pilinách z impregnovaných železničních pražců. Byly založeny 2 varianty (s pilinami + perlitem, s kalem) a kontrola (perlit). Ke kultivaci byly použity 100 ml Erlenmeyerovy baňky. Kal byl nasypán do baněk ve vrstvě cca 2 cm, piliny + perlit ve vrstvě 1 cm. Do obou substrátů byl přidán minerální Sonneveldův roztok (30 ml) a glukóza (8 g/l). Kontrolní varianta s perlitem (2 cm) byla zvlhčena 30 ml tekutého média LG 2 (Tab. 2). Takto připravené substráty byly vysterilizovány a zaočkovány izolátem CG 2. Vyhodnocení bylo provedeno vizuálně podle pokryvu vrstvy kalu myceliem vatovce.

3.8.2 Růst mycelia v půdě v přítomnosti chitinu (zdroj energie)

Byla testována schopnost růstu mycelia ve sterilní půdě v přítomnosti chitinu. Sterilní ovlhčená půda (viz kapitola 3.2) byla umístěna v množství po 22 gramech na Petriho misky. Byla založena varianta s chitinem jako zdrojem energie (zdroj uhlíku a dusíku). Chitin byl přidáván do půdy v množství 0,22 gramů, tj. 1 % suché hmotnosti půdy (Gryndler et al. 2003). Kontrolní variantu představovala půda s přidáním nitrátovým dusíkem ve formě KNO₃ (pouze zdroj dusíku) ve stejném množství jako ve variantě s chitinem. Půda

byla zaočkována izolátem CG 1. Vyhodnocení bylo provedeno vizuálně, protože data nebylo možno kvantifikovat.

4. VÝSLEDKY

4.1 Rozdělení charakteru růstu

Všechny látky testované jako zdroje uhlíku nebo dusíku byly rozděleny podle charakteru růstu vatovce (Tab. 19). Výjimku tvoří amonná forma dusíku (NH_4Cl), kde byl růst naprosto odlišný od ostatních látek (Obr. 3), tzn. velmi pomalý kompaktní růst - husté mycelium o malém poloměru.

Tab. 19: Charakter růstu vatovce na vybraných dusíkatých a uhlíkatých látkách. Charakter růstu I. se liší od růstu II. rovnoměrně hustým kompaktním růstem mycelia. Pro charakter růstu II. je typické řídké vatovité mycelium.

charakter růstu I.	charakter růstu mezi I. a II.	charakter růstu II.
N-acetylglukózamin dextrin	chitin DNA	želatina kyselina močová kys. 3,5-dinitrosalicylová celulóza kys. p-hydroxybenzoová

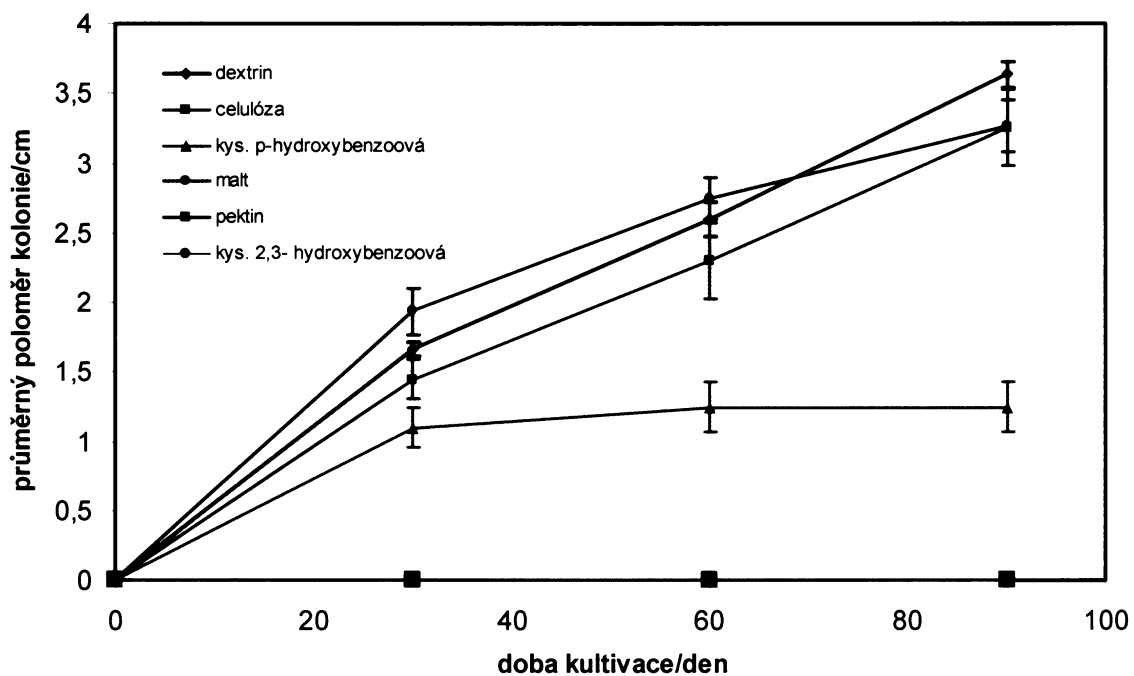
4.2 Posouzení kultivačních nároků na umělých živných médiích

4.2.1 Růst mycelia vatovce na různých zdrojích uhlíku

Nejlepšími využitelnými zdroji organického uhlíku (Graf 1) z testovaných látek jsou celulóza a dextrin. Již po 1 měsíci na nich prospíval vatovec lépe, než na kontrolním médiu. Na kyselině 2,3-dihydroxybenzoové a pektinu se kolonie vatovce nezvětšovala, na rozdíl od kyseliny p-hydroxybenzoové, kde vatovec rostl, ale po 1 měsíci došlo k inhibici růstu. Koncentrace všech testovaných uhlíkatých látek byla 13 g/l.

Graf 1: Růst izolátu CG 2 na různých zdrojích uhlíku (13 g/l).

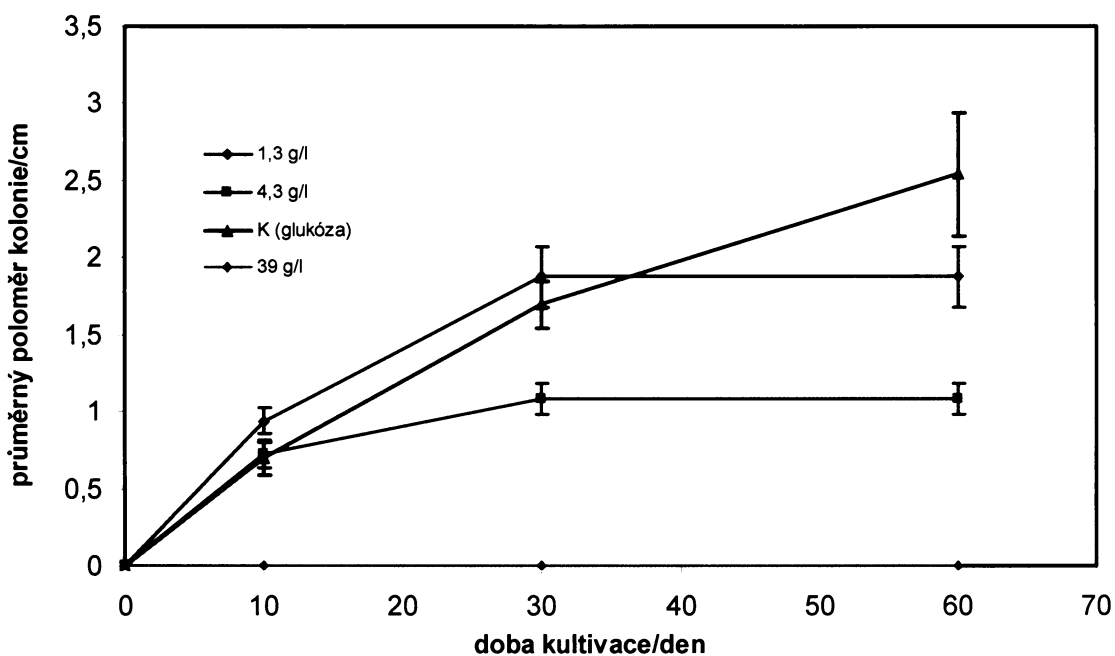
Vysvětlivky: malt – kontrolní médium LG 2 – C (malt extrakt v koncentraci 13 g/l); chybové úsečky ukazují 95% interval spolehlivosti, n (počet opakování) = 6.



4.2.2 Růst mycelia na různých koncentracích kyseliny p-hydroxybenzoové

Houba dobře snáší kys. p-hydroxybenzoovou v koncentraci přibližně 1 g/l, kde roste stejně po dobu 30 dní inkubace jako na glukóze. Se zvětšující koncentrací se látka stává toxickou a růst se zpomaluje. V množství 39 g/l již houba neroste vůbec (Graf 2).

Graf 2: Růst izolátu CG 2 na kyselině p-hydroxybenzoové (v koncentraci 1,3 g/l, 4,3 g/l a 39 g/l)
Vysvětlivky: K (glukóza) – kontrolní médium LG 2 – C (glukóza v koncentraci 5 g/l); chybové úsečky ukazují 95% interval spolehlivosti, n = 6.

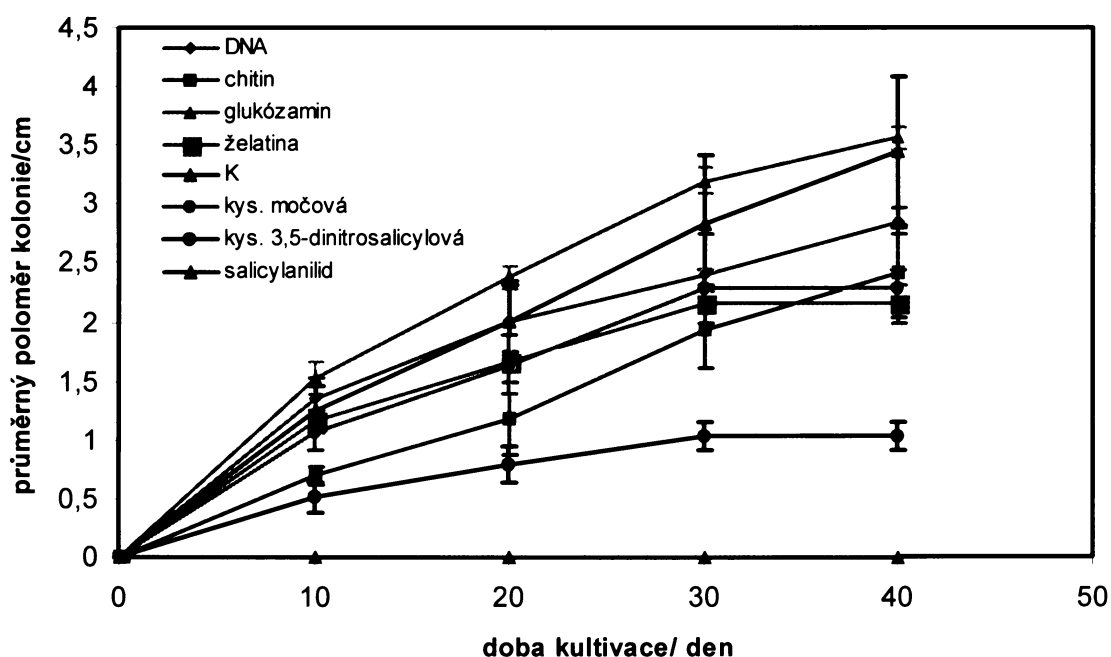


4.2.3 Růst mycelia vatovce na různých zdrojích dusíku

Nejlepším zdrojem dusíku je N-acetylglukózamin, kde houba roste po 20 dnech stejně jako na kontrolním médiu a rychleji než na ostatních zdrojích dusíku. Mycelium prospívá dobře i na DNA a chitin, kde byl růst po 40 dnech stejný jako na kontrolním médiu. Na kyselině močové a želatině houba rostla 1 měsíc stejně jako na kontrolním médiu, chitinu a DNA, další zvětšování kolonie však bylo inhibováno. Na kyselině 3,5-dinitrosalicylové rostla houba stejně jako na chitinu, avšak po 20 dnech velmi zpomaluje a po měsíci dochází k inhibici růstu. Všechny vysokomolekulární dusíkaté látky byly testovány v koncentraci 5 g/l (Graf 3).

Graf 3: Růst izolátu CG 2 na různých zdrojích dusíku⁵ (vysokomolekulární látky v koncentraci 5 g/l, nízkomolekulární látky v koncentraci 22,6 mM N).

Vysvětlivky: K – kontrolní médium LG 2; chybové úsečky ukazují 95% interval spolehlivosti, n = 6.



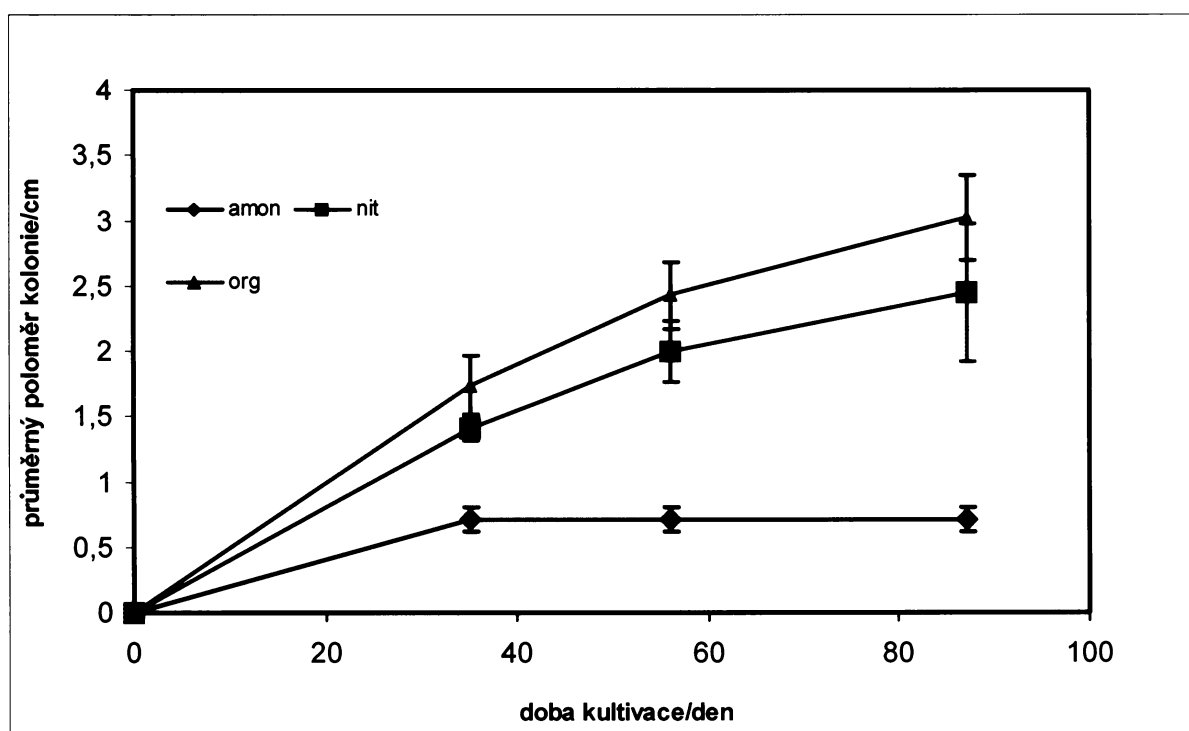
⁵ Médium s močovinou nebylo dostatečně ztuhlé a růst byl neměřitelný, proto není zobrazen v grafu.

4.2.4 Růst mycelia vatovce na nitrátovém, amonném a organickém dusíku

Při porovnání obou grafů vyplývá (Graf 4 a 5), že vatovec není citlivý na celkovou koncentraci dusíku, ale především na formu, v jaké je dusík dodán. Růst mycelia na amonné formě dusíku je pomalý, avšak mycelium je velmi husté (Obr. 3).

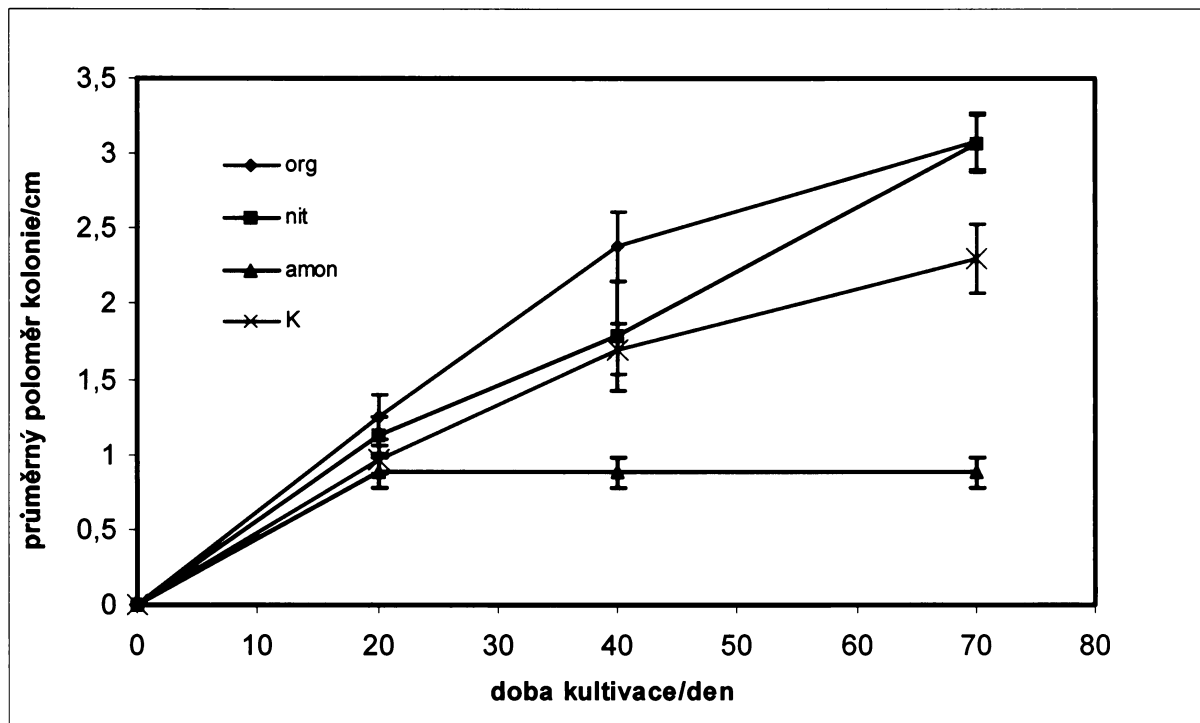
Graf 4: Růst izolátu CG 2 na nitrátovém, amonném a organickém dusíku (2,7 mM N).

Vysvětlivky: amon – amonná forma dusíku, nit – nitrátová forma dusíku, org – organická forma dusíku; chybové úsečky ukazují 95% interval spolehlivosti, n = 6.



Graf 5: Růst izolátu CG 2 na nitrátovém, amonném a organickém dusíku (27 mM N).

Vysvětlivky: K – kontrolní médium LG 2, amon – amonná forma dusíku, nit – nitrátová forma dusíku, org – organická forma dusíku; chybové úsečky ukazují 95% interval spolehlivosti, n = 6.

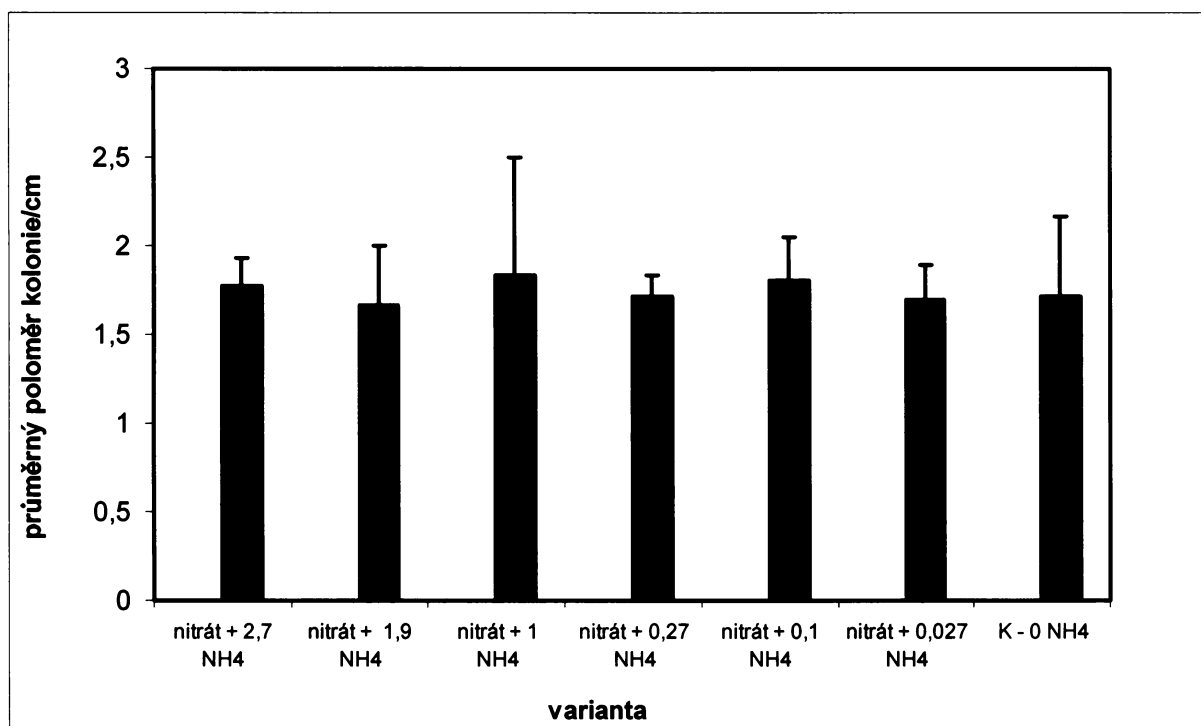


4.2.5 Vliv různých poměrů nitrátového a amonného dusíku na růst mycelia

Z grafu 6 vyplývá, že je houba necitlivá k různým poměrům nitrátového a amonného dusíku v případě, že je k dispozici dostatek nitrátové formy.

Graf 6: Průměrný poloměr kolonie izolátu CG 2 po 50 dnech kultivace na nitrátovém + amonném dusíku (celková koncentrace 27 mM N).

Vysvětlivky: Koncentrace amonného dusíku (NH_4) v jednotlivých variantách viz Tab. 11; chybové úsečky ukazují 95% interval spolehlivosti, $n = 8$.

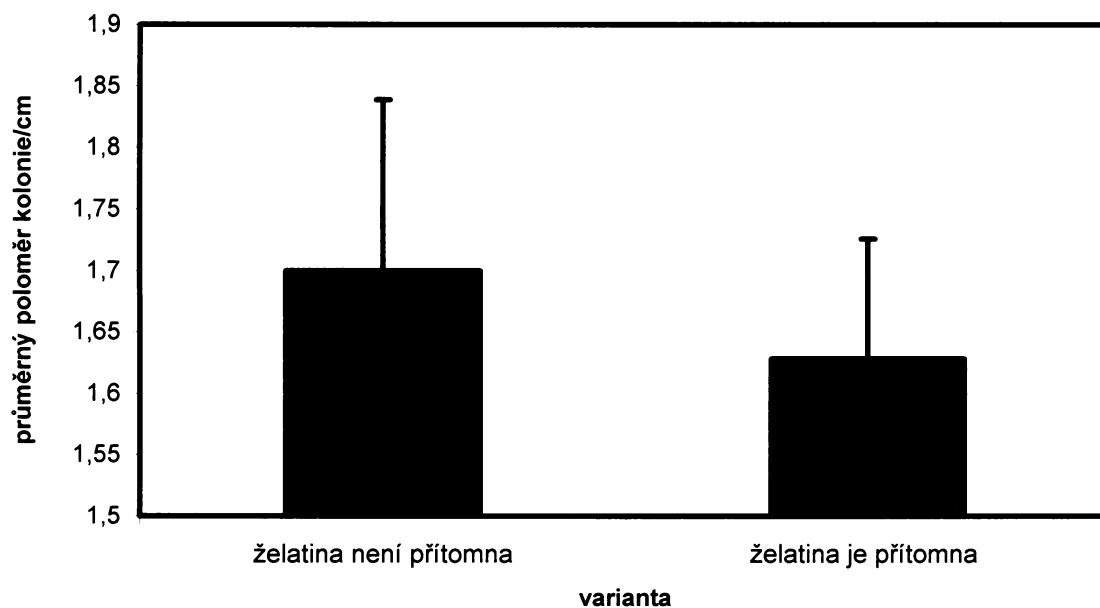


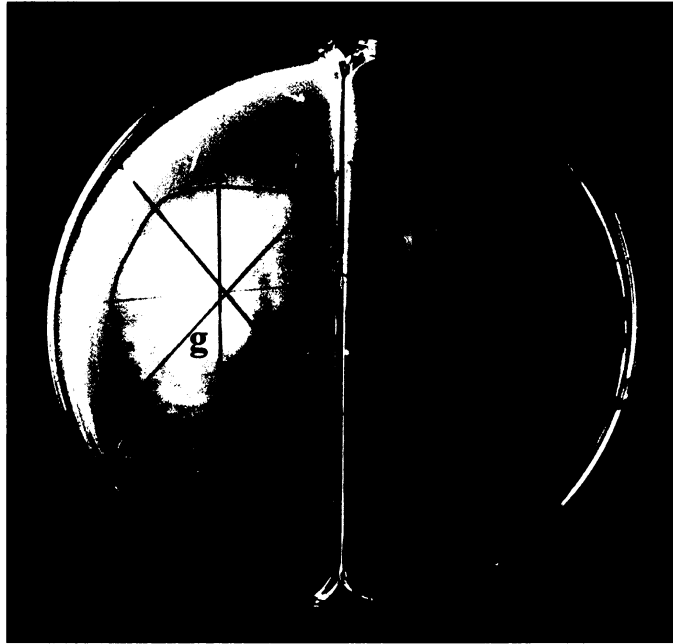
4.2.6 Vliv amoniaku na růst mycelia

V dlench Petriho miskách, v nichž je jedna polovina naplněna médiem (LG 2 – org + ) s latinou (pravděpodobně uvolnujc amoniak) a druhá polovina obsahuje médiem s glukózou (LG 2 – org + g), roste vatovec stejn (v polovině s médiem bez latiny), jako v miskách, kde obě poloviny misky obsahují médiem bez latiny s glukózou (Graf 7).

Graf 7: Vliv amoniaku na růst u izolátu CG 2. Doba kultivace 30 dn.

Vysvětlivky: latina není ptomna – růst na médiu LG 2 – org + g bez vlivu latiny; latina je ptomna – růst na médiu LG 2 – org + g s vlivem latiny; chybové úsečky ukazují 95% interval spolehlivosti, n = 4.





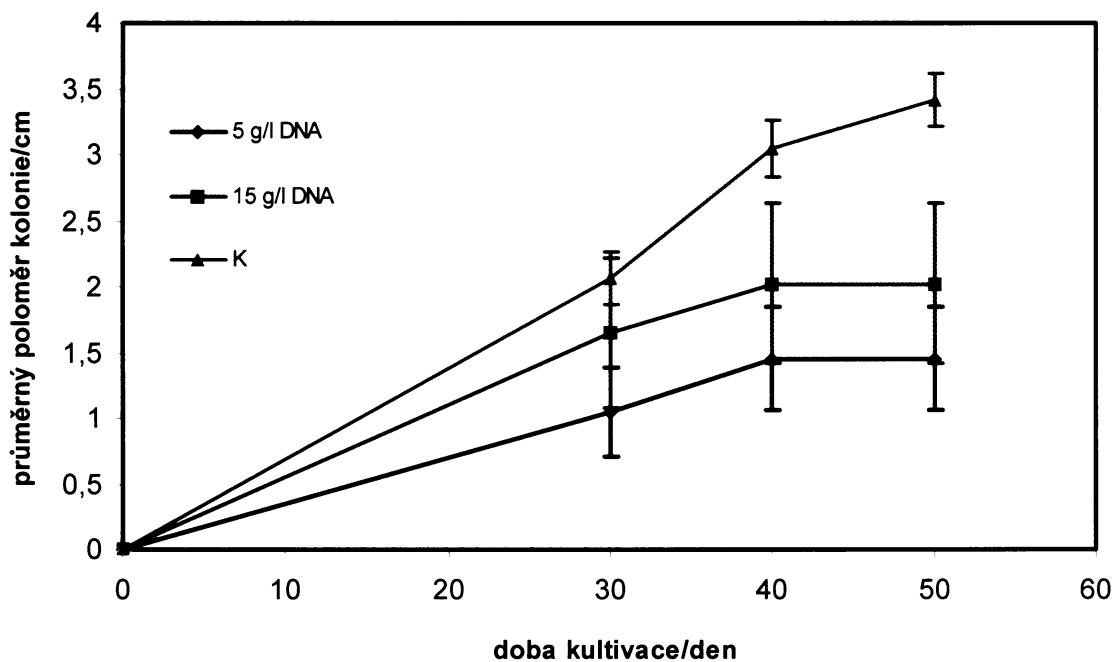
Obr. 9: Na médiu, kde je přítomna želatina je vidět odlišný růst izolátu CG 2 (modře orámovaný průměr narostlé kolonie za 30 dnů) na médiu LG 2 – org + ž ve srovnání s médiem LG 2 – org + g. Vysvětlivky: g – médium LG 2 – org + g, ž – médium LG 2 – org + ž.

4.2.7 Vliv organického a anorganického dusíku a fosforu na růst mycelia

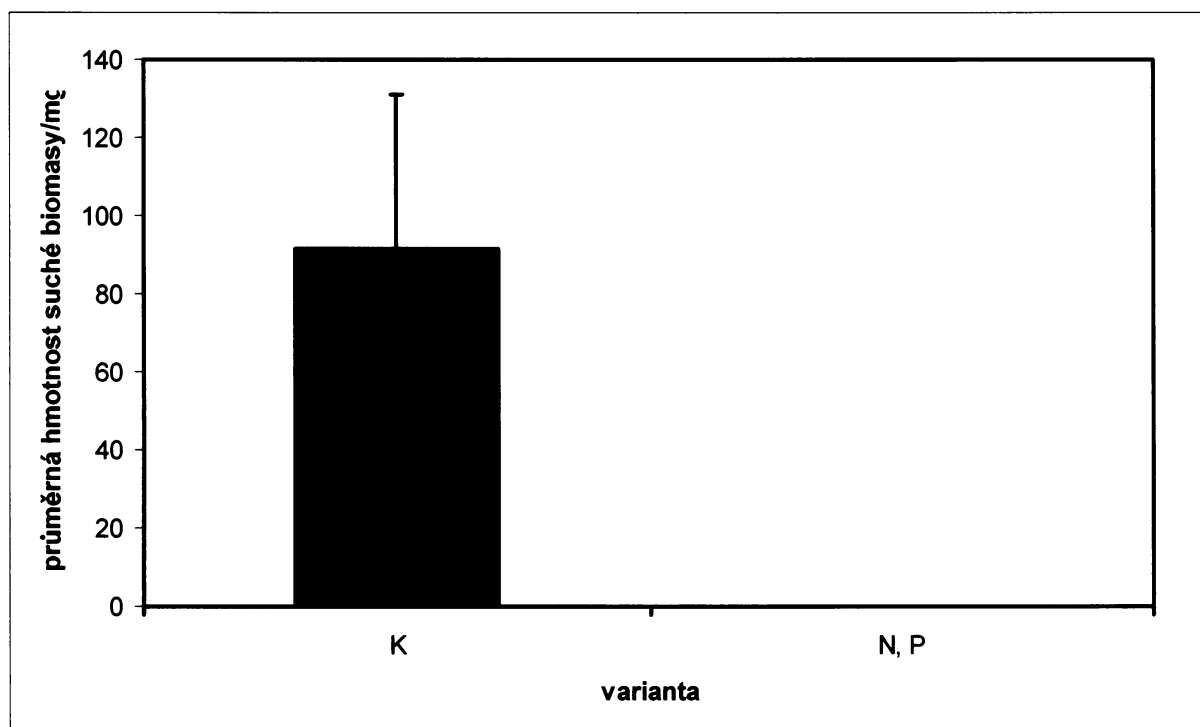
Růst vatovce na 15 g/l DNA je po 1 měsíci kultivace stejný jako na kontrolním médiu, avšak po 40 dnech je další růst inhibován u obou variant s DNA (Graf 8). Na anorganické formě fosforu a dusíku jsou narostlé kolonie o průměru 1-2 mm a biomasa je tudíž neměřitelná (Graf 9).

Graf 8: Růst izolátu CG 2 na organické formě dusíku a fosforu.

Vysvětlivky: 5 g/l DNA - růst na médiu LG 2 - N s kyselinou deoxyribonukleovou (jako jediným zdrojem dusíku) v koncentraci 5 g/l; 15 g/l DNA - růst na médiu LG 2 - N s kyselinou deoxyribonukleovou (jako jediným zdrojem dusíku) v koncentraci 15 g/l; K – růst na médiu LG 2 (kontrolní varianta). Chybové úsečky ukazují 95% interval spolehlivosti, n = 8.



Graf 9: Průměrná hmotnost suché biomasy CG 2 na anorganické formě dusíku a fosforu po 60 dnech. Vysvětlivky: N, P – růst na médiu LG 2 - N s anorganickou formou dusíku a fosforu $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 + \text{KH}_2\text{PO}_4]$ doplněnou o glukózu (zdroj uhlíku) tak, aby celkové množství C:N:P bylo stejné jako v případě chemického složení DNA (Graf 8); K – růst na médiu LG 2 (kontrolní varianta). Chybové úsečky ukazují 95% interval spolehlivosti, $n = 8$.

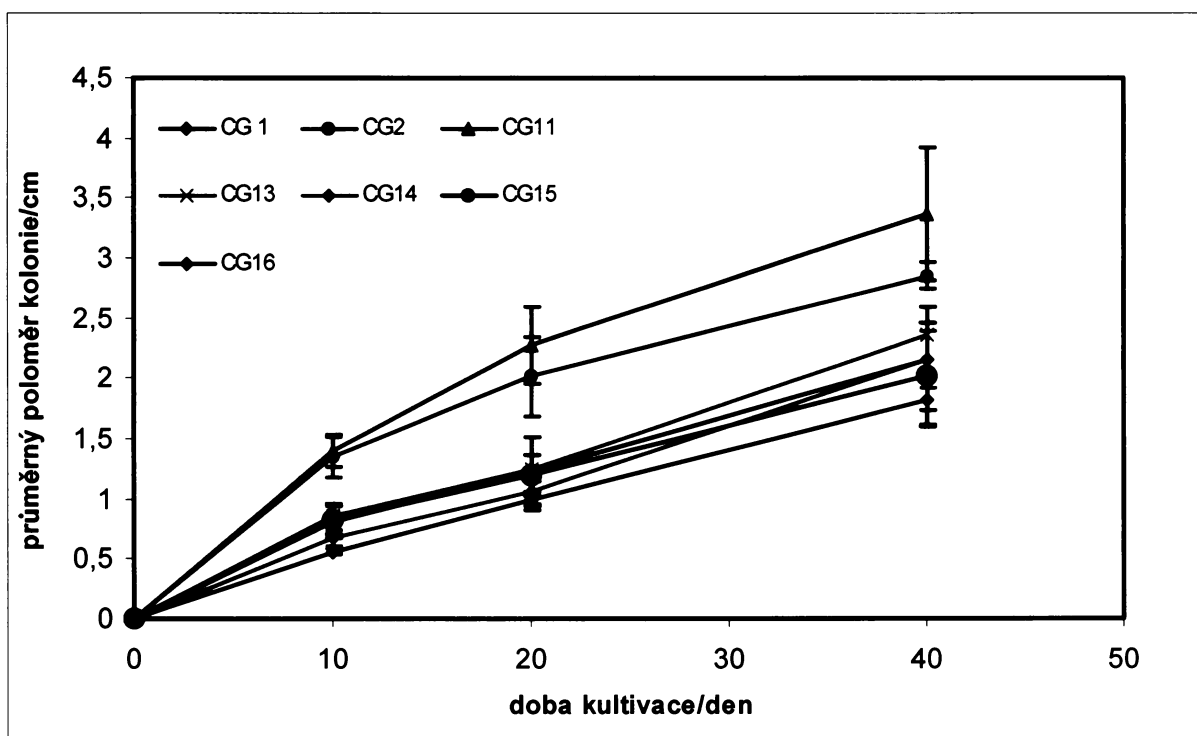


4.2.8 Růst na DNA (vnitrodruhová variabilita)

Všechny kmeny jsou schopny růstu na DNA, i když každý izolát jinou rychlostí. Nejlépe na DNA rostou kmeny CG 2 a CG 11. Ostatní rostou na tomto polymeru podstatně pomaleji (Graf 10 a 11).

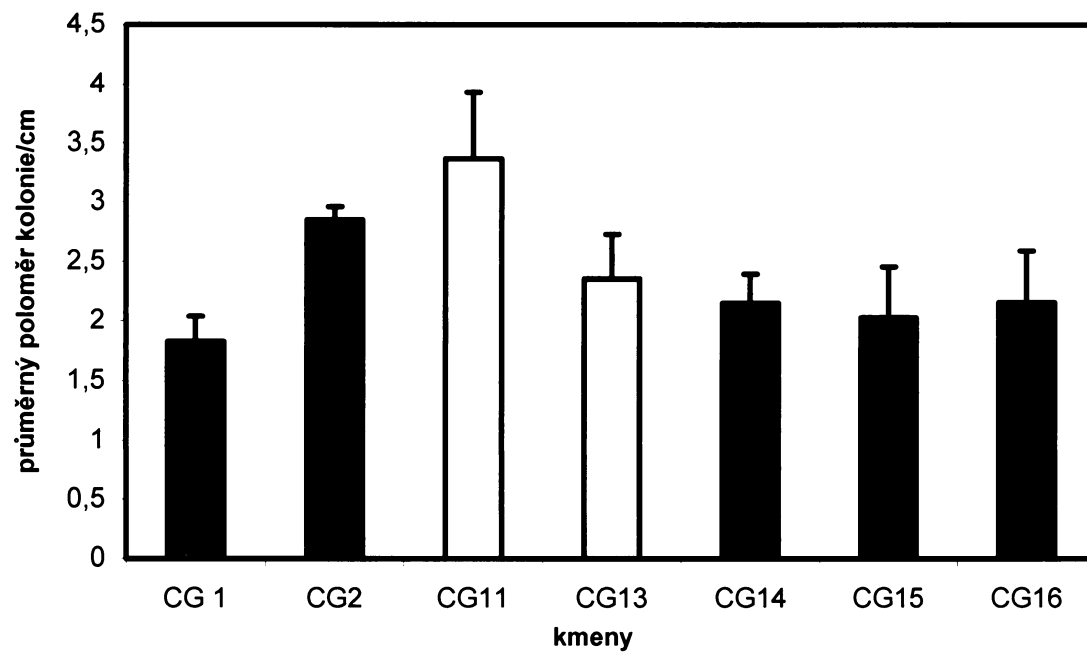
Graf 10: Růst na DNA v koncentraci 5 g/l (vnitrodruhová variabilita).

Vysvětlivky: Chybové úsečky ukazují 95% interval spolehlivosti, n = 6.



Graf 11: Průměrný poloměr kolonie na DNA v koncentraci 5 g/l po 40 dnech (vnitrodruhová variabilita).

Vysvětlivky: Chybové úsečky ukazují 95% interval spolehlivosti, n = 6.

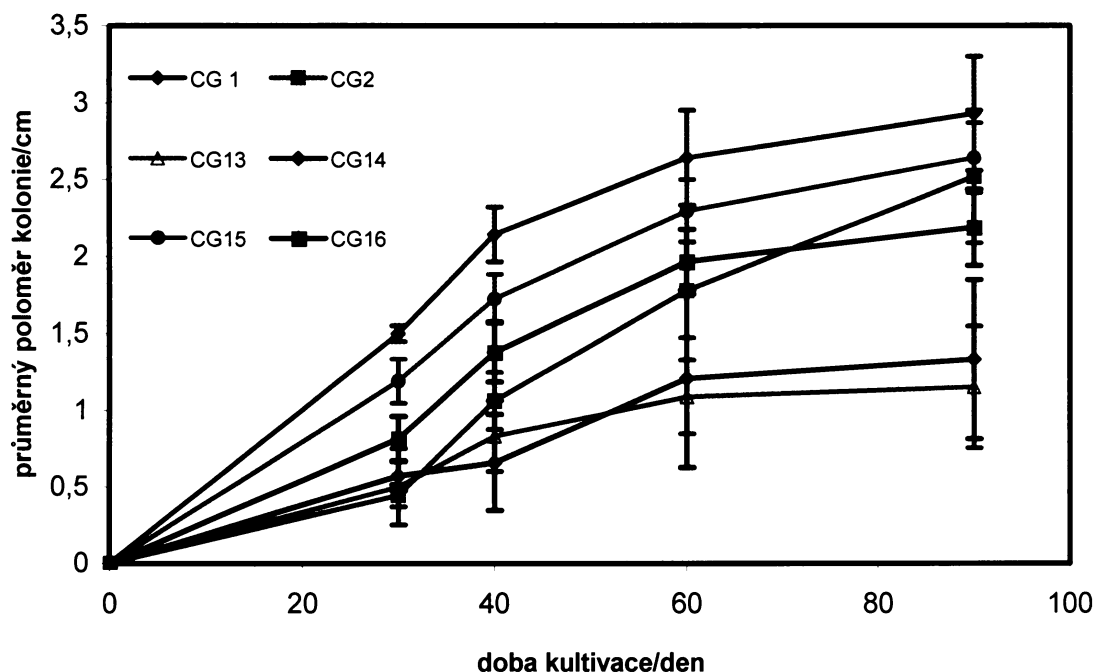


4.2.9 Růst na chitinu (vnitrodruhová variabilita)

Všechny kmeny jsou schopny rozkládat chitin (Graf 12 a 13). V průběhu růstu na této látce se vytvářely číré zóny (Obr. 7), které se shodují s poloměrem narostlé kolonie. Tento poloměr kolonie bylo možné změřit pouze pokud izolát vytvářel zóny, protože médium bylo chitinem zakalené a myceliální kolonie nebyla dobře vidět, pokud nedošlo k projasnění. Zóny byly rovnoměrné bez ohledu na množství narostlé biomasy mycelia. Izolát CG 11 na chitinu rostl, ale nevytvářel zóny. Růst tudíž neměřitelný a není zobrazen v grafech. Všechny kmeny rostly a tvořily zóny stejně rychle, s výjimkou kmenů CG 13 a CG 14, jejichž zóny rostly pomaleji.

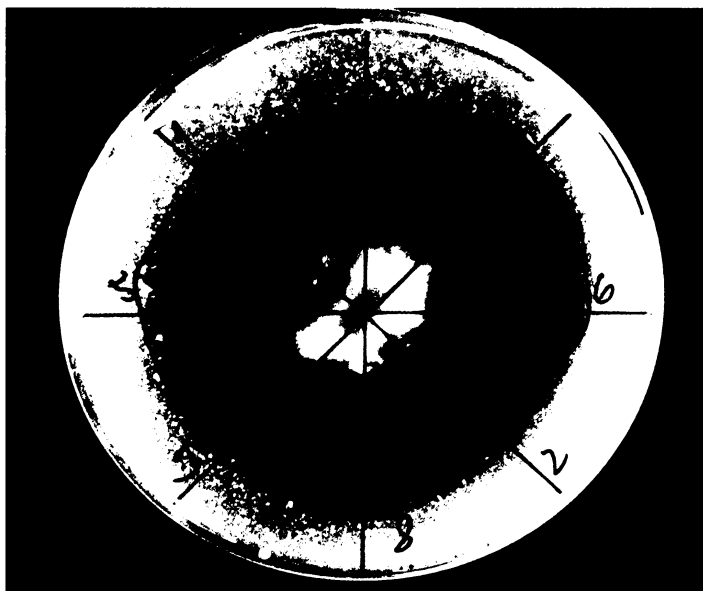
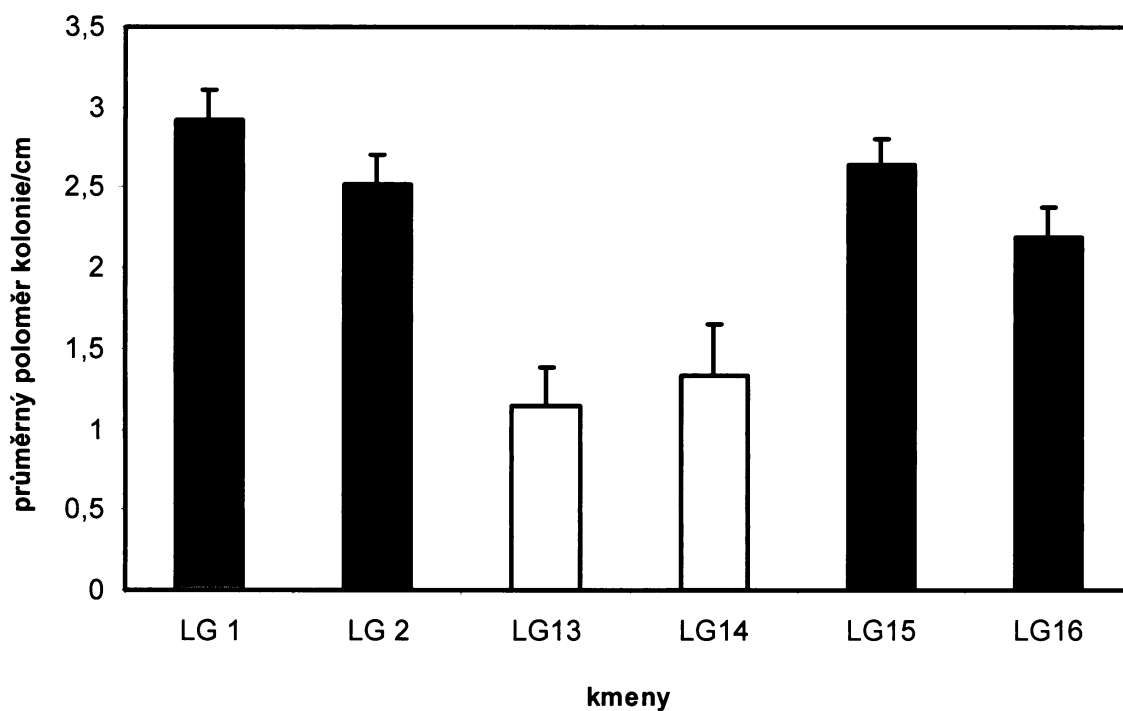
Graf 12: Růst na chitinu v koncentraci 5 g/l (vnitrodruhová variabilita).

Vysvětlivky: Chybové úsečky ukazují 95% interval spolehlivosti, n = 6.



Graf 13: Průměrný poloměr kolonie na chitinu v koncentraci 5 g/l po 90 dnech (vnitrodruhová variabilita).

Vysvětlivky: Chybové úsečky ukazují 95% interval spolehlivosti, n = 6.



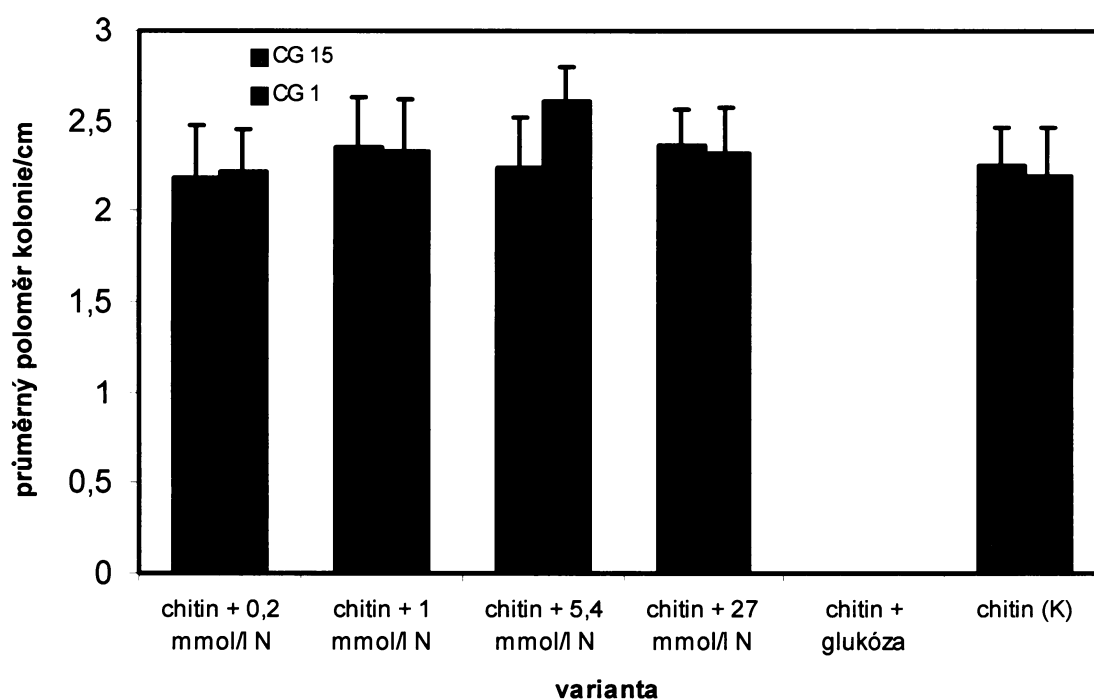
Obr. 7 : Čiré zóny v agaru kolem rostoucí kolonie vatovce pozorované na médiu LG 2 - N s 5 g/l chitinu (foto Görnerová).

4.2.10 Vliv různých poměrů nitrátového dusíku a chitinu na represi chitinázy

Na všech variantách s dusíkem docházelo k tvorbě chitinázy, která byla u vatovce zcela překonána glukózovou represí (Graf 14).

Graf 14: Vliv nitrátového dusíku a glukózy (zdroje uhlíku) na tvorbu a represi chitinázy u izolátů CG 1 a CG 15.

Vysvětlivky: chitin (K): kontrolní médium LG 2 – N bez glukózy s chitinem v koncentraci 5 g/l, chitin + glukóza: glukóza byla přidávána do média LG 2 – N s 5 g/l chitinu v množství také 5 g/l. V dalších variantách byl nitrátový dusík přidán do média LG 2 – N s chitinem (5 g/l) v koncentraci 0,2–27 mM N (Tab. 15). Chybové úsečky ukazují 95% interval spolehlivosti, n = 8.



4.2.11 Stanovení průběhu degradace chitinu

Stanovit časový průběh degradace chitinu v tekuté kultuře se nepodařilo, protože degradace neprobíhala. Nebyl pozorován pokles absorbance v průběhu inkubace.

4.2.12 Schopnost mycelia využívat látky obsažené v mravencích (zdroj chitinu)

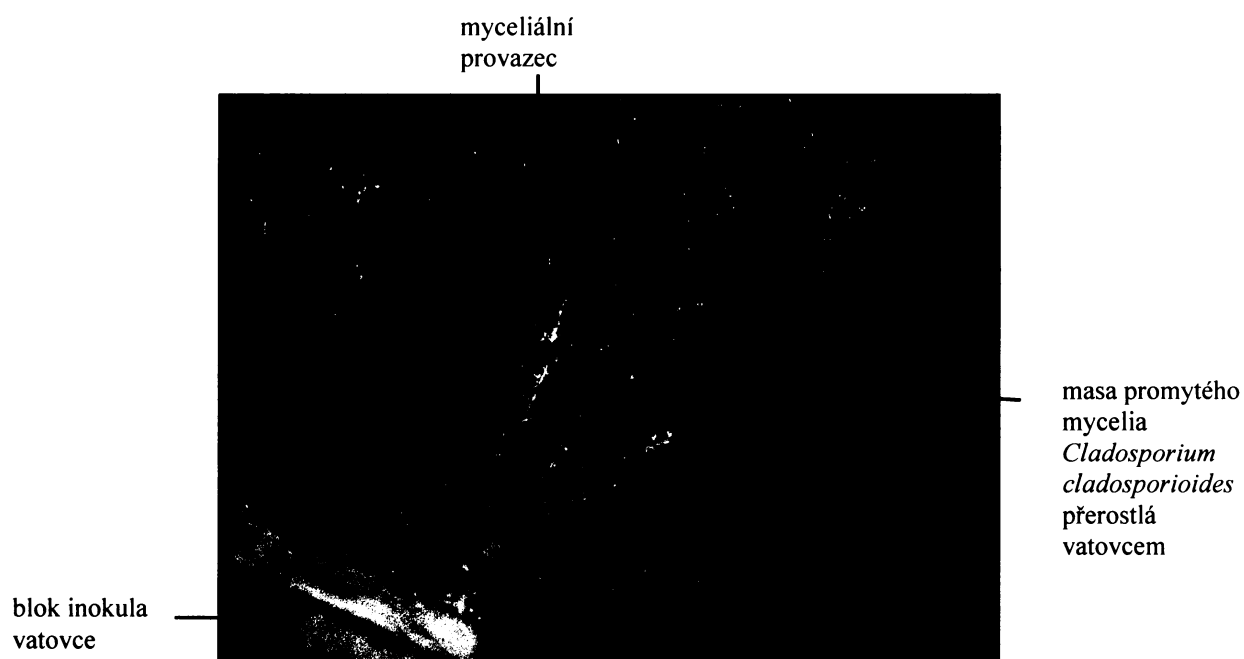
Hypotéza o interakci mycelia s mravenci nebyla potvrzena, protože nebyla zjištěna asociace mycelia s promytými exoskelety mravenců.

4.2.13 Pokus o formulaci selektivního média

Pokus nalézt selektivní médium se nezdařil, protože vatovec na vybraném médiu s chitinem v přítomnosti ostatních mikroorganismů nerostl. Je tedy potřeba vatovce kultivovat sterilně a izolovat jej z gleby plodnic.

4.2.14 Schopnost mycelia využívat látky obsažené v buněčných stěnách vybraných hub (zdroj chitinu)

Byla pozorována interakce (Obr. 8–13) s buněčnými stěnami 3 mikroskopických druhů hub (n = 6): *Cladosporium cladosporioides*, *Chrysosporium pannorum* a *Aspergillus versicolor*. V případě dalších testovaných mikroskopických hub nebylo vzájemné působení mycelia vatovce s buněčnými stěnami prokázáno (Obr. 14 a 15).



Obr. 8: Interakce mycelia s buněčnou stěnou druhu *Cladosporium cladosporioides* (zvětšení 6x).

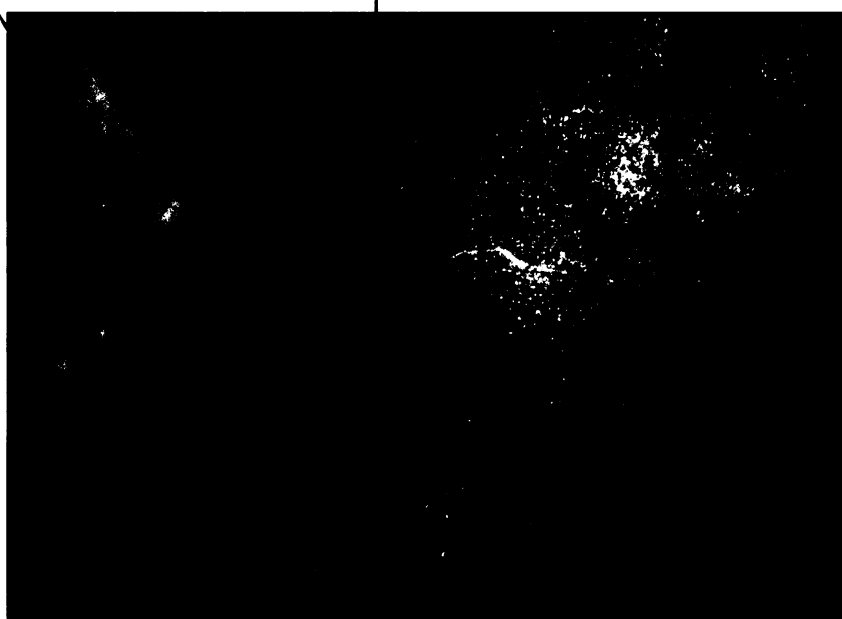
masa promytého
mycelia
Cladosporium
cladosporioides
přerostlá
myceliem
vatovce



Obr. 9: Interakce mycelia s buněčnou stěnou druhu *Cladosporium cladosporioides* (zvětšení 30x).

blok inokula
vatovce

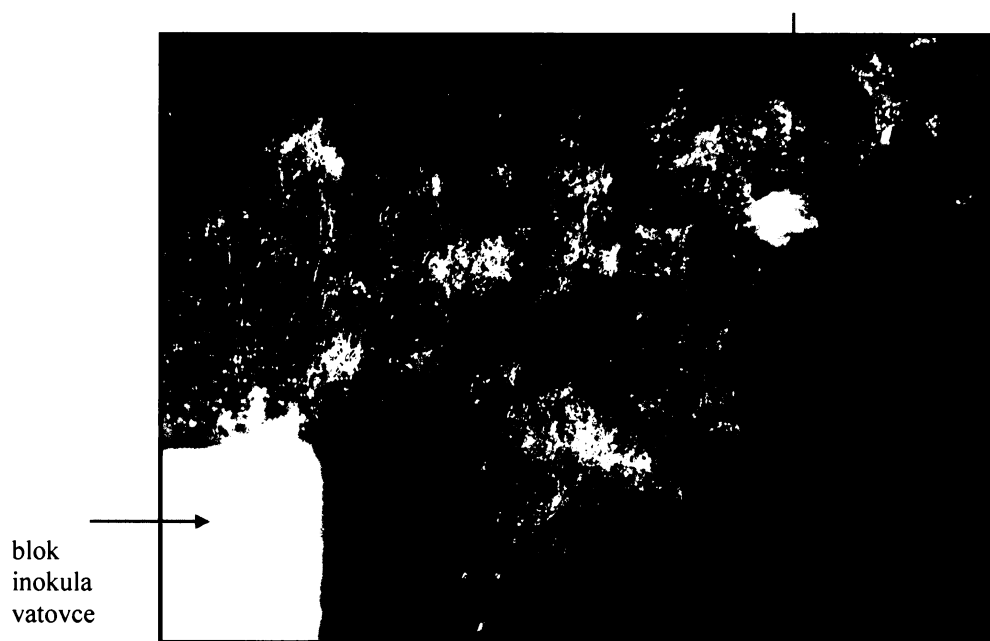
myceliální
provazec



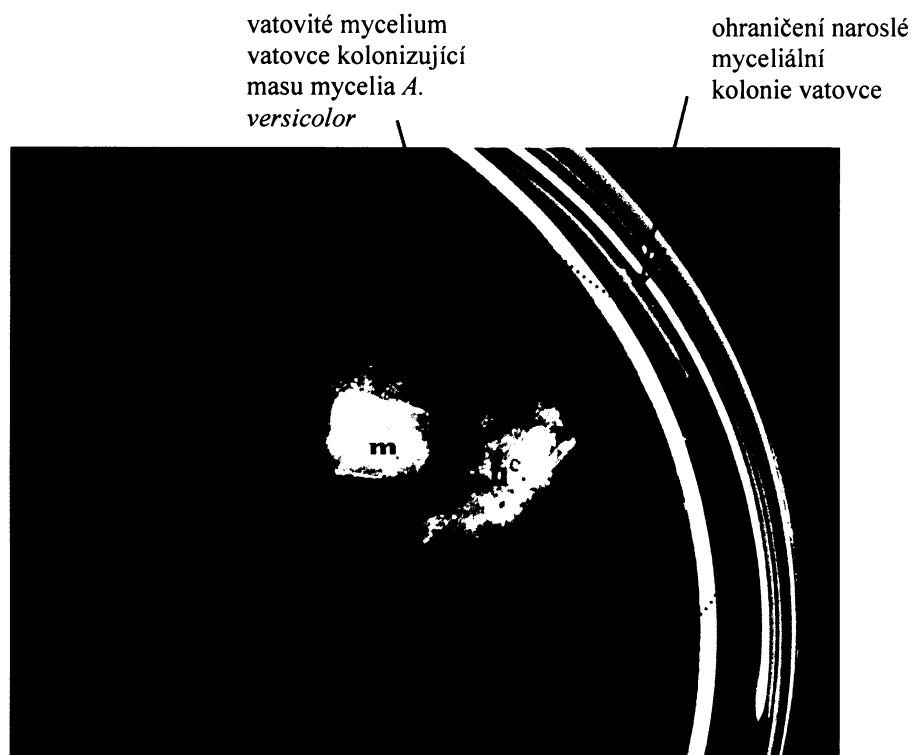
masa promytého
mycelia
Chrysosporium
pannorum
přerostlá
vatovcem

Obr. 10: Interakce mycelia s buněčnou stěnou druhu *Chrysosporium pannorum* (zvětšení 13x).

masa promytého mycelia *Chrysosporium pannorum* přerostlá vatovcem



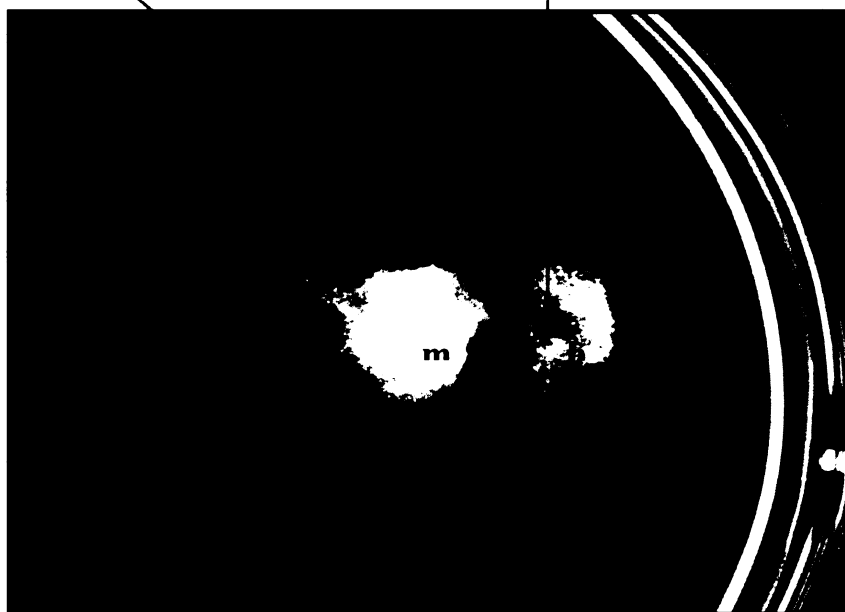
Obr. 11: Interakce mycelia s buněčnou stěnou druhu *Chrysosporium pannorum* (zvětšení 20x).



Obr. 12: Interakce mycelia s buněčnou stěnou druhu *Aspergillus versicolor* (m – mycelium vatovce, h – mycelium *A. versicolor*).

ohraničení narostlé
myceliální kolonie
vatovce

původně černé mycelium *C.*
cladosporioides porostlé
bílým myceliem vatovce



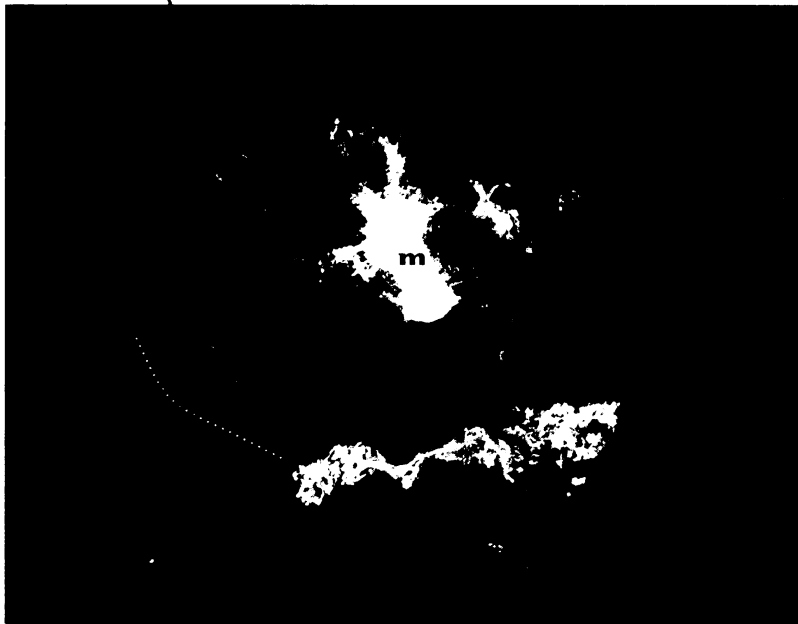
Obr. 13: Interakce mycelia s buněčnou stěnou druhu *Cladosporium cladosporioides* (m – mycelium vatovce, h – mycelium *C. cladosporioides*). Na černošedé mase mycelia *C. cladosporioides* je bílý nárůst mycelia vatovce, který jej téměř zcela překrývá.

ohraničení
narostlé
myceliální
kolonie
vatovce



Obr. 14: Nebyla pozorována interakce mycelia s buněčnou stěnou druhu *Penicillium spinulosum* (m – mycelium vatovce, h – mycelium *P. spinulosum*).

ohraničení narostlé
myceliální kolonie
vatovce



Obr. 15: Nebyla pozorována interakce mycelia s buněčnou stěnou druhu *Trichoderma sp.*
(m – mycelium vatovce, h – mycelium *Trichoderma sp.*)

4.2.15 Schopnost mycelia využívat látky obsažené v bakteriích

Byly pozorovány zóny jako v případě růstu vatovce na koloidním roztoku chitinu, avšak zóny při růstu na odumřelé biomase nebyly dostatečně zřetelné pro fotografování a pokus bude třeba v budoucnu zopakovat s podstatně vyšší biomasou bakterií několika různých druhů.

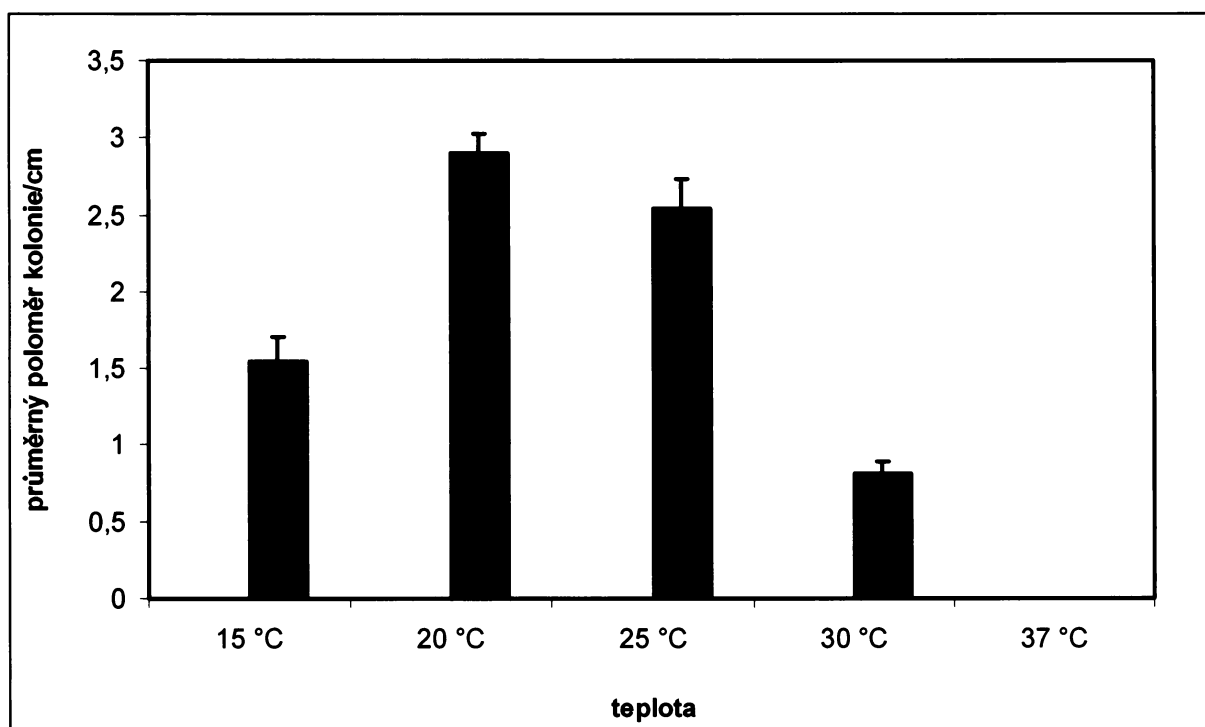
4.3 Optimalizace kultivace

4.3.1 Vliv teploty na růst mycelia

Izolát CG 15 rostl nejlépe při teplotě kolem 20 °C (Graf 15 a 16). Ostatní izoláty CG 1, CG 11 a CG 17 mají růstové optimum mezi 20 a 25 °C (Graf 17 a 18).

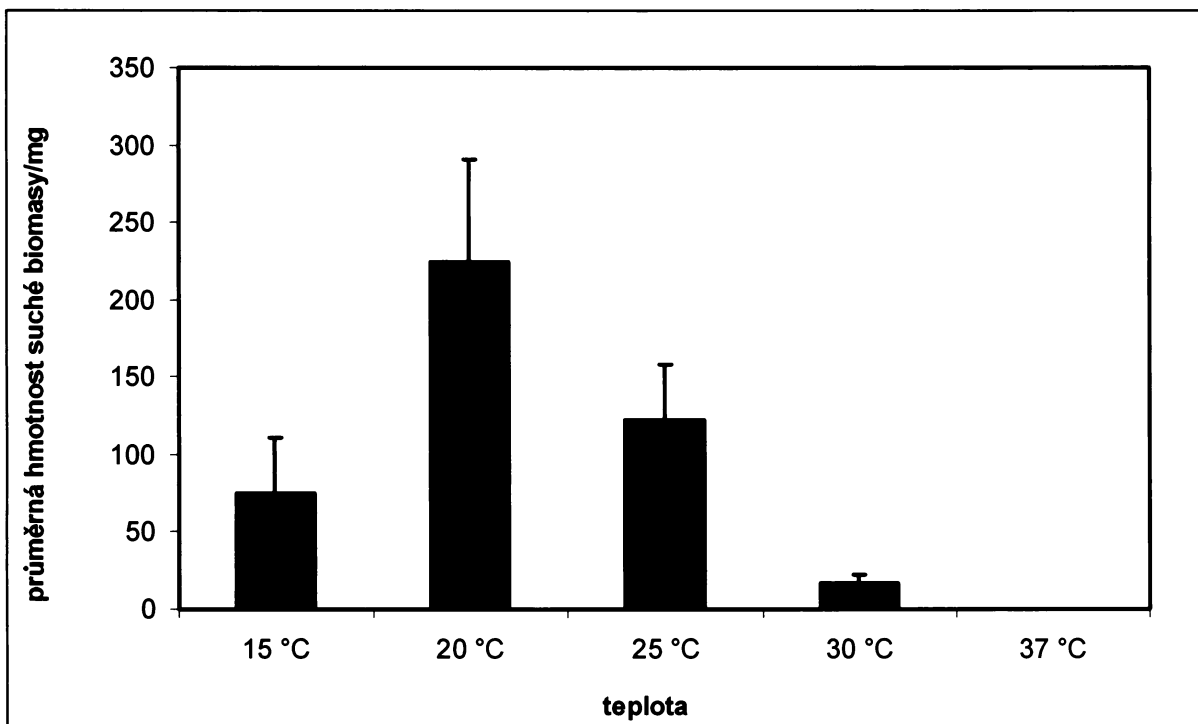
Graf 15: Průměrný poloměr kolonie izolátu CG 15 při různých kultivačních teplotách po 40 dnech.

Vysvětlivky: Chybové úsečky ukazují 95% interval spolehlivosti, n = 6.



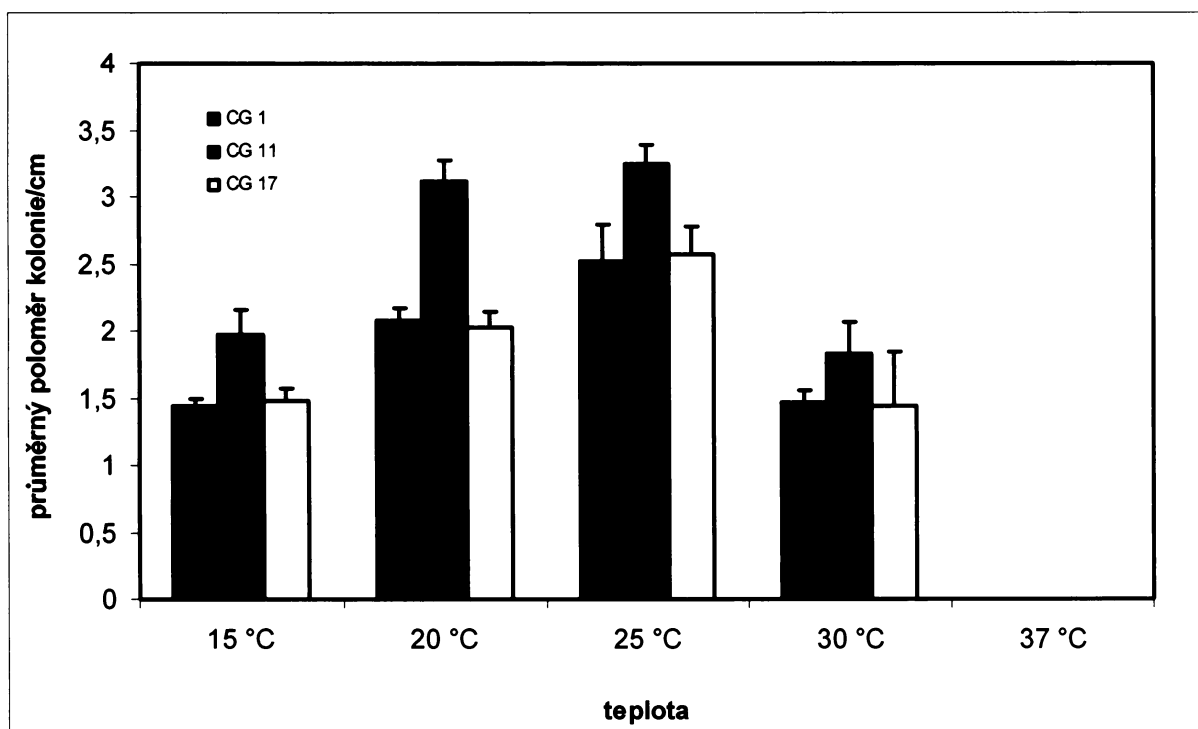
Graf 16: Průměrná hmotnost suché biomasy kolonie izolátu CG 15 po 40 dnech.

Vysvětlivky: Chybové úsečky ukazují 95% interval spolehlivosti, n = 6.



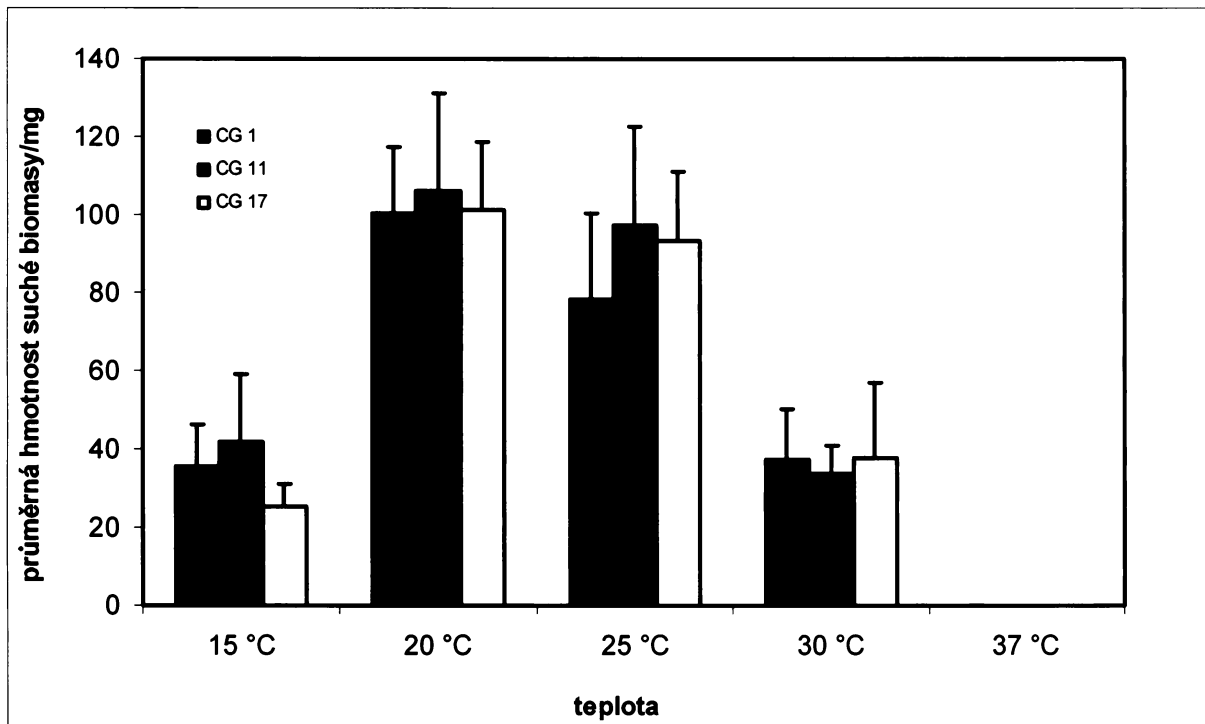
Graf 17: Průměrný poloměr kolonie izolátů CG 1, CG 11 a CG 17 při různých kultivačních teplotách po 40 dnech.

Vysvětlivky: Chybové úsečky ukazují 95% interval spolehlivosti, n = 6.



Graf 18: Průměrná hmotnost suché biomasy kolonie izolátů CG 1, CG 11 a CG 17 po 40 dnech.

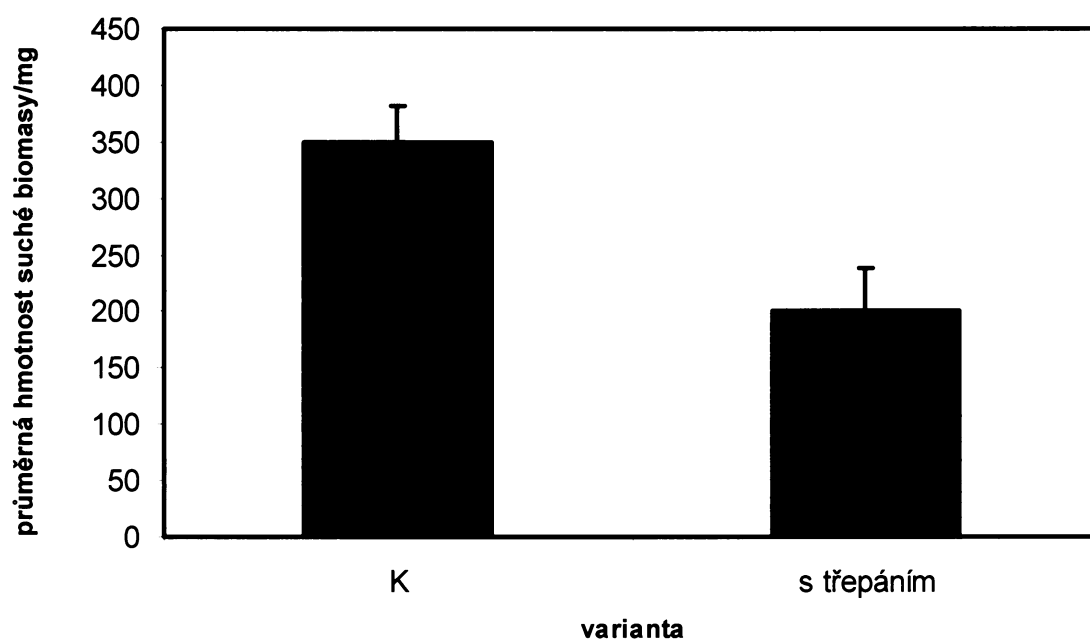
Vysvětlivky: Chybové úsečky ukazují 95% interval spolehlivosti, n = 6.



4.3.2 Vliv aerace na růst mycelia

Výsledky ukázaly, že vatovec nesnáší mechanické otřesy při protřepávání kultury (Graf 19). Zvýšený přísun O_2 zřejmě nestačí vykompenzovat poškození mycelia mechanickým stresem.

Graf 19: Průměrná hmotnost suché biomasy kolonie izolátu CG 2 v třepané kultuře po 60 dnech. Vysvětlivky: K – tekuté kontrolní médium LG 2, s třepáním – tekuté médium LG 2 (třepaná kultura). Chybové úsečky ukazují 95% interval spolehlivosti, $n = 8$.

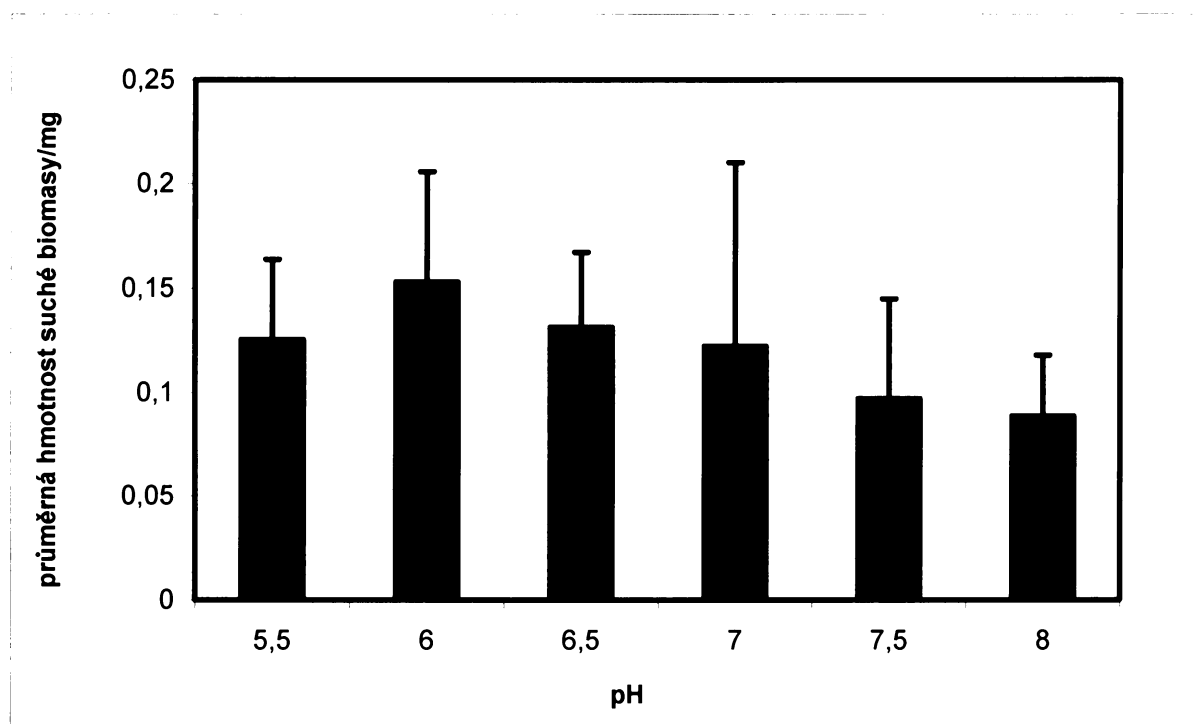


4.3.3 Vliv pH na růst mycelia

Houba rostla přibližně stejně při hodnotách pH 5,5-8 (Graf 20). Organismus tedy nevykazoval průkazné růstové optimum podle pH. Po skončení inkubace nebyly pH hodnoty opětovně změřeny.

Graf. 20: Průměrná hmotnost suché biomasy kolonie izolátu CG 2 při různých kultivačních hodnotách pH po 40 dnech.

Vysvětlivky: Chybové úsečky ukazují 95% interval spolehlivosti, n = 6.



4.4 Možnosti kultivace vatovce na přírodních substrátech *in vitro*

4.4.1 Růst mycelia na odpadních substrátech – čistírenském kalu a pilinách ze železničních pražců

Všechny izoláty rostly dobře na sterilním kalu z čistírky odpadních vod, na rozdíl od pilin z impregnovaných železničních pražců, kde nerostly vůbec. Mycelium 3 izolátů pokrývalo vrstvu kalu zhruba z 50 %, mycelium 2 izolátů ze 30 % a 1 izolát pokrýval kal přibližně ze 70 %.

4.4.2 Růst mycelia v půdě v přítomnosti chitinu (zdroj energie)

V přítomnosti chitinu vatovec rostl na všech opakováních, narozdíl od kontrolní varianty s nitrátem (Tab. 20).

Tab. 20: Růst izolátu CG 2 v půdě s přidaným chitinem (0,01%) a na kontrolní variantě s přidaným nitrátem bez chitinu (n = 6).

Vysvětlivky: Znaménko + označuje zvětšování kolonie, znaménko - nezvětšování kolonie.

opakování č.	růst na půdě s chitinem	růst na půdě s nitrátem
1	+	-
2	+	-
3	+	+
4	+	-
5	+	+
6	+	-

5. DISKUZE

5.1 Posouzení kultivačních nároků na umělých živných médiích

Na základě vlastních výsledků konstatuji, že nejlepším zdrojem organického uhlíku je dextrin. V případě celulózy lze z charakteru růstu usuzovat, že není významnou složku výživy vatovce, protože narostlé mycelium je velmi řídké. Podobně Sedlmayr et al. (1961 b) uvádějí, že z polysacharidů byl nejlepším zdrojem dextrin a celulóza se ukázala být špatným zdrojem organického uhlíku. Uvádějí dále, že houba není schopna využívat celulózu jako zdroj uhlíku a evidentně jí chybí enzym nezbytný pro rozklad tohoto polysacharidu. Zároveň přiznávají, že technika použitá pro testování růstu na celulóze byla nevyhovující. Tudiž schopnost využívat tento polysacharid mohla být inhibována jinými faktory, než jen nedostupností celulózy jako zdroje výživy.

Podle mých pokusů vatovec na kyselině 2,3-dihydroxybenzoové nerostl, na rozdíl od kyseliny p-hydroxybenzoové, která je také obsažena v humusu. Kyselinu p-hydroxybenzoovou snáší dobře v koncentraci 1,3 g/l, kde roste po dobu 1 měsíce stejně jako na glukóze (13 g/l). Po měsíci jsem však pozorovala inhibici růstu. *Langermannia gigantea* tedy může využívat jednoduché fenolické látky jako zdroj uhlíku. Tato houba má enzymový systém nutný k otevření benzenových jader a používá z nich získaný uhlík k biosyntetickým procesům. Schopnost degradovat kondenzované taniny a růst na kyselině p-hydroxybenzoové, kyselině galové, 3,4-dihydrobenzoové a katechinu byla zjištěna již v 90. letech minulého století (Galiotou-Panayotou a Macris 1986). Tato schopnost dává vatovci potenciál využití např. k bioremediačním účelům, kdy je třeba odstranit z prostředí fenolické látky. Takovým substrátem jsou např. piliny z železničních pražců, které jsou impregnovány fenolickými látkami. Dle mých pozorování vatovec na tomto substrátu nerostl, tudíž není pravděpodobně schopen odolat příliš vysoké toxicitě tohoto materiálu.

Výsledky mé práce ukazují, že má houba významné chitinolytické schopnosti. Chitin a chitinolytické enzymy jsou důležité pro použití zejména v biotechnologiích. Hypotéza, která předpokládala inhibici chitinázy v koncentraci 27 mmol/l dusíku byla zamítnuta. Ve všech variantách s dusíkem docházelo k tvorbě chitinázy, tudíž nebylo možno najít optimální koncentraci dusíku, kterou houba potřebuje pro svůj růst na chitinu. Nehéz (1985) uvádí, že se houba vyskytuje v půdě s vysokou koncentrací dusíku pod akátem, bezem a kopřivami.

Optimální koncentraci dusíku však nelze z citovaného pramene též odvodit. Z mých výsledků lze usuzovat, že schopnost vatovce degradovat chitin pravděpodobně není znemožněna v půdě s vysokým obsahem dusíku. Indukce tvorby chitinázy byla však u vatovce zcela překonána glukózovou represí (v koncentraci 0,5%) a houba tedy zřejmě využívá chitin především jako zdroj uhlíku, nemá-li k dispozici lépe dostupný zdroj výživy. Produkce extracelulární chitinázy u vatovce obrovského je v této práci zjištěna poprvé, v literatuře dosud tato schopnost nebyla známa.

Represe chitinázy glukózou je však známa u množství jiných hub a bakterií. U hub hrají chitinázy fyziologickou roli v hyfovém růstu a morfogenezi. Chitinázy jsou dále důležité zejména u entomopatogenních hub, např. u *Metarrhizium anisopliae*. Tato houba produkuje extracelulární chitinázu, když roste na médiu obsahující chitin. Jinými autory byly zkoumány indukční a inhibiční účinky různých cukrů na chitinázu. N-acetylglukózamin má u této houby významnou roli v produkci enzymu a vykazuje dvojí účinek na její regulaci. Při nízkých koncentracích (0,05%) indukuje sekreci enzymu, ale ve vyšších koncentracích (0,5%) ji inhibuje. Tatáž regulace produktem hydrolýzy se objevuje u *Saccharomyces cerevisiae*, kde je produkce enzymu regulována koncentrací glukózy v médiu (Barreto et al. 2004). U bakterií je často testován např. rod *Streptomyces* (saprofytická půdní bakterie), známý svou schopností rozkládat chitin. Mnoho chitinázových genů rodu *Streptomyces* bylo klonováno a sekvenováno. Jejich exprese je indukována chitinem a inhibována glukózou, přesto mechanismus glukózové represe není jasný (Madehavan a Crawford 1997). Chování vatovce obrovského (glukózová represe produkce chitinázy) se shoduje s těmito literárními údaji.

Vnitrodruhová variabilita růstu na chitinu zřejmě souvisí s přírodními podmínkami lokality, odkud byly kmeny izolovány. Všechny kmeny jsou schopny růstu na koloidním chitinu a tvoří průzračné zóny indukující chitinázovou aktivitu s výjimkou kmenu CG 11, který na chitinu roste ale zóny netvoří. Na základě získaných výsledků v této práci není možné zdůvodnit, proč tomu tak je (zda se např. u těchto kmenů významně liší kvalita nebo kvantita vylučované chitinázy).

Zjistila jsem, že růst vatovce není citlivý na samotné koncentrace dusíku, ale závisí především na formě, v jaké je dusík dodán. Růst mycelia na amonné formě dusíku byl v mnou provedených pokusech pomalý, avšak mycelium bylo velmi husté (Obr. 2). Nabízí se proto hypotéza, že amoniak, který vzniká mineralizací organicky vázaného dusíku nebo z přebytku amonných iontů, může být inhibičním signálem ovlivňující růst. Takový signál vysílají některé mikroorganismy. Podle Palkové (Palková et al. 1996) mezi sebou kvasinky vysílají signály ovlivňující morfogenezi kolonií. Amoniak, vysílaný kvasinkovými koloniemi

v pulzech jí byl identifikován jako látka přenášející signál mezi sousedícími koloniemi. Tato látka způsobuje inhibici růstu čelních částí obou kolonií. Stejný fenomén byl pozorován u různých druhů kvasinek.

V případě mých pokusů však amonné ionty jako signální molekuly na vatovce nefungují. Vatovec roste na médiu s glukózou v přítomnosti želatiny stejně jako v kontrolní variantě bez přítomnosti domnělých plynných produktů rozkladu želatiny. Toto pozorování ukazuje, že inhibiční metabolity vzniklé rozkladem dusíkatých látek nedifundují vzduchem, ale pravděpodobně se uvolňují do kapalné složky živného média. Tyto metabolity pak způsobují inhibici růstu vatovce a tím zmenšení rozměrů kolonie a zvýšení hustoty hyf. Inhibiční vliv zvýšené koncentrace dusíku na růst potvrzuje také Nehéz (1985). Z mých výsledků je vidět, že pokud houba roste v prostředí s menší koncentrací amonné formy dusíku, nemá tento poměr na růst žádný vliv, v případě že je k dispozici dostatek nitrátové formy. Z výsledků mé práce vyplývá, že vatovec využívá lépe organicky vázaný fosfor a dusík v DNA než minerální formy těchto prvků. DNA je součástí rostlinného, živočišného a mikrobiálního detritu. Ke své výživě je vatovec zřejmě schopen uvolnit dusík a fosfor z nukleových kyselin do půdy. DNA může sloužit houbám nejenom jako zdroj fosforu a dusíku, ale i jako zdroj organického uhlíku. Výskyt DNA v půdě je závislý na rychlosti mineralizace. DNA může reprezentovat významnou frakci organického fosforu v pomalu mineralizujících půdách (Midgley et al. 2006). Využívání DNA jako zdroje fosforu a dusíku vyžaduje přítomnost fosfodiesteráz (Chen et al. 1999), fosfomonoesteráz a nukleáz (Leake a Miles 1995). DNA je využívána jako zdroj fosforu různými kvasinkami, některými druhy odd. Ascomycota a Basidiomycota (Midgley et al. 2006). Schopnost vatovce využívat DNA jako zdroj fosforu a dusíku ukazuje, že vatovec je těmito enzymy také vybaven.

Stanovit časový průběh degradace chitinu v tekuté kultuře se mi nepodařilo. Houba zde rostla, ale absorbance neklesala a tudíž se pravděpodobně nesyntetizoval enzym chitináza. Zřejmě to souvisí i s tím faktem, že se fyziologické vlastnosti vatovce v tekutém médiu mohou lišit od vlastností houby rostoucí na médiu pevném.

Hypotéza o interakci mycelia s mravenci jako zdrojem chitinu mnou nebyla potvrzena. Vatovec viditelně kolonizoval biomasu jen určitých druhů vláknitých hub, které by mohly tvořit významnou složku jeho výživy (Obr. 8 až 13). Mycelium selektivně interagovalo s promytými buněčnými stěnami vláknitých hub *Chrysosporium pannorum*, *Cladosporium cladosporioides* a *Aspergillus versicolor*, nikoli však s druhy *Penicillium spinulosum*, *Trichoderma sp.* a *Fusarium solani*.

Zjistila jsem, že způsob využívání odumřelé bakteriální biomasy by mohl být u vatovce podobný jako u druhu *Agaricus bisporus* a mikrobiální biomasa by mohla houbě sloužit jako zdroj dusíku, uhlíkatých látek, minerálů a vody (Carrol a Wicklow 1992). Pozorovala jsem zóny jako v případě růstu na koloidním roztoku chitinu, avšak tyto zóny nebyly dostatečně zřetelné. Proto bude potřeba tento pokus v budoucnu zopakovat s podstatně větším množstvím mikrobiální biomasy různých druhů.

Nalézt selektivní médium pro izolaci vatovce z půdy se mi nepodařilo. Přestože má chitin antibakteriální a fungicidní účinky, nebyla vytvořena taková rovnováha půdního společenstva, která by umožnila růst mycelia vatovce. Je tedy zatím nemožné vatovce izolovat z půdy. Je třeba jej kultivovat sterilně a izolovat i nadále z gleby plodnice.

5.2 Optimalizace kultivace

Podle Néheze (1985) je vhodná kultivační teplota vatovce (naleziště na území Maďarska) mezi 20-25 °C. Stejně růstové optimum mezi 20-25 °C jsem zjistila i pro kmeny izolované na území České republiky. Pouze kmen CG 15 vykazoval teplotní optimum kolem 20 °C. Optimální teplota podmiňuje nejrychlejší množení a optimální metabolickou aktivitu. Různé druhy hub se liší různými teplotními pásmy růstu a teplota optimální je pro určitý druh charakteristická. Často platí, že teplotní podmínky přirozeného stanoviště druhu bývají i v kultuře nejvhodnější. Podle údajů z meteorologických stanic je průměrná letní teplota v Praze 18,2 °C a v Budapešti 22 °C. Protože se mikrobiální společenstva na teplotu prostředí adaptují (Šantrůčková et al. 2003), mohla by optimální teplota vatovce souviset s průměrnou teplotou stanoviště v jeho vegetačním období.

Vatovec obrovský se vyskytuje na dobře hnojených půdách. Podobně jako vhodná kultivační teplota je pro houby značně důležité i pH prostředí, které může být hnojením ovlivněno. Bylo proto důležité citlivost k pH média u vatovce určit. Rimózczi (1985) zjistil, že vatovec je acidofilní až subacidofilní druh (s optimem pH 5,7 až 5,9), který dává přednost tvrdým půdám. Na základě mých dat vatovec na umělém médiu nevykazoval výrazné růstové optimum podle pH, protože rostl stejně při nastavených hodnotách pH 5,5-8. Houba si zřejmě dokáže v průběhu kultivace pH přizpůsobit podle potřeby.

5.3 Možnosti kultivace vatovce na přírodních substrátech *in vitro*

Všechny mnou testované izoláty rostly dobře na sterilním stabilizovaném kalu z čističky odpadních vod. Izoláty testované v Německu (Sous-Dorne 1979) rostly na sterilním substrátu ze žampiónového a kalového kompostu velmi pomalu. Dále v Německu zkoušeli vatovce pěstovat na obou sterilních substrátech zvlášť. Po 2 týdnech začalo růst jen několik zaočkovaných izolátů na kalu a na čistém žampiónovém substrátu nebyl zjištěn růst ani po 20 dnech. Jako další substrát byla testována směs půda–listnatý opad, který se podobal přírodnímu podkladu, z něhož byla houba izolována. Pokud byl tento substrát sterilizován, nebyl vatovcem osídlen. Mé výsledky tedy ukazují v případě stabilizovaného kalu větší toleranci k substrátu než výsledky citované.

Pokud je chitin přidán do sterilní půdy, tak stimuluje růst vatovce, přičemž v kontrole, která obsahovala ekvivalentní množství nitrátového dusíku byl růst velmi slabý.

6. ZÁVĚR

Na základě získaných údajů bylo poprvé zjištěno, že má *Langemannia gigantea* ve svém prostředí významné chitinolytické schopnosti. Chitin a chitináza mají široké použití v biotechnologiích. Například oligomery chitinu mají imunomodulační vlastnosti a slouží také jako elicitory obranných reakcí u rostlin. Indukce tvorby chitinázy je i v případě *Langemannia gigantea* zcela překonána glukózovou represí. Z toho lze vyvodit závěr, že schopnost vatovce degradovat chitin není znemožněna v půdě s vysokým obsahem dusíku a že houba využívá tento polysacharid především jako zdroj organického uhlíku.

Mycelium vatovce interagovalo s buněčnými stěnami mycelia 3 druhů mikroskopických hub: *Chrysosporium pannorum*, *Cladosporium cladosporioides* a *Aspergillus versicolor*. Vatovec se snad specializuje jen na určité druhy hub, které mu pravděpodobně mohou sloužit jako důležitý zdroj živin. Tuto hypotézu bude třeba dále potvrdit.

Vatovec využívá organicky vázaný fosfor a dusík v DNA lépe než minerální formy těchto prvků. DNA je součástí rostlinného, živočišného a mikrobiálního detritu. Růst na DNA jako zdroji fosforu a dusíku vyžaduje přítomnost fosfodiesteráz, fosfomonoesteráz a nukleáz, kterými je vatovec pravděpodobně vybaven.

Selektivní umělé médium pro vatovec nebylo nalezeno. Proto je třeba jej kultivovat sterilně a izolovat jej i nadále z gleby plodnice.

Optimální kultivační teplota pro růst je mezi 20 °C až 25 °C. Houba pravděpodobně nemá výrazné pH optimum pro růst a třepaná kultura není vhodnou metodou pro kultivaci vatovce.

SUMMARY

On the basis of the obtained results, important chitinolytic abilities of *Langermannia gigantea* are reported for the first time. Chitin and chitinase have been used for wide variety of purposes in biotechnology. For example chitin oligomers have been known as elicitors in plant defense reactions and possess immunomodulation properties. Chitinase production in *Langermannia gigantea* is repressed in the presence of glucose. This fact indicates that the fungus can degrade chitin even in soils rich in nitrogen, suggesting that this polysaccharide is exploited as a source of organic carbon.

Mycelium of giant puffball showed an interaction with cell walls of 3 species of microscopic fungi: *Chrysosporium pannorum*, *Cladosporium cladosporioides* and *Aspergillus versicolor*. This indicates that giant puffball is specialized to certain fungal species, which may serve as important sources of its nutrition. This hypothesis will have to be further confirmed. Giant puffball is able to exploit nitrogen and phosphorus organically bound in DNA better than inorganic forms of these elements. DNA is found in litter of plant, microbial and animal origin. The growth on DNA as a sole phosphorus and nitrogen source requires phosphodiesterase, monophosphoesterase and nuclease activities. Giant puffball is probably equipped with these enzymes.

The formulation of the selective medium for giant puffball was not successful. It is necessary to cultivate this fungus aseptically and isolate it from the gleba of fruitbody.

The temperature optimum for growth has been shown to be approx. 20–25 °C. The fungus does not show a sharp pH optimum for growth and shaken culture is not a method suitable for the cultivation of giant puffball.

7. PŘEHLED LITERATURY

Arnold E.H., Brien R.M. (1961): Diseases of turf. pp. 71-76 in: New Zealand for Turf Culture. Turf Culture. New Zealand Institute for Turf Culture: Palmerston North.

Barreto C. Ch., Staats Ch. Ch., Schrenk A., Vainstein M. H. (2004): Distribution of chitinases in the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and effect of N-acetylglucosamine in protein secretion. - Current Microbiology 48: 102-107.

Beneke E. S. (1963): *Calvatia*, calvacin a cancer. - Mycologia 55: 257-259.

Boddy L., Frankland J. C., Van West P. (2008): Ecology of saprotrophic Basidiomycetes. – 372 p., Academic press, London.

Bulmer G. S., Beneke E. s (1961): Studies on *Calvatia gigantea*. I. Germination of the basidiospores. - Mycologia 53: 123-136.

Bulmer G. S., Beneke E. S. (1962): Studies on *Calvatia gigantea*. II. Factors affecting basidiospore germination. - Mycologia 54: 34-43.

Bulmer G. S., Beneke E. S. (1964): Germination of basidiospores of *Lycoperdon* species and *Scleroderma lycoperdoides*. - Mycologia 56: 70-76.

Carlile M. J., Watkinson S. C., Gooday G. W. (2001): The Fungi. – 588 p., Elsevier Academic press, London.

Cooke R.C., Whipps J.M. (1993): Ecophysiology of fungi. – 401 p., Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Čopíková J., Synysia A. (2005): Polysacharidy, jejich význam a uplatnění. - Chemické listy 99: 621.

De Boer W., Folman L. B., Summerbell R. C., Boddy L. (2005): Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. – FEMS Mikrobiology Reviews 29: 795-811.

Dominik T. (1961): Badania nad przeszczepianiem mikrobocenoz gleb lesnych na tereny rolne. – Práce Instytutu Badawczego lesnictwa 210: 103-162.

Fermor T. R., Wood D. A. (1981): Degradation of Bacteria by *Agaricus bisporus* and other Fungi. - Journal of General Microbiology 126: 377-387.

Galitou-Panayotou M., Macris B. J. (1986): Degradation of condensed tannins by *Calvatia gigantea*. - Applied Microbiology and Biotechnology 23: 502-506.

- Galitou-Panayotou M., Rodis P., Macris B. J., Sthathakos D.** (1988): Purification of a novel enzyme involved in catechin degradation by *Calvatia gigantea*. - Applied Microbiology and Biotechnology 28: 543-545.
- Garraway M.O., Evans R. C.** (1984): Fungal nutrition & physiology. - 401 p., John Wiley & sons, New York.
- Gryndler M., Jansa J., Hršelová H., Chvátalová I., Vosátka M.** (2003): Chitin stimulates development and sporulation of arbuscular mycorrhizal fungi. – Applied Soil Ecology 22: 283-287.
- Gube M.** (2007): The gleba development of *Langermannia gigantea* (Batsch: Pers.) Rostk. (Basidiomycetes) compared to other *Lycoperdaceae*, and some systematic implications. - Mycologia 99: 396-405.
- Hankin L., Anagnostakis S. L.** (1975): The use of solid media for detection of enzyme production by funghi. - Mycologia 67: 597-607.
- Chen A., Chambers S. M., Cairney J. W. G.** (1999): Utilization of organic nitrogen and phosphorus sources by mycorrhizal endophytes of *Woollisia pungens* (Cav.) F. Muell. (Epacridaceae). – Mycorrhiza 8: 181-187.
- Kaku H., Nishizawa Y., Ishii-Minami N., Akimoto-Tomiyama C., Dohmae N., Takio K., Minami E., Shibuya N.** (2006): Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. – In: Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 103 (29): 11086-11091, Natl Acad Science, Washington.
- Kekos D., Macris B. J.**(1987a): Effect of tannins on growth and amylase production by *Calvatia gigantea*. - Enzyme and Microbial Technology 9: 94-96.
- Kekos D., Macris B. J.** (1987b): Kinetic studies of amylase and biomass production by *Calvatia gigantea*. - Biotechnology and Bioengineering 30: 681-684.
- Kekos D. M., Galitou-Panayotou M., Macris B. J.** (1987): Some nutritional factors affecting α -amylase production by *Calvatia gigantea*. - Applied Microbiology and Biotechnology. 26: 527-530.
- Klapper B. F.** (1962): Fungus spores as uniform reference particles for use in absolute cell counts. - Applied and Environmental Microbiology 10(6): 487-491.
- Klán J.** (1989): Co víme o houbách. - 310 p., Státní pedagogické nakladatelství, Praha.
- Klyushnik P.I.** (1951): On mycorrhizae of oak. – Lesnoje Chozjajstvo 4: 81-84.
- Komnikos J., Kekos D., Macris B. J., Galitou-Panayotou M** (1988): tannin-resistant α -amylase from *Calvatia gigantea*. - Biotechnology and Bioengineering 32: 939-941.

- Kreisel H.** (1992): An emendation and preliminary survey of the genus *Calvatia* (Gasteromycetidae). - *Persoonia* 14: 431-439.
- Kreisel H.** (1994): Studies in the *Calvatia* complex (*Basidiomycetes*) 2. - *Feddes Repertorium* 105: 369-376.
- Lamačková J.** (2005): Ekofyziologie vatovce obrovského *Calvatia gigantea* (Batsch: Pers.) Lloyd. – 36 p., ms. [Bc. Thesis, depon. In: Library Dep. Bon., Charles University, Prague].
- Leake J. R., Miles W.** (1996): Phosphodiesterase production and the utilization of DNA as a phosphorus source by the ericoid mycorrhizal fungus *Hymenoscyphus ericae*. – *New Phytologist* 132: 435-443.
- Mahadevan B., Crawford D. L.** (1997): Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. - *Enzyme and Microbial Technology*. 20: 489-493.
- McArdle R. E.** (1932): The relation of mycorrhizae to coniferous tree seedlings. - *Journal of Agricultural Research* 44: 431-439.
- Midgley D. J., Letcher P. M., McGee P. A.** (2006): Access to organic and insoluble sources of phosphorus varies among soil *Chytridiomycota*. – *Archives of Microbiology* 186: 211-217.
- Nehéz Z.** (1985): Termesztésélettani kísérletek *Langermannia gigantea*-val. - *Mikológiai Közlemények (Clusiana)* 1-2: 61-68.
- Richter D. L., Bruhn J. N.** (1989): *Pinus Retinosa* ectomycorrhizae: seven host-fungus combinations synthesised in pure culture. - *Symbiosis* 7: 211-228.
- Palková Z., Janderová B., Gabriel J., Zikánová B., Pospíšek M., Forstová J.** (1997): Ammonia mediates communication between yeast colonies. - *Nature* 390: 532-536.
- Pilát A.** (1958): Flora ČSR (Gasteromycetes). - 308 p., Academia, Praha.
- Rawlinks G. B.** (1951): The mycorrhizas of trees in New Zealand forests. - *New Zealand Forest Res. Notes* 1: 15-17.
- Rimózci I.** (1985): Talajvizsgálatok az óriás pöfeteg (*Langermannia gigantea* [Batsch: Pers] Rostk.) termohelyén és környezetében. - *Mikológiai Közlemények (Clusiana)* 3: 137-150.
- Rimózci I.** (1987a): Ecology, cenology and distribution of the giant puffball (*Langermannia gigantea* [Batsch ex Pers] Rostk.) in Hungary. - *Acta Botanica Hungarica* 33 (3-4): 279-294.
- Rimózci I.** (1987b): Az óriás pöfeteg (*Langermannia gigantea* [Batsch: Pers] Rostk.) növekedésének és fejlődésének összefüggése a klímatis tényezőkkel. - *Mikológiai Közlemények (Clusiana)* 5: 15-25.

- Rimózci I., Geml J.** (1999): Biological research on prospects of cultivation of the giant puffball (*Langermannia gigantea*). – In: Book of abstracts, 20th Fungal Genetics Conference, March 23-28, 1999, California, USA.
- Sedlmayr M., Beneke E. S., Stevens J. A.** (1961a): Physiological studies on *Calvatia* species. I. Vitamin requirements. - Mycologia 53: 98-108.
- Sedlmayr M., Beneke E. S., Stevens J. A.** (1961b): Physiological studies on *Calvatia* species. II. Carbon utilization. - Mycologia 53: 558-565.
- Shannon L. J., Stevenson K. E.** (1975): Growth of fungi and BOD reduction in selected brewery wastes. Growth of *Calvatia gigantea* and *Candida steatolytica* in brewery wastes for microbial protein production and BOD reduction. - Journal of food Science 40: 826-833.
- Sonneveld C., Van Den Ende J., De Bes S. S.** (1989): Estimating the chemical compositions of soil solutions by obtaining saturation extracts or specific 1:2 by volume extracts. - Plant and Soil 122: 169-175.
- Sorensen P. G., Thorbek S.** (1980): a fairy-ring of *Calvatia gigantea*. - Svampe 2: 81-86.
- Sous-Dorn B.** (1979): Erste Versuche zur Domestikation des Riesenbovistens, *Calvatia gigantea* (Batsch: Pers.) Lloyd. Mitteilungen der versuchsanstalt für Pilzanbau der landwirtschaftskammer Rheinland. - Krefeld-Grosshuttendorf 3: 31-35.
- Stijve T.** (2007): Puffballs are tasty, yes... but they are also potent pumpers of heavy metals. - Mushroom the Journal 25: 24-28.
- Schwarz D.** (1933): Some developmental characters of species of Lycoperdaceae. - American Journal of Botany 20: 440-465.
- Šantrůčková H., Bird M. I., Kalaschnikov Y. N., Grund M., Elhottová D., Šimek M., Grigoryev S., Gleixner G., Arneith A., Schulze E. D., Lloyd J.** (2003): Microbial characteristics of soils on a latitudinal transect in Siberia. – Global Change Biology 9: 1106-1117.
- Thomson S. E., Smith M., Wilkinson M. C., Peek K.** (2001): Identification and characterization of a chitinase antigen from pseudomonas aeruginosa strain 385. - Applied and Environmental Microbiology. 67: 4001-4008.
- Christakopoulos P., Tzia C., Kekos D., Macris B. J.** (1992): Production and characterization of extracellular lipase from *Calvatia gigantea*. Applied Microbiology and Technology. - 38: 194-197.