

Úvod do experimentální mykologie

(texty k přednášce)



Podzemní les žampiónů ve fantazii Julesa Verna

Jiří Gabriel (červen 2021)

Tento text nebyl původně zamýšlen jako skripta, nýbrž jako mé poznámky k přednáškám kursu Úvod do experimentální mykologie, jenž byl vypsán katedrou mikrobiologie a genetiky PřF UK poprvé v roce 1994. Později byl text pravidelně rozšiřován a aktualizován a doplněn o další obrázky, tabulky či odkazy, aby byl užitečný i k samostatnému studiu; poslední úpravy byly učiněny v roce 2021. Přesto, anebo právě proto může čtenář v textu nalézt nejasné pasáže nebo nepřesnosti; prosím pak, aby mne na taková místa bez váhání upozornil.

Text obsahuje řadu informací, grafů a obrázků. Kromě mých vlastních (resp. z mého archivu) jsou u obrázků či grafů vždy uvedeny původní zdroje. Pokud někdo chce užít tento text, či obrázky dále, nechť prosím vždy uvede zdroj.

autor

obsah:

Kapitola I. Získávání a uchovávání kultur vyšších hub

1. Sbírky kultur hub
2. Isolace nových kmenů z přírody
3. Půdy a média používané pro uchovávání kultur hub

Kapitola II. Způsoby kultivace vyšších hub

1. Submersní kultivace v tekutých půdách
2. Stacionární kultivace v tekutých půdách
3. Stacionární kultivace na pevných půdách

Kapitola III. Růst kultur hub

1. Měření růstu
2. Analýza růstových křivek
3. Parametry ovlivňující růst kultur hub

Kapitola IV. Primární a sekundární metabolismus u hub

1. Velmi stručně o primárním metabolismu u hub
2. Hlavní metabolické dráhy sekundárního metabolismu
 - 2.1. Cesta šikimátová
 - 2.2. Polyketidy: acetát-malonátová dráha
 - 2.3. Terpeny: cesta mevalonátová
 - 2.4. Deriváty aminokyselin
 - 2.5. Deriváty ostatních primárních metabolitů
3. Současné názory na funkci sekundárních metabolitů
4. Vyšší houby v lidové či oficiální medicíně

Kapitola V. Metody studia sekundárních metabolitů

1. Rozdělení sekundárních metabolitů
2. Metody izolace a zjišťování chemické struktury
 - 2.1. Desintegrace mycelia
 - 2.2. Předčištění
 - 2.3. Finální purifikace
3. Zjišťování chemické struktury
4. Zjišťování antibiotické aktivity

Kapitola VI. Ligninolytický systém hub bílé hniloby

1. Struktura a vlastnosti ligninu
2. Biodegradace ligninu dřevokaznými houbami
3. Enzymový komplex hub bílé hniloby
 - 3.1. Ligninová peroxidáza a Mn-dependentní peroxidáza
 - 3.2. Lakáza
 - 3.3. Enzymy produkující peroxid vodíku
 - 3.4. Štěpení aromatického jádra intracelulárními enzymy
4. Měření biodegradace ligninu v experimentech
5. Ligninolytický systém basidiomycetů jako projev sekundárního metabolismu
6. Využití ligninolytických enzymů k degradacím jiných aromatických látek

Kapitola VII. Rozklad dřevní hmoty houbami hnědé hniloby

1. Houby hnědé hniloby
2. Problém zvaný dřevomorka

Kapitola VIII. Akumulace kovů v myceliu

1. Faktory ovlivňující obsah kovů v plodnicích
2. Akumulace kovů submersními kulturami
3. Mechanismus biosorpce kovů na povrch mycelia

Závěrečná poznámka

Kapitola I. Získávání a uchovávání kultur vyšších hub

1. Sbírký kultur hub

Podobně jako v případě jiných mikrobiologických modelů, nové kmeny hub je možné získat buď z jiných sbírek (samozřejmě kultur, ne plodnic), nebo izolací z přírodního materiálu. Sbírkové kmeny přicházejí jako mycelia ve zkumavkách na šikmých agaroch v dřevěných či kovových pouzdrech, umožňujících bezpečnou poštovní přepravu. Zátka bývá někdy zalita voskem. Společně s materiálem bývá vždy přiložen doklad obsahující latinský název houby, sbírkové označení (číslo kmene) a složení agarové pudy.

Každá mezinárodně registrovaná sbírka mikroorganismů má své označení, které se používá spolu s číslem kmene při jeho specifikaci. V České republice jsou v současnosti větší sbírký dvě, v Mikrobiologickém ústavu AV ČR Sbírký kultur basidiomycetů, obsahující cca 600 kmenů z ca 250 druhů (označení CCBAS) a brněnská sbírka microorganism (CCM). Mezi nejvýznamnější zahraniční sbírký hub patří americká typová sbírka mikroorganismů (ATCC), holandská sbírka v Baarnu, později v Delftu (CBS), kde je uloženo více než 30 000 kultur a sbírka v Mykologickém Institutu v Kew v Anglii (CMI). Další větší sbírký jsou např. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSM) v Braunschweigu, Forintek Canada v Ottawě (FTK) nebo sbírka Pasteurova Institutu v Paříži (IP). Větší či menší sbírký kultur hub však samozřejmě existují na každém pracovišti, kde se s kulturami hub pracuje.

2. Isolace nových kmenů z přírody

Isolace hub z přírody je druhou možností, jak získat nové kmeny hub resp. jak doplnit vlastní sbírku kultur. Pro úspěšnou izolaci je však třeba dodržet několik základních pravidel. Především, k izolaci je třeba vybrat zdravé a hmyzem nenapadené (nečervivé) plodnice, které byly bezpečně taxonomicky zařazeny. Prakticky se izolace provede tak, že plodnice se rozlomí a sterilním skalpelem se vyřízne malý kousek tkáně, který se přenesení do zkumavky (nebo na Petriho misku) s předem vysterilizovanou agarovou pūdou. Popsaná operace vypadá velmi jednoduše, ale zkušenost praví, že pro úspěšnou izolaci je třeba dlouhodobé praxe. Je lepší zaočkovat více zkumavek či misek vzorky z různých částí plodnice a je rovněž často výhodné použít alespoň dvou různých agarových pūd (viz dále). Velmi časté bakteriální infekce je možné omezit přidávkem streptomycinu do agarové pudy a někdy pomůže i povrchová desinfekce plodnice. Používá se k tomu účelu např. roztok chloraminu nebo peroxidu. S etanolem nebývají zpravidla dobré zkušenosti.

3. Pūdý a média používané pro uchovávání kultur hub

Houby se liší svými nároky na výživu a prostředí a totéž platí i o jejich myceliálních kulturách. Neexistuje tedy jedna universální pūda, která by byla optimálním médiem pro kultivace všech druhů hub. V zásadě se pūdý (pevné i tekuté) rozdělují na minerální a komplexní. Minerální pūdý obsahují přesně definovaná množství živin a připravují se rozpuštěním příslušných minerálních solí a dalších látek (např. glukóza) v destilované vodě. Komplexní pūdý navíc obsahují látky, jejichž přesné složení nebývá výrobcem uvedeno, neboť to dost dobře nejde (kukuřičný extrakt, sladinka, kvasničný extrakt atd.).

Komplexní půdy obsahují větší množství živin než půdy minerální a pro izolace hub z přírodního materiálu i pro dlouhodobé uchovávání myceliálních kultur jsou vhodnější.

Nejobyklejší půdy používané pro udržování sbírek kultur hub obsahují sladinku (malt extract), kukuřičný extrakt (corn-steep liquor, cornmeal extract) nebo kvasničný extrakt (yeast extract). Někdy se do půd přidávají i výtažky (vývary) z nejrůznějšího přírodního materiálu, např. z plodů třešní, brambor, ovesné mouky, z větviček některých stromů atd. – vesměs podle získaných zkušeností. Teorie zde žádná není. Návodů k půdám lze nalézt v příslušné odborné literatuře.

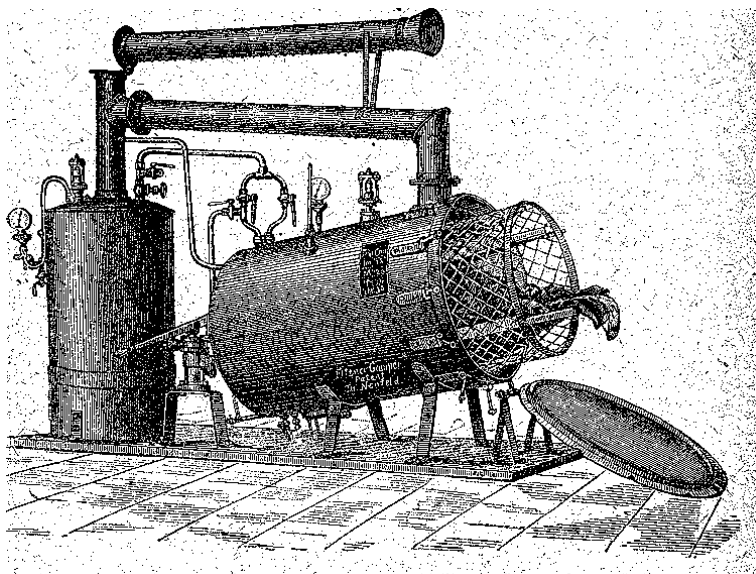
Připravené půdy se standardně sterilisují autoklárováním. Je ale vhodné si uvědomit, že ačkoliv jde o fyzikální proces, dochází při něm i k změnám ve složení média. např. 20-minutová sterilizace při 121 °C a pH 6 snižuje obsah dusíku v rozpustné formě v médiu na 30 % v přítomnosti stopových prvků a na 45 % v jejich nepřítomnosti. Po jednodinové sterilizaci za stejných podmínek klesl obsah glukózy na 35 % v důsledku karamelizace.

Proto se v některých případech půdy sterilisují filtrací, resp. část se autokláruje a část, obsahující kovové ionty popř. vitaminy se filtruje a půda se kompletuje až před inokulací. Často je nutné upravovat pH. Provádí se to roztokem HCl nebo NaOH ještě před autoklárováním a u pevných půd před přidávkem agarů. Tekuté a agarové půdy se obvykle autoklárují po dobu 20 minut, slámu, piliny, větvičky apod. je lépe klávkovat alespoň dvakrát, nejlépe s jedno- až dvoudenní prodlevou (kvůli zahubení spor plísní).

Určité možnosti přináší i sterilizace γ -zářením, která nevede ke změně chemických vlastností substrátu, avšak v praxi se používá zřídka, neboť většina pracovišť tuto možnost nemá. V Praze je možné využít služeb Muzea v Roztokách u Prahy (kde je k dispozici kobaltový zářič). Pro hubení hmyzu obvykle postačují dávka 500 Gy, pro hubení plísní a hub ca 18 kGy a pro sterilizaci dalšího materiálu ca 27 kGy; podle zkušeností však v případě založení dlouhodobějšího experiment (měsíce či roky) je vhodnější poslední dávku zopakovat 2x (tj. Celkem 54 kGy). Podmínky a ceník lze nalézt na stránkách Středočeského muzea v Roztokách u Prahy (<https://www.muzeum-roztoky.cz/odborna-cinnost/262-konzervacni-ozarovaci-pracoviste>).



Obr. 1. Ilustrační foto z webu Středočeského muzea v Roztokách u Prahy. Uprostřed kovový válec s vlastním zdrojem γ -záření (^{60}Co).



Obr. 2. Starší typ parního sterilisátoru. Tento typ (Neufeldův) byl používán v C. K. chorobincích a umožňoval "sterilisaci chirurgických přístrojů, šatstva i celých divanů". Z knihy "Maličtí nepřátelé" (cca 1915). Tu mi bohužel někdo ukradl.

U sbírkových kultur bývá obvykle v katalogu sbírky uvedeno, na jakých půdách je kultura udržována. Několik příkladů je v následující tabulce:

kmen	půda
<i>Agrocybe aegerita</i>	CHA, MA2
<i>Boletus edulis</i>	CHA, MA2
<i>Cortinarius sulphureus</i>	BAF, Modess
<i>Daedalea quercina</i>	CHA, X
<i>Fomes fomentarius</i>	CHA, MA2
<i>Neobulgaria pura</i>	MA2, OA
<i>Phallus impudicus</i>	MA2, X
<i>Polyporus squamosus</i>	CHA, MA2
<i>Trametes versicolor</i>	CHA, MA2
<i>Ustilago maydis</i>	CHA, MA4
<i>Xerocomus badius</i>	CHA2, Modess
<i>Xylaria hypoxylon</i>	OA + dubové větvičky

Nejběžnějším způsobem dlouhodobého uchovávání myceliálních kultur je jejich kultivace na šikmých agarech. Obecně platí, že kultury se uchovávají po dobu jednoho až dvou měsíců při teplotě 4 °C a pak se kultury přeočkovávají do nových zkumavek.

Modernějším způsobem je uchovávání myceliálních kultur při velmi nízké teplotě. Schopnost organismů přežít zmrazení a rozmrazení je známa od pokusů Henryho Powera, který v r. 1663 úspěšně zmrazoval a rozmrazoval nematody. Při ochlazování dochází jednak k tvorbě krystalků ledu, jednak k zvyšování koncentrace solí. Řada hub při ochlazování produkuje látky, které pravděpodobně fungují jako osmoregulátory; např. *Penicillium chrysogenum* nebo *Saccharomyces cerevisiae* produkují glycerol, *Phytophthora cinnamoni* nebo *Mucor hiemalis* produkují prolin atd.

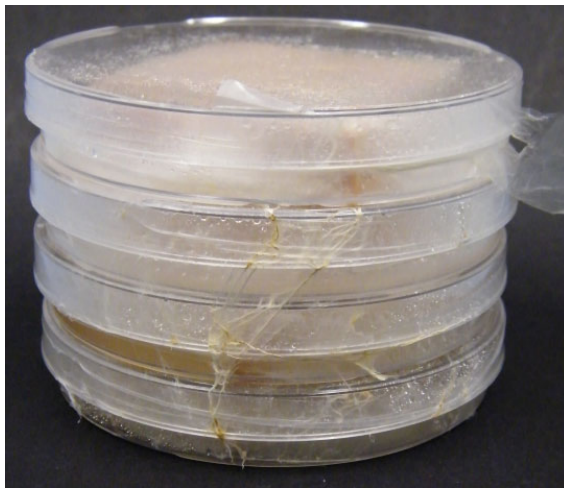
Teplota, při které jsou kultury uchovávány, je do značné míry dána dostupnou technikou. V hlubokomrazících boxech je možné dlouhodobě dosáhnout teploty -20 až -40 °C, poměrně běžné je i uchovávání kmenů v ampulích obsahujících 10% vodný glycerol při teplotě -196 °C (v kontejnerech s kapalným dusíkem). Ne všechny houby ale tento způsob uchovávání snášejí; na příkladech je uvedena procentová životnost některých řádů basidiomycetů po 48 hod v kapalném dusíku:

Aphyllorphorales	75 % (138 testovaných kmenů)
Agaricales	53 % (113)
Gasterales	100 % (1)

Při tomto způsobu uchovávání kultur hraje velmi důležitou roli rychlost ochlazování resp. rychlost rozmrazování preparátů. Ta je závislá na použitém kryoprotektivu. Např. pro červené krvinky je optimální rychlost ochlazování -30 °C/min v glycerolu a -1 °C/min v dimethylsulfoxidu.

Existují i další způsoby uchovávání kultur, např. na agarových půdách převrstvených olejem nebo na bezvodém silikagelu v exsikátoru. Tyto způsoby se však v praxi využívají jen ve velmi omezených případech. Podrobněji se této problematice věnuje např. D. Smith v knize Maintenance of Microorganisms, A manual of Laboratory Methods (B. E. Kirsop a J. J. S. Snell, Eds., Academic Press, London 1984). Řadu informací lze nalézt i v novějších pracích na webu.

Přehled nejběžnějších kultivačních médií najde zájemce mj. v obšírné knize Atlas R. M., Handbook of Microbiological Media. CRC Press 1993. Dílko má 1079 stran.



Obr. 3. Kultury dřevomorky domácí (*Serpula lacrymans*) v Petriho miskách, kultivované na dřevěných špalíčkách, uložených v agarovém loži. Viditelné jsou rhizomorfy, opouštějící misky a hledající zdroj vlhkosti a živin jinde..

Kapitola II. Způsoby kultivace vyšších hub

Kultivace hub, podobně jako kultivace většiny mikroorganismů, se rozdělují podle toho, zda houba roste v tekutém médiu nebo v pevném substrátu. V tekutém médiu je možné buď kulturu míchat (třepat; submersní kultivace; houba pak roste v celém objemu média) nebo ji ponechat v klidu (stacionární kultivace; houba vytváří kobercový nárůst výlučně na povrchu média).

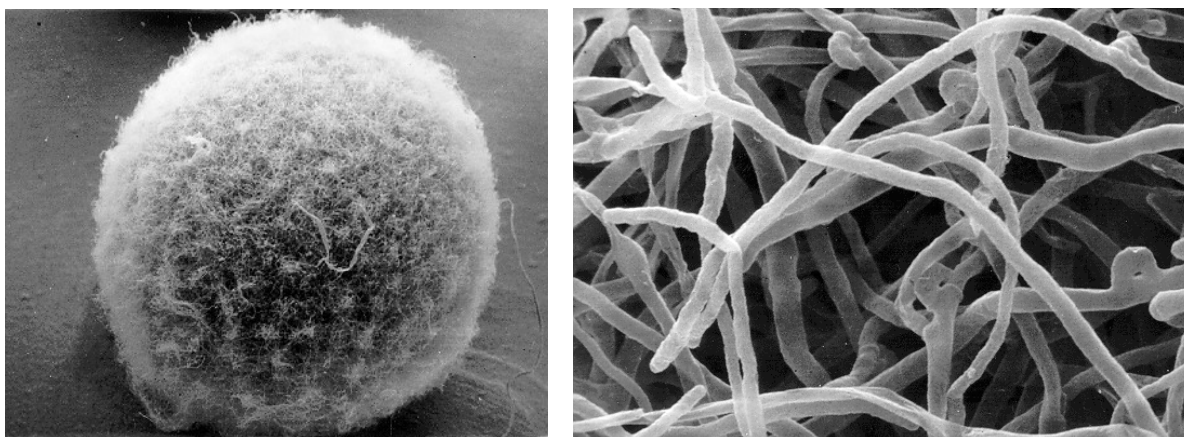
1. Submersní kultivace v tekutých půdách

Patrně nejčastějším způsobem kultivace vyšších hub je submersní kultivace v tekutých půdách. Baňky jsou po inokulaci umístěny na třepačku, kde je teplota udržována na konstantní výši. Třepání zajišťuje nejen rovnoměrný přísun živin, ale i vzdušnění. Kultura má vzhled drobných či větších kuliček (myceliálních pelet). Pelety dosahují velikosti obvykle od 2 mm do dvou cm a jsou tvořeny spleť hyf. Je třeba poznamenat, že po morfologické stránce není rozdíl mezi myceliem tvořícím plodnice hub v přírodě a mezi hyfami resp. myceliem tvořícím pelety.



Obr. 4. Submersní kultura basidiomycetu *Phanerochaete chrysosporium*. Vlevo kultura získaná kultivací v přítomnosti kadmiových iontů, vpravo kontrola. Změna barvy nebyla nikdy objasněna.

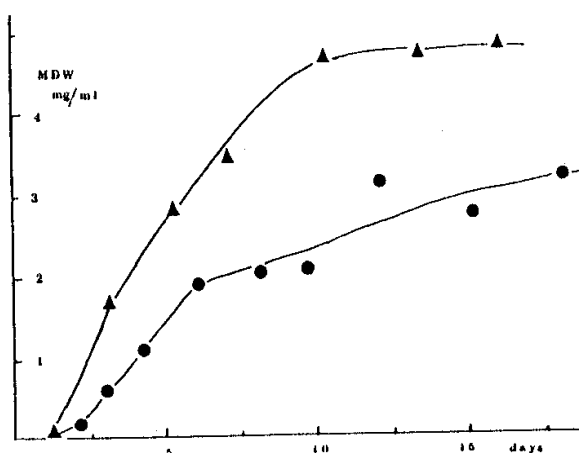
Inokulace se provádí buď z agarových misek způsobem, který je uveden v odstavci o stacionárních kultivacích, nebo ze submersních kultur. V takovém případě se k inokulaci používají skleněné pipety s uříznutou špičkou, či modré špičky rovněž s uříznutou špičkou (větší průměr je nutný k pipetování pelet, jejichž průměr dosahuje často až půl cm).



Obr. 5. Struktura pelety basidiomycetu *Daedalea quercina*. Zvětšení 2 888x. Na obrázku vpravo jsou dobře patrné přezky na myceliu.

Špičky pipet necháme uříznout u skláře, nebo si je sami uřízneme nožem na sklo a řez ve svítivém plameni otavíme. Plastikové špičky pro automatické pipety se pro inokulace příliš nehodí, ačkoliv je možné je po seříznutí použít taktéž. Výhoda skleněných pipet je především ve větším objemu inokula, které lze do pipety nasát; ponecháme-li pipetu chvíli ve svislé poloze v klidu, pelety klesnou ke špičce pipety a ve stejném objemu se pak nachází mnohem větší množství biomasy.

K inokulaci se obvykle používá kultur z krátkodobé kultivace (z exponenciální fáze růstu, viz kapitola III), ačkoliv v některých případech vede použití staršího inokula (ze stacionární fáze) k vyšším výtěžkům (tolik zkušenost).



Obr. 6. Vliv stáří inokula na výtěžek kultivace u *Aspergillus oryzae*. Horní křivka: inokulum ze stacionární fáze růstu, spodní křivka: inokulum z exponenciální fáze. Z knihy Fungal Physiology (D. H. Griffin, Wiley-Liss 1994). Z této knihy je převzata i řada dalších grafů.

Kultivace trvá několik dnů (vyjíměčně přes dva týdny) a její délka závisí na množství inokula a živin obsažených v půdě. Provádí se nejčastěji v 250 ml kultivačních baňkách uzavřených buničínovým nebo molitanovým uzávěrem, teplota se volí nejbliž

teplotnímu optimu známému pro daný mikroorganismus. U vyšších hub se používá zpravidla 25 až 28 °C.

Třepačky se podle způsobu pohybu rozdělují do dvou skupin; buď jsou rotační (orbitální), nebo reciproké. Rotační třepačka pohybuje baňkami po kružnici a umožňuje obvykle nastavit přesný počet otáček za minutu. Reciproká třepačka pohybuje baňkami pouze v jednom směru tam a zpátky a udává se u ní počet cyklů (pohybů tam a zpět) za minutu. Počet cyklů lze u reciprokých třepaček zřídka regulovat.

Typ třepačky a druh kultivační baňky (resp. délka hrdla baňky) jsou určující faktory při plnění baňek půdou. Tekuté půdy nesmí být v baňce mnoho, jinak šplíchá až do zátek, které zvlhnu a nepropouštějí již tak dobře vzduch. Do 250 ml kultivační baňky lze s úspěchem použít 70 ml půdy na reciproké třepačce, a asi 80 ml na rotační. Při plnění je nutno uvažovat i objem inokula, který se obvykle pohybuje u inokula ze submersní kultury mezi 3 a 5 ml na baňku.

Složení tekutých půd se od pevných liší pouze tím, že neobsahují agar.



Obr. 7. Orbitální třepačka v akci.

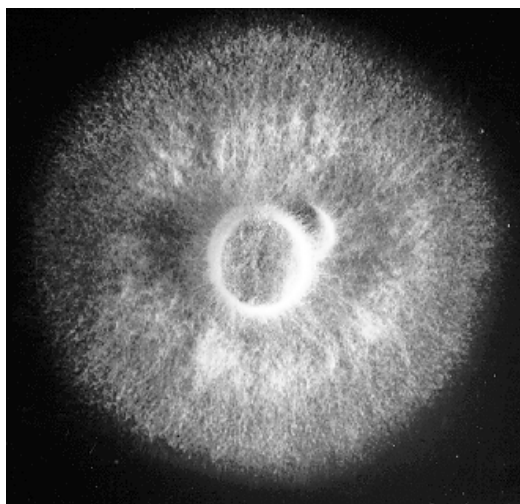
2. Stacionární kultivace v tekutých půdách

V některých případech je výhodnější (anebo dokonce nutné) kultivovat houby za stacionárních podmínek na tekutých půdách. V takovém případě je příprava kultivačních baněk i postup inokulace naprosto shodný jako ve výše uvedeném případě, ale baňky se umísťují do termostátované místnosti do polic.

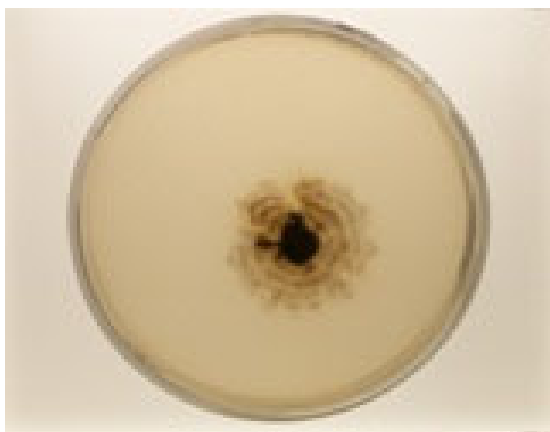
Je-li třeba v průběhu kultivace dodávat kulturám kyslík, baňky se neuzavírají buničinovou zátkou, nýbrž gumovou, ve které jsou provrtány otvory pro dvě skleněné trubičky s nasazenými hadičkami. Do hadiček se před sterilisací vloží smotek vaty a hadičky se uzavřou bezprostředně po sterilisaci šroubovými nebo drátěnými tlačkami. Při vzdušnění se připojí přívod kyslíku z tlakové lahve přes regulační ventil k jedné hadičce, obě tlačky se uvolní a baňka se po požadovanou dobu promývá kyslíkem. Po ukončení promývání se přívod kyslíku odpojí a obě tlačky se uzavřou. Při přípravě zátek je dobré si ověřit, zda hadičky snesou sterilisaci (autoklávování). Ne každý materiál lze totiž s úspěchem autoklávovat.

3. Stacionární kultivace na pevných půdách

Pevné agarové půdy se připravují přidavkem 2 až 3 % agaru do příslušné tekuté půdy. pH se upravuje na požadovanou hodnotu před přidavkem agaru a před autoklávováním. Pro běžné kultivace postačí dvouprocentní agar, tříprocentní je výhodný tehdy, chceme-li kulturu použít jako inokulum pro další kultivace. Agarovou misku očkujeme tak, že opáleným korkovrtem vydlobneme na okraji kultury váleček, který potom sterilní špachtličkou - opálenou v plameni a ochlazenou v lihu - vyjmeme a opatrně položíme do středu nové misky. Tříprocentní agar je výhodný v případě kultivací některých druhů hub, které v průběhu růstu vylučují látky agar rozpouštějící (např. *Pycnoporus cinnabarinus*). Přeočkování takových hub je potom snadnější.



Obr. 8. Kultura basidiomycetu *Stereum hirsutum* po pěti dnech kultivace na agarové půdě. Vytváří kruhovou kolonii se středem v místě inokulace. Růst lze měřit pravítkem.

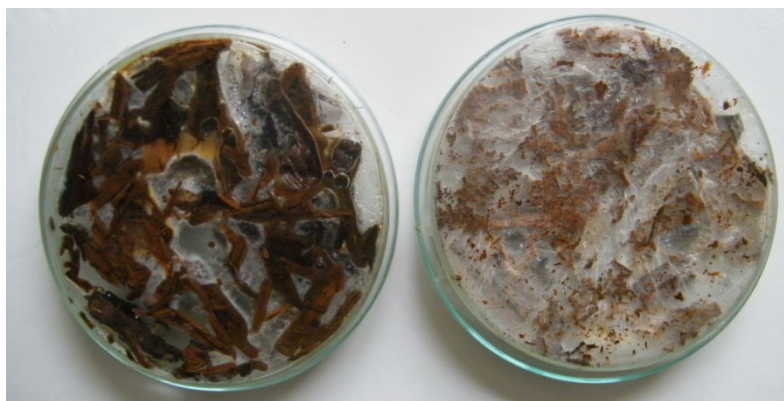


Obr. 9. Vlevo kultura václavky (*Armillaria* sp.): roste pomalu, vyžaduje značnou vlhkost. Vpravo kultura dřevomorky (*S. lacrymans*): roste rychle i za relativního sucha.

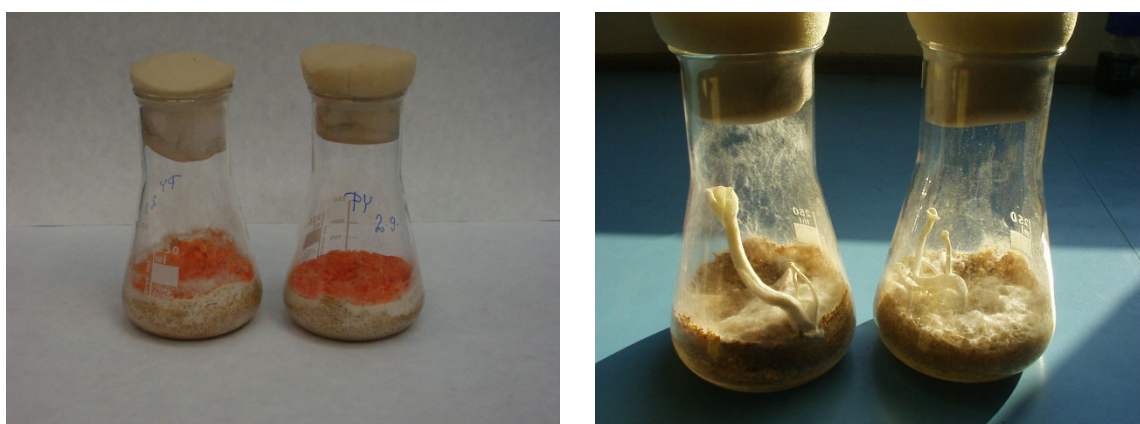


Obr. 10. Václavka (*A. mellea*) po pěti týdnech kultivace: na obrázku jsou hezky vidět rhizomorfy, které v přírodě mohou dosáhnout délky až několika metrů.

Dřevokazné houby se často kultivují i na jiných než agarových substrátech. Používá se např. mletá sláma, piliny nebo dřevěné špalíčky. V případě jemně mleté slámy se kultivace provádí v minimálně čtvrtlitrových Erlenmeyerových baňkách, které jsou plněny asi 3 cm vysokou vrstvou slámy. K odváženému množství slámy se přidává destilovaná voda. Optimální (váhový) poměr slámy (nebo jiného substrátu) a vody je zpravidla nutné pro každý organismus vyzkoušet. Dobře některé houby rostou i na ovesných vločkách, či jejich směsi s pilinami.



Obr. 11. Zaočkované kultury izolovaných basidiomycetů na listech a větvičkách různých stromů.



Obr. 12. Vlevo kultury outkovky rumělkové (*P. cinnabrinus*) a vpravo hlívy ústříčné (*Pl. ostreatus*), rostoucí v baňkách na mleté slámě.

V této tabulce je pro orientaci uvedena optimální vlhkost substrátu pro kultivace některých hub:

organismus	substrát	optimální vlhkost v %
<i>Coprinus</i> sp.	sláma	65
<i>Mucor dispersus</i>	otruby	50-63
<i>Penicillium capsulatum</i>	řípa	60-80
<i>Aspergillus oryzae</i>	rýže	40

K inokulaci se používají agarové válečky vydloubnuté sterilním korkovrtem z okrajů dobře narostlé agarové misky. Do jedné baňky se obvykle nedává více než dva agarové válečky. Řada hub na těchto substrátech snadněji fruktifikuje, proto jsou občas v laboratorní praxi používány. Je však nutno podotknout, že jde o experimenty dlouhodobé, neboť první plodnice se u řady hub objevují asi až dva měsíce od inokulace. Některé průmyslové procesy též využívají kultivací hub na pevných substrátech. Většinou jde o zemědělské nebo potravinářské odpady, např. sláma, obilí, rýže, jablka atd. Takto se získává např. kyselina citronová (*A. niger*), cephalosporin C (*A.*

chrysogenum), gibberelová kyselina (*G. fujikuroi*) apod. Též příprava sojové omáčky má základ v kultivaci hub na pevných substrátech.

Stacionární kultivace jsou základem pěstování jedlých hub. To se pochopitelně neprovádí v baňkách, ale v pytlích, obsahujících vhodný substrát, na lískách v pěstírnách nebo přímo na zaočkovaných pařezech nebo polenech. Vzhledem k čím dál většímu množství literatury věnující se praktickým aspektům pěstování jedlých hub (např. Pěstování jedlých hub, I. Jablonský, A. Srb a V. Šašek, SZN 1985 nebo Pestovanie húb, A. Ginterová, Príroda /Bratislava/ 1985, Jedlé a léčivé houby a jak je pěstovat, I. Jablonský, M. Koudela, V. Šašek, 2019) nebudeme tuto část podrobněji popisovat. Mnoho návodů lze nalézt také na webu, příliš se od sebe neliší. Zájemcům ale doporučuji především texty od českých autorů z oboru.



Obr. 13. Plodnice hub na slámě po 60 dnech kultivace. Zleva *Stropharia rugosoannulata*, *Psilocybe cubensis* a *Coprinosia atramenta*. Plodnice hnojníku *C. atramenta* zpravidla zanikají (zcela autolyzují) během 1-2 dnů i v laboratorních podmínkách.



Obr. 14. Mycelium *S. lacrymans* na smrkovém špalíčku.

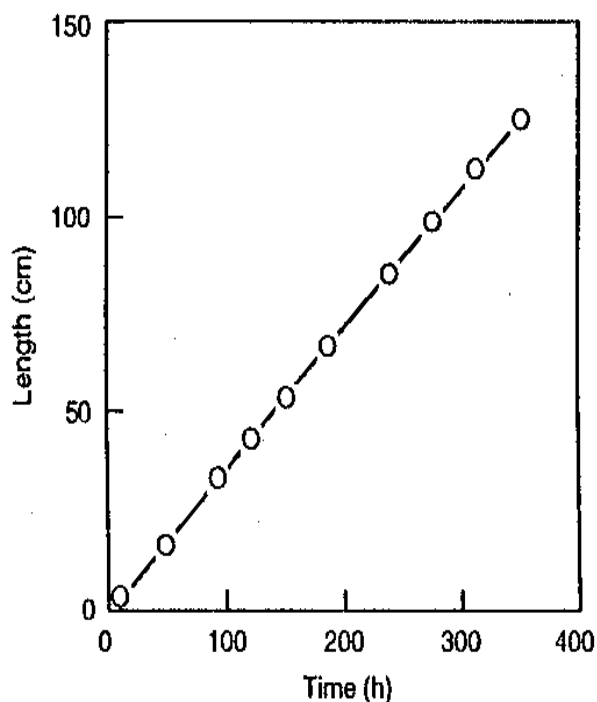
Kapitola III. Růst kultur hub

1. Měření růstu

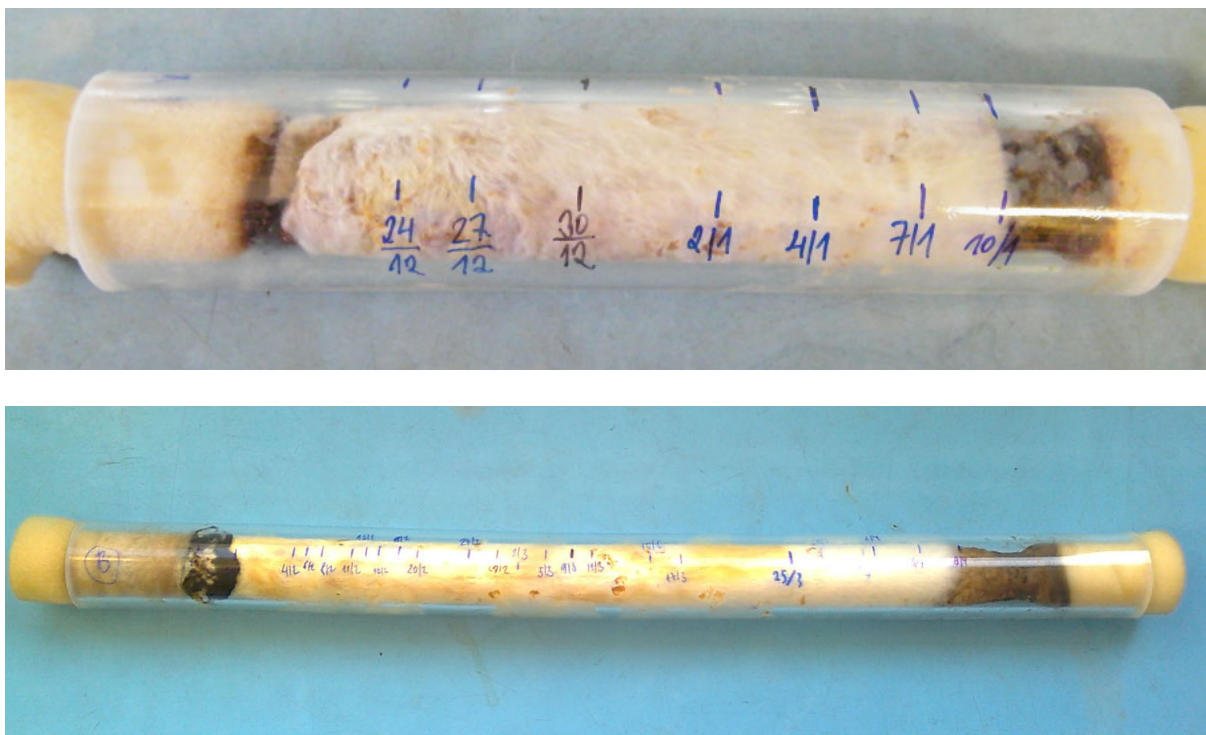
Růstem kultury se obvykle rozumí přírůstek biomasy po určité době inkubace. Nejrozšířenější a nejjednodušší metodou, jak sledovat růst houbové kultury je měření suché váhy. Kultura je zfiltrována přes předem zvážený filtrační papír a po určité době sušení při 105 °C (obvykle 24 hod) je po vyrovnání teploty na laboratorní opět zvážena. Vzhledem k tomu, že vážení patří obecně mezi nejpřesnější metody, dává tento způsob při standardním provádění velmi přesné výsledky. Používá se především pro kultury na tekutých půdách; pro větší spolehlivost a reprodukovatelnost se zpravidla váží obsah tří až pěti baněk.

U pevných půd je nejjednodušší metodou zjišťování růstu měření průměru kolonie v určitých časových intervalech (obvykle stačí 24 h). Na rozdíl od předchozí techniky je tento způsob nedestruktivní a umožňuje sledovat jednu kolonii kontinuálně po řadu dnů. Tato metoda však nezahrnuje vertikální růst a proto růstová kinetika takto získaná se může lišit od výsledků zjištěných vážením. Lineární růst vláknitých hub je možné rovněž sledovat v dlouhých trubicích.

Pravdou je, že k takovému zjišťování postačuje pouze pravítko či šuplera, což někdy může navozovat dojem "starobylosti" (zejména u apoštolů molekulárně-biologických technik), avšak na výsledky takto získané, zvláště jsou-li získány z více opakování (alespoň tří, lépe však pěti paralel) je vždy spoleh. Tolik letitá zkušenost.



Obr. 15. Lineární růst *Neurospora sitophila* v trubici 1,5 m dlouhé.



Obr.16. Lineární růst dřevomorky domácí (*S. lacrymans*) v trubici plněné směsí ovesných vloček. Rychlost růstu byla cca 0,5 cm/den (jistě k velké radosti majitelů napadených nemovitostí). Průměry trubic byly 2, 3, 4 a 5 cm, délka od 20 cm do jednoho metru.

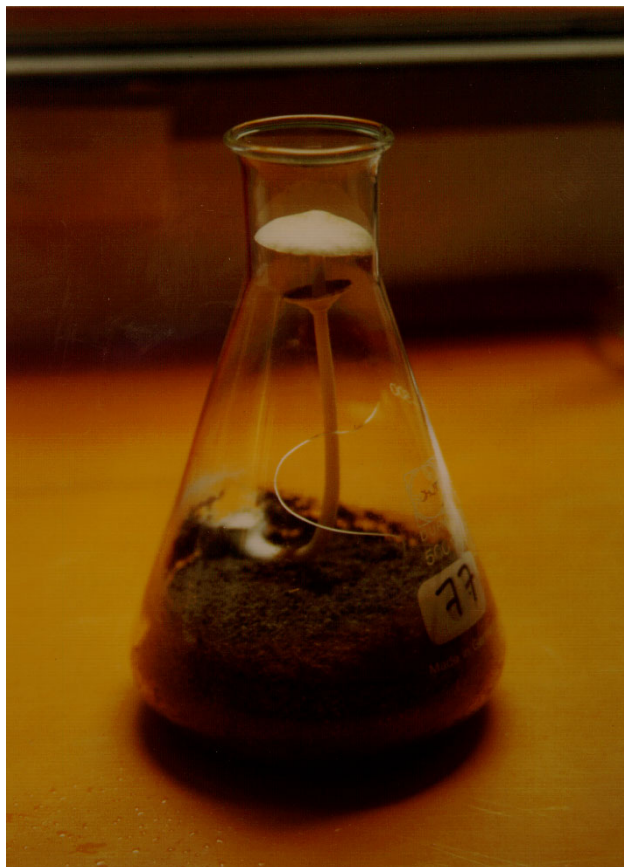
Nástup instrumentálních analytických metod, zejména vysokoúčinné kapalinové chromatografie, do běžné laboratorní praxe, umožnil měření růstu hub na základě stanovení koncentrace určitých specifických metabolitů. Tak bylo např. popsáno stanovení glukosaminu v rostlinných tkáních napadených patogenem *Puccinia graminis* var. tritici. Dalšími metabolity, jejichž koncentrace je přímo úměrná houbové biomase jsou ergosterol nebo chitin (jehož hydrolýzou se uvolňuje již zmíněný glukosamin).

Tyto metody mají svůj význam především při studiu růstu smíšených populací hub a bakterií. Ergosterol jako typický houbový metabolit se běžně stanovuje kapalinovou chromatografií (HPLC), jako typický bakteriální metabolit je možné sledovat např. α,ϵ -diaminopimelovou kyselinu.

Obsah ergosterolu kolísá ovšem u různých hub; získané výsledky je tedy nutné posuzovat i z tohoto hlediska a před experimentem je vhodné si změřit vlastní kalibrační křivku (hmotnost mycelia vs. obsah nalezeného ergosterolu). Obsah ergosterolu v některých houbách udává následující tabulka.

organismus	ergosterol (% sušiny)
<i>Volvariella volvacea</i>	0,4
<i>Lentinus edodes</i>	0,27
<i>Agaricus bisporus</i>	0,27
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	0,13

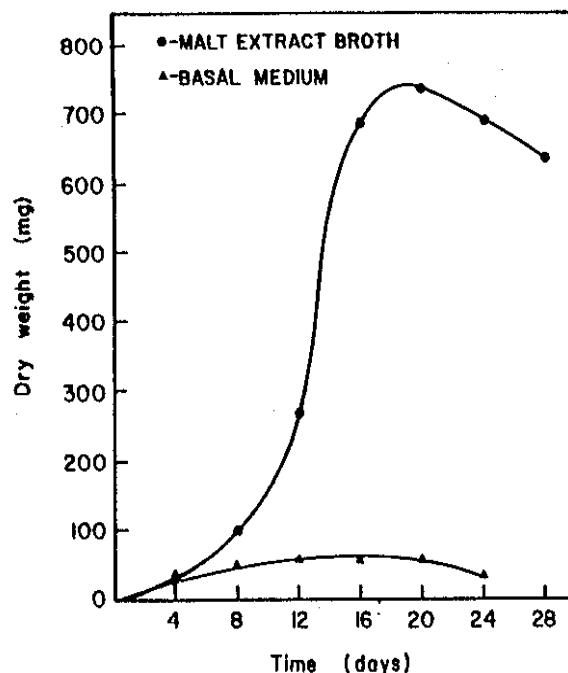
Konečně je možné v některých případech měřit růst na základě respirace (tj. měřením uvolňovaného CO_2). Počítání buněk, běžné u kvasinek a bakterií, nepřichází u vláknitých hub samozřejmě v úvahu.



Obr. 17. Kultura *Agrocybe perfecta* na zaočkované slámě, převrstvené půdou. Prorůstání hyf do půdy lze velmi dobře sledovat právě pomocí analýzy obsahu ergosterolu. Plodnice se tvoří asi 40 až 60 dní od inokulace.

2. Analýza růstových křivek

Vyneseme-li do grafu zjištěné hodnoty houbové biomasy proti času, získáme růstovou křivku. Analýzou růstových křivek je možné u submerzních kultivací zjistit lag-fázi, fázi exponenciálního růstu, fázi lineárního růstu, stacionární fázi a fázi odumírání kultury.



Obr. 18. Růstové křivky basidiomycetu *Pycnoporus cinnabarinus* ze submersních kultivací na dvou různých médiích.

Podobně jako v případě bakteriálních kultur, lag-fáze odpovídá přizpůsobování mikroorganismu novým podmínkám, může zahrnovat indukci nebo derepresi některých enzymů využívajících dostupné živiny. Po této fázi kultura přechází do fáze exponenciálního růstu. U vsádkových jednorázových kultivací dochází ovšem postupně k vyčerpání živin a růst kultury se zpomaluje až kultura dosáhne stacionární fáze. Toto zpomalování růstu může být vyvoláno nejen úbytkem živin, ale i změnou tenze kyslíku, změnou pH nebo zvýšením koncentrace některého toxického extracelulárního metabolitu.

V průtokových (kontinuálních) fermentorech, kde jsou čerstvé živiny kontinuálně dodávány, je možné exponenciální fázi růstu udržovat v podstatě neomezenou dobu (viz např. Gabriel J.: Development of soil microbiology methods: from respirometry to molecular approaches. J Ind Microbiol Biotechnol 2010, 31:1289-1297).

Matematický popis růstových křivek je poněkud odlišný od obvyklého popisu tak jak jej známe u bakteriálních kultur. Již v 50. letech minulého století bylo zjištěno, že exponenciální růst kultury *Neurospora crassa* (kultivované submerzně) lépe popisuje rovnice

$$x^{1/3}_t = x^{1/3}_0 + kt$$

kde x je suchá váha a k je konstanta. Tato odlišnost je patrně dána tím, že zatímco v případě jednobuněčných organismů jsou živiny v každém okamžiku dostupné všem buňkám, u vláknitých hub tomu tak není. Při submerzní kultivaci tvoří vláknité houby pelety, jejichž velikost je často až několik milimetrů. Koncentrace živin uvnitř pelet je mnohem menší než ve vnějším okolí a omezuje tak růst. Může se dokonce stát, že roste pouze vnější okraj myceliální pelety a uvnitř je mycelium již mrtvé.

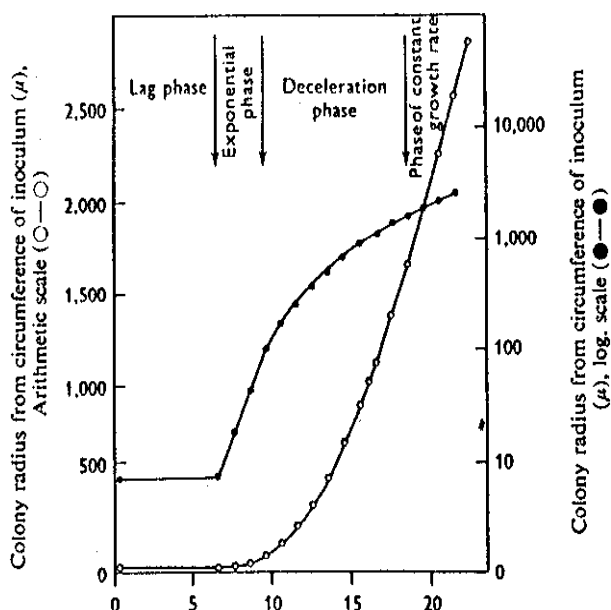
Pro růst vláknitých hub na pevných substrátech je možné použít vztah

$$\ln r = \mu \cdot t/2 + \ln r_0$$

kde je kolonie charakterizována poloměrem r , čas je označen t . Tento exponenciální růst probíhá pokud kolonie nedosáhne poloměru asi 2 až 5 mm. V průběhu růstu však dochází ve středu kolonie k vyčerpání živin a růst v této oblasti zpomaluje. Růst je tak omezen na periferní část kolonie. Přírůstek poloměru kolonie (r) se stává lineární funkcí času

$$r_t = a \cdot \mu \cdot t + r_0$$

kde a je hloubka periferní zóny a μ je specifická růstová rychlost. Experimentální měření potvrdily u povrchově kultivovaných hub krátkou exponenciální fázi následovanou dlouhou fází lineárního růstu. Z obrázku je rovněž dobře patrné, že do exponenciální fáze růstu náleží ty body růstové křivky, které po zlogaritmování leží v přímce.



Obr. 19. Růst kolonie *Aspergillus nidulans* na agarové půdě.

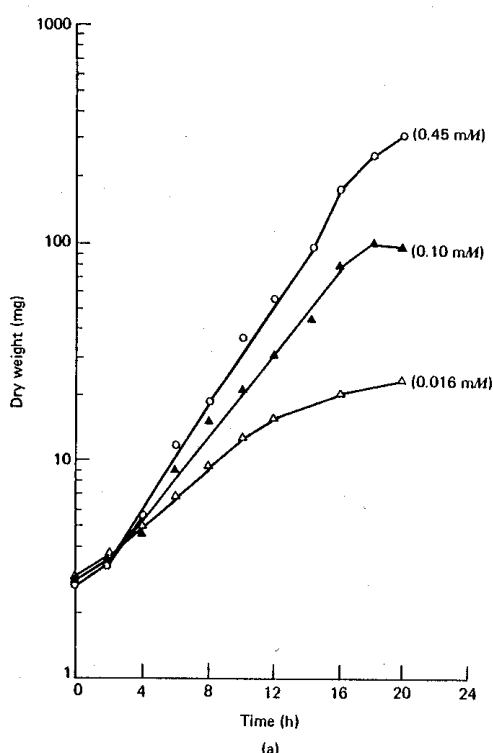
3. Parametry ovlivňující růst kultur hub

A. Živiny

Glukóza je nejběžnější zdroj uhlíku. V literatuře byly dosud popsány pouze dva druhy hub, neschopných využít glukózu, *Leptomitus lacteus* a *Araiospora* sp. Kromě glukózy mohou houby využívat i jiné cukry, jako jsou fruktóza nebo galaktóza. Některé houby mohou jako výhradní zdroj uhlíku využívat i tak neobvyklé sloučeniny jako je např. amygdalin, kys. stearová, digitoxin, testosteron, nikotin, tetracyklin nebo yohimbin (fantazie badatelů zřejmě nezná mezí). Vyčerpání zdroje uhlíku z média vede k zpomalení až zastavení růstu a k přechodu na tzv. sekundární metabolismus, o kterém bude řeč dále.

Houby potřebují k růstu též zdroj dusíku a síry. Oba tyto prvky zabudovávají do svých struktur v redukované formě (amoniak), nicméně je přijímají ve formě oxidovaných anorganických látek (dusičnany). Asimilace dusíku u hub nebyla prokázána. Hladina dusíku hraje zřejmě roli při regulaci některých pochodů sekundárního metabolismu, jak je mj. zmíněno později v části o ligninolytickém enzymovém komplexu.

Houby vyžadují i přítomnost některých vitaminů v živném médiu. Jde zejména o thiamin, biotin, pyridoxin, nikotinamid, riboflavin, vitamin B12 a někdy i *p*-aminobenzoovou kyselinu. Tyto látky, pokud nejsou v médiu přítomny (v komplexních půdách), musejí se ve stopových množstvích do půd přidávat.



Obr. 20. Vliv draslíku na růst *Neurospora crassa*.

Důležitou součástí půd jsou i minerální látky. V případě komplexních půd jsou zpravidla obsaženy ve výchozích surovinách a není je třeba dodávat. Houby obecně vyžadují k růstu mimo K, Na a Mg přítomnost stop vápníku, mědi, železa, manganu,

kobaltu a molybdenu. Tyto prvky jsou součástí různých buněčných struktur (Ca), nebo jsou součástí enzymů (Fe - porfyriny, Zn - alkoholdehydrogenáza nebo RNA polymeráza), nebo jsou vyžadovány v nízkomolekulární podobě (ATP-Mn, B12-Co).

B. Voda, teplota a pH

Voda je nezbytná pro růst hub stejně tak jako ostatní živiny. V tekutých kulturách samozřejmě nedochází k limitaci růstu nedostatkem vody, ale může se projevit při dlouhodobých kultivacích na agarových miskách. Z experimentů s kultivacemi hub na mleté slámě vyplývá, že některé druhy hub rostou pouze při určitém poměru sláma-voda. Obsah vody v substrátu však nezaměňujem s relativní vlhkostí vzduchu v místě kultivace.

Relativní vlhkost (RH) je definována jako podíl tlaku vodní páry nad substrátem a nad čistou vodou; uvádí se obvykle v %:

$$RH = p/p_0 \times 100$$

Houby rostou v rozmezí 65 - 99 % relativní vlhkosti. Růst je inhibován při cca 55 % RH, kdy dochází k denaturaci DNA. V čisté vodě (100 % RH) je růst nemožný v důsledku nepřítomnosti živin.

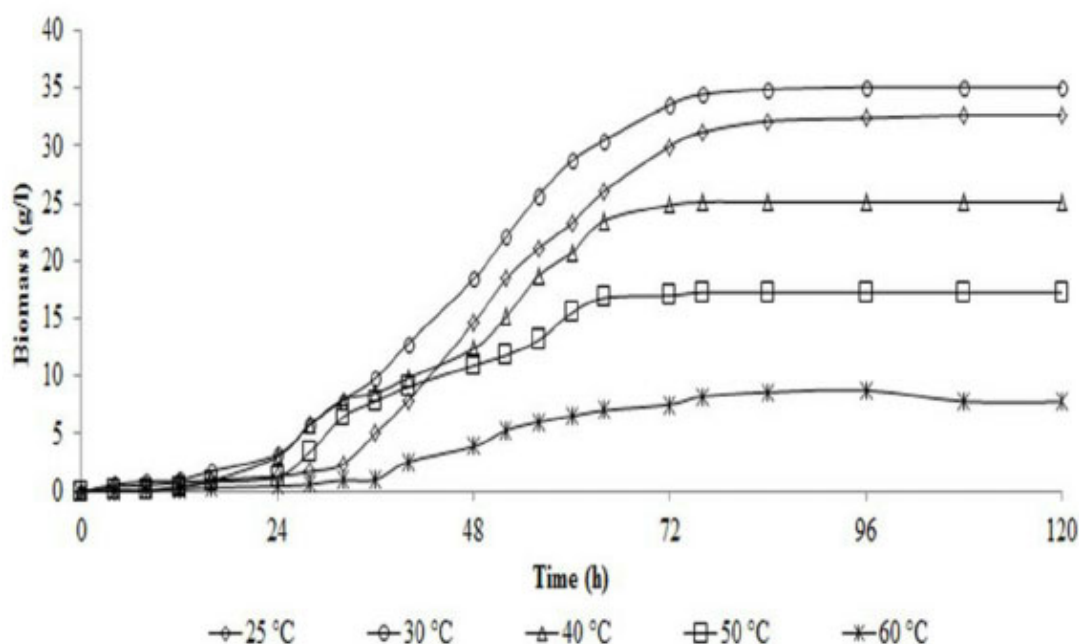
Rozdíl mezi oběma faktory se snad nejlépe ozřejmí na příkladu dřevokazných hub, jež napadají dřevo od hodnoty 26 - 32 % vlhkosti dřeva. Dřevo již opracované, tj. rozřezané a vyschlé obsahuje zpravidla pouze 15 - 18 % vody, což zpravidla k růstu hub nepostačuje (čestnou výjimkou je *Serpula lacrymans*; tato houba hnědé hniloby napadá dřevo obsahující 20 - 24 % vlhkosti a v průběhu rozkladu produkuje podle některých autorů metabolickou vodu, která zvyšuje vlhkost substrátu).

Houby se velmi liší ve svých nárocích na teplotu; teplotní optimum pro řadu hub se však pohybuje v rozmezí 20°C až 40°C. Příklady optimálních teplot pro kultivace hub jsou uvedeny v tabulce:

organismus	optimální teplota (°C)
<i>Xylaria hypoxylon</i>	18
<i>Merulius lacrymans</i>	19
<i>Coniophora puteana</i>	23
<i>Trametes versicolor</i>	26
<i>Daedalea quercina</i>	29
<i>Gleophyllum sepiarium</i>	31

Mezi výjimky potvrzující pravidlo náleží na jedné straně např. *Sclerotinia borealis* (roste v rozmezí -7°C - 20 °C, optimální teplota 0 °C) a *Calonectria nivalis* (2 °C - 28 °C; 12 °C) a na druhé straně např. *Rhizomucor pusillus* (20 °C - 55 °C; 40 °C) a *Thermomyces lanuginosus* (30 °C - 60 °C; 48 °C). S takovými houbami však do styku nejspíš v praxi nepřijdeme vůbec.

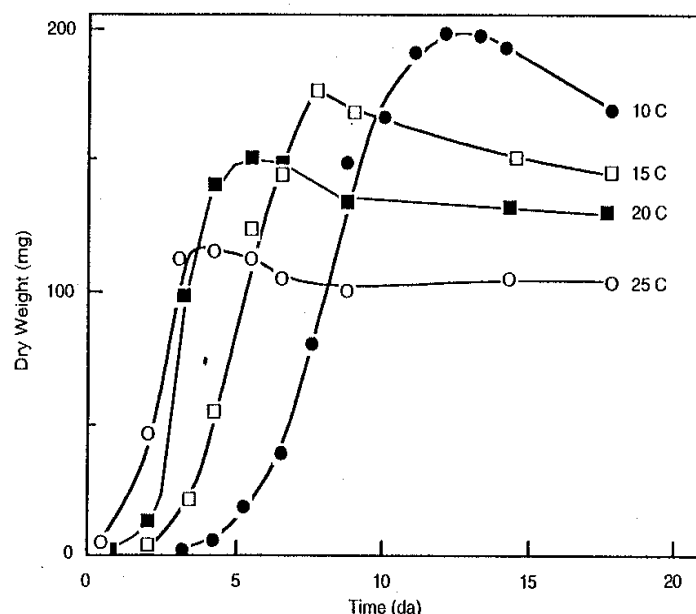
Poněkud překvapivé může být zjištění, že klanolístka obecná (*S. commune*), běžně rozšířená houba v mírném pásu, má teplotní optimum okolo 35°C, což je blízké teplotě lidského těla.



Obr. 21. Vliv teploty na růst *S. commune* (Effect of temperature on the growth by *Schizophyllum commune* in a bubble column bioreactor. Převzato z Effect of Temperature on *Schizophyllum commune* Growth and 4H-pyran-4-one,2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-Production using a Bubble Column Bioreactor; July 2015, Chiang Mai Journal of Science 42(Issue 3):539-548.)

Kdysi (Vesmír 77, září 1998, str. 504-505) jsme popsali případ, kdy bylo japonské ženě, trpící tuberkulózou, odstraněno z průdušnice několik tuhých myceliálních útvarů klanolístky; nejdelší byl 5 cm dlouhý a měřil 0,8 cm v průměru (tedy jako nepovedený učňovský párek). Další příklady invaze dřevokazných hub, popsané vesměs u imunodeficientních pacientů (oči, ledviny, mozek) nalezne zájemce tamtéž. Infekce, způsobené těmito houbami jsou poměrně vzácné, avšak nebezpečné hlavně pro jejich obtížnou diagnostiku. Počet zaznamenaných případů onemocnění člověka způsobených basidiomycety nepřekračuje několik desítek ročně; většina takových onemocnění však zřejmě ústává nerozpoznána či je léčena jako jiná nemoc.

V poslední době je snad možné odhalit houbové infekce podle přítomnosti typických houbových markerů (metabolitů) v krvním séru pomocí kombinace kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí; tato technika by měla být běžně k dispozici ve všech větších nemocnicích.



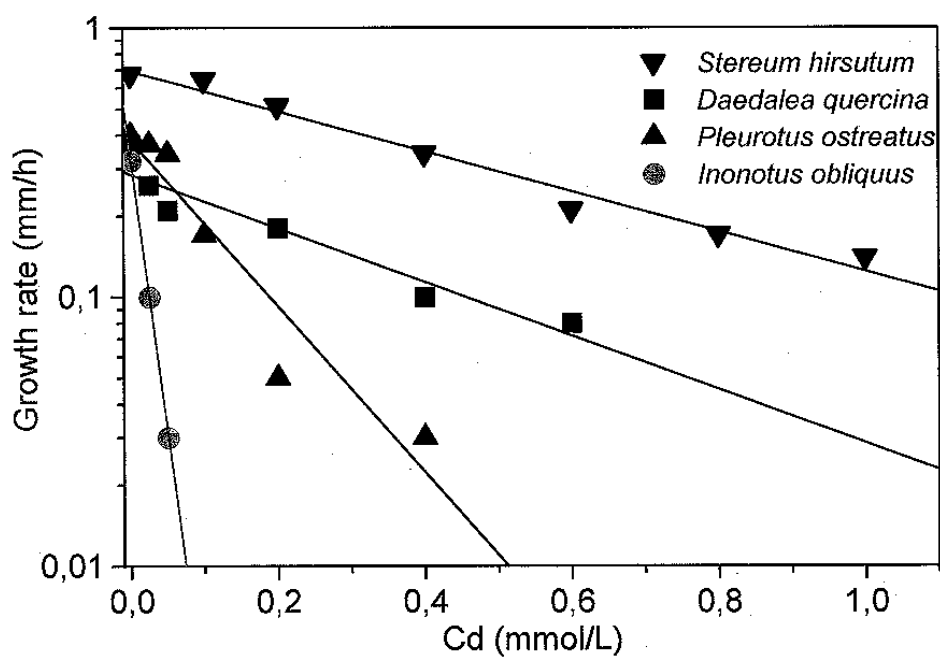
Obr. 22. Vliv teploty na růst *Phycomyces* sp.

Dalším důležitým faktorem ovlivňujícím růst kultury je pH. Podobně jako u teploty, existuje určité rozmezí pH při kterém nedochází ke zpomalování růstu. Optimální pH pro růst většiny vyšších hub leží v neutrální či mírně kyselé oblasti (5 - 7). Je na to nutno pamatovat při přípravě laboratorních médií a vždy kontrolovat pH, odpovídá-li návodu. Vyvarujeme se tak zbytečným problémům a opakování kultivací, vedoucích k nejednoznačným výsledkům (opět z vlastní praxe).

Růst je dále ovlivněn i viditelnou i neviditelnou radiací, dostupným kyslíkem a koncentrací oxidu uhličitého. Kultivace se obvykle provádějí v termostatovaných místnostech ve tmě. Přísun kyslíku je zajištěn třepáním kultur a volná difuze plynů přes vatové resp. buničinné zátky omezuje inhibici CO₂ u submersních kultur na minimum.

Zkušenost s kultivováním hub na slámě však praví, že lepšího nárůstu biomasy se docílí v těch baňkách, ve kterých se po dobu prvních pěti dnů zabrání výměně plynů. Oxid uhličitý zřejmě působí lepší prorůstání inokula do substrátu, alespoň v počáteční fázi růstu.

Konečně růst může být ovlivněn přítomností toxických látek v médiu. Může jít o látky biogenní nebo i umělé. Některé vyšší houby produkují metabolity s antifungálním účinkem (např. mucidin u basidiomycetu *Oudemansiella mucida*, řada lišejníkových kyselin). Inhibice růstu nižších i vyšších hub těžkými kovy je základem většiny dosud vyráběných ochranných nátěrových látek (obsahujících zpravidla kombinaci sloučenin Cu, Cr a Zn, dale bóru či organických látek včetně kreosotu). Dříve se k tomu účelu používaly sloučeniny rtuti, v 60. letech však byl tento kov opuštěn. Více např. v článku "Některé aktuálně používané chemické přípravky proti dřevokazným houbám a mechanismus jejich účinku"; F. Zaleš a J. Gabriel, Chem. Listy 115, 91-98 (2021).



Obr.23. Vliv kadmia přidaného do agarové půdy na růstovou rychlost různých basidiomycetů. Je vidět, že odezva na stejné koncentrace toxického kovu v prostředí je různá podle druhu houby.



Obr. 24. Klanolístka (*S. commune*), opouštějící zapomenutou Petriho misku. Plodnice vyrostla při 4°C v lednici během čtyř měsíců od inokulace.

Kapitola IV. Primární a sekundární metabolismus u hub

Podstatnou částí učebnic biochemie je výklad universálně rozšířených metabolických drah, které popisují základní tok energie a živin v buňkách. Aktivitu enzymů např. glykolýzy nebo citrátového cyklu je možné detekovat v každém okamžiku života buňky (resp. kultury) a jakékoli narušení těchto metabolických drah vede k záhubě organismu. Tyto základní metabolické dráhy se často shrnují pod pojem "primární metabolismus". Produkty primárního metabolismu jsou látky v živé přírodě universálně rozšířené (cukry, aminokyseliny, proteiny, složky nukleových kyselin atd.). Některé látky, které také řadíme mezi produkty primárního metabolismu, nejsou již rozšířeny tak universálně; např. chlorofyl, nezbytný pro většinu rostlin, se u hub nevyskytuje, cholesterol, nezbytný pro živočichy, je u většiny hub nahrazen ergosterolem a konečně chitin se v přírodě vyskytuje pouze u členovců a u hub.

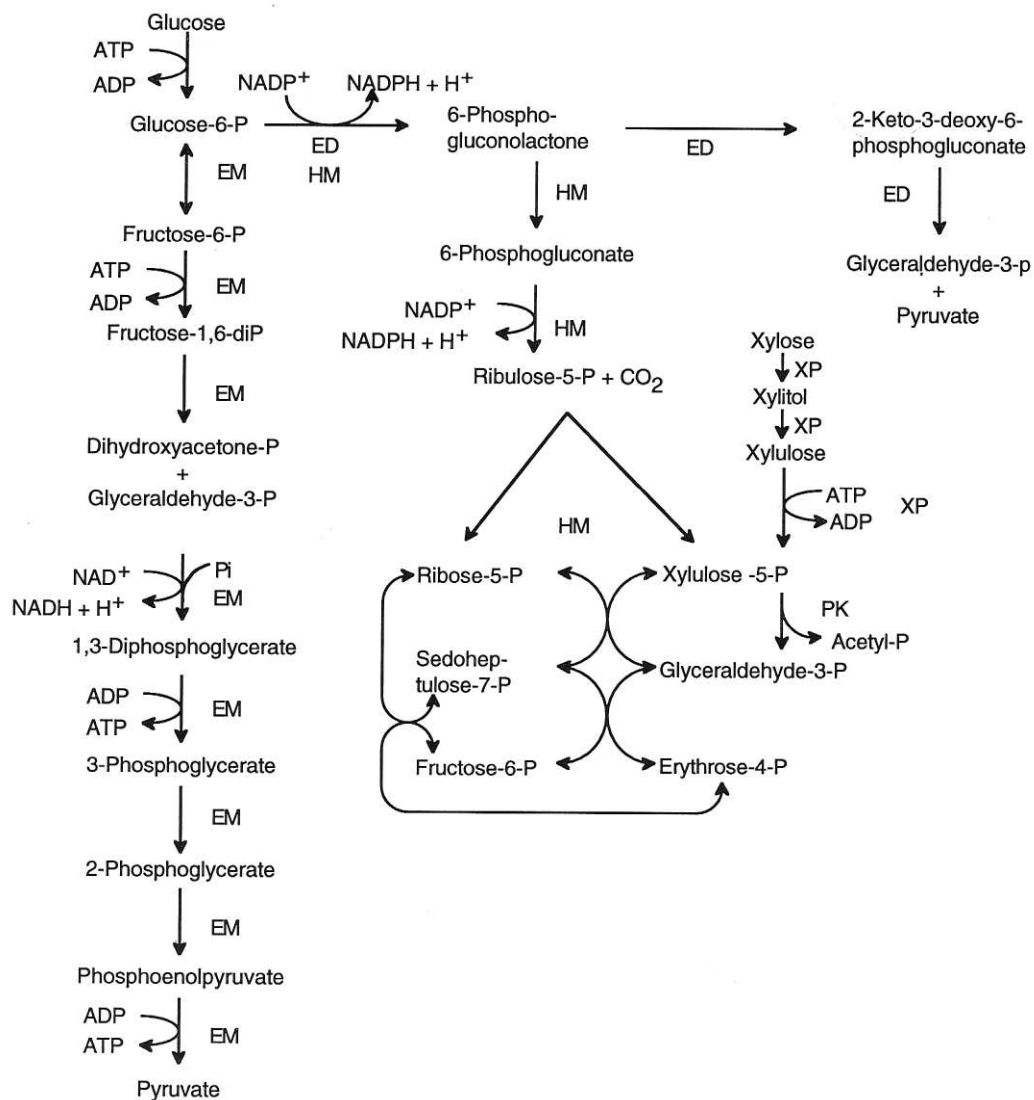
Naproti tomu u řady organismů byly objeveny látky, jejichž chemická struktura byla neobvyklá (např. obsahovala neobvyklé heterocykly a jiné struktury neznámé z primárního metabolismu - viz alkaloidy u rostlin nebo antibiotika u vláknitých hub). Výskyt takových látek byl zpravidla omezen na určitou skupinu organismů (mikroorganismů) a u řady z nich byly zjištěny nejrozličnější biologické aktivity. Systematickým studiem bylo zjištěno, že za vznik těchto látek jsou odpovědné enzymy, jejichž aktivita v buňkách je zpravidla v počáteční fázi růstu kultury nulová a nastupuje až ve stacionární fázi růstu, v době kdy již došlo k vyčerpání živin z fermentačního média. Látky byly souhrnně nazvány sekundárními metabolity a metabolické dráhy k nim vedoucí dostaly souhrnný název sekundární metabolismus.

Historicky byl termín primární a sekundární metabolismus poprvé užít Kossel v roce 1891 a velmi brzy se jeho použití rozšířilo z rostlinné biochemie i do mikrobiologie. Je ovšem pravda, že o přesné vymezení termínu "sekundární metabolismus" se čas od času vedou spory. Přispívá k tomu asi fakt, že u některých organismů nelze dostatečně exaktně popsat vztah mezi aktivitou enzymů sekundárního metabolismu a určitou částí růstové křivky. Typickým příkladem je produkce alkaloidů u rostlin nebo tzv. lišejníkových kyselin u lišejníků.

1. Velmi stručně o primárním metabolismu u hub

Základními kameny primárního metabolismu jsou glykolýza, citrátový cyklus včetně anaplerotických reakcí, dýchací řetězec, biosyntéza aminokyselin, pentózový cyklus a dráhy spojené s metabolismem mastných kyselin. Metabolické dráhy primárního metabolismu mají vesměs všeobecnou platnost, a proto v této části budeme věnovat pozornost pouze některým zvláštnostem popsaným u kultur hub.

Glykolýza, jeden z nejdůležitějších procesů v buňkách, je konverze cukrů na pyruvát nebo acetyl-koenzym A. Jsou popsány tři dráhy glykolýzy hexos, které se označují jako Emden-Meyerhof-Parnasova dráha (EM), hexoso-monofosfátová dráha (HM) a Entner-Doudoroffova dráha (ED). Všechny tři obsahují glukosa-6-fosfát a glyceraldehyd-3-fosfát. Dále byly popsány dvě dráhy glykolýzy pentos, xylitolová dráha (XP) a fosfoketolázová dráha (PK). Zatímco EM, HM a XP dráhy jsou u hub velmi rozšířené, ne-li universální, PK dráha je rozšířena u kvasinek. Znalosti o rozšíření ED dráhy u hub jsou dosud pouze velmi omezené.



Obr. 25. Připomenutí glykolýzy. Opět z knihy Fungal Physiology (D. H. Griffin, Wiley-Liss 1994).

Určitou představu si lze udělat z následující tabulky, vyjadřující v procentech zapojení různých drah do metabolismu glukózy u několika hub:

organismus	EMP	HM	ED
<i>Caldariomyces fumago</i>	0	35	65
<i>Claviceps purpurea</i>	90-96	4-10	0
<i>Penicillium chrysogenum</i>	80	20	0
<i>Rhizopus</i> sp.	100	0	0
<i>Tilletia caries</i> - spory	0	0	100
<i>T. caries</i> - mycelium	66	34	0

Je třeba se ještě zmínit o poměrně rozšířené glukóza oxidáze, jenž umožňuje metabolismus glukózy bez předchozí fosforylace. Glukóza je oxidována na glukonolakton resp. glukonovou kyselinu, která je dále metabolisována.

U hub byly popsány i dvě dráhy alternativní respirace. Na rozdíl od obvyklého cytochromového modelu jsou inertní vůči kyanidu. Inhibičním činidlem je buď salicyl hydroxamát (SHAM) nebo azid. SHAM-dráha přijímá elektrony na úrovni ubichinonu a převádí je na kyslík bez fosforylace ADP. Azid-sensitivní dráha je často považována za mitochondriální dráhu a přijímá elektrony z NADH, ale ne ze sukcinátu. Mezi houby odolné vůči kyanidu náleží např. *Myrothecium verrucaria*, *Ustilago sphaerogena* a některé kvasinky. Vysvětlení lze snad hledat u vyšších rostlin, které obsahují cytochrom b₇, jenž je vůči kyanidu resistantní.

Schopnost některých hub (resp. kvasinek) využívat *n*-alkany jako zdroje uhlíku je založena na jejich oxidaci monooxygenasami za účasti cytochromu P450.

Další metabolickou dráhou specifickou pro houby je syntéza chitinu. Enzymy podílející se na syntéze chitinu jsou lokalizovány v cytosolu jako 105S částice zvané chitosomy. Chitin syntáza katalyzuje přenos *N*-acetylglukosaminu z UDP-GINAc na prodlužující se řetězec.

Asi u 40 druhů hub, vesměs u basidiomycetů (např. u rodu *Panellus*, *Armillaria*, *Mycena*, *Pleurotus* aj.), byla popsána bioluminiscence. Mechanismus bioluminiscence je znám; nízkomolekulární látka, označovaná jako "luciferin" je v přítomnosti kyslíku oxidována enzymem luciferasou. Chemická povaha "luciferinu" je různá podle druhu organismu, u hub však dosud tyto látky identifikovány nebyly. Mechanismus bioluminiscence u hub je velmi příbuzný bioluminiscenci u bakterií, má ale výrazný rozdíl v tom, že se děje neúčastní FAD nebo FMN:

BAKTERIE:



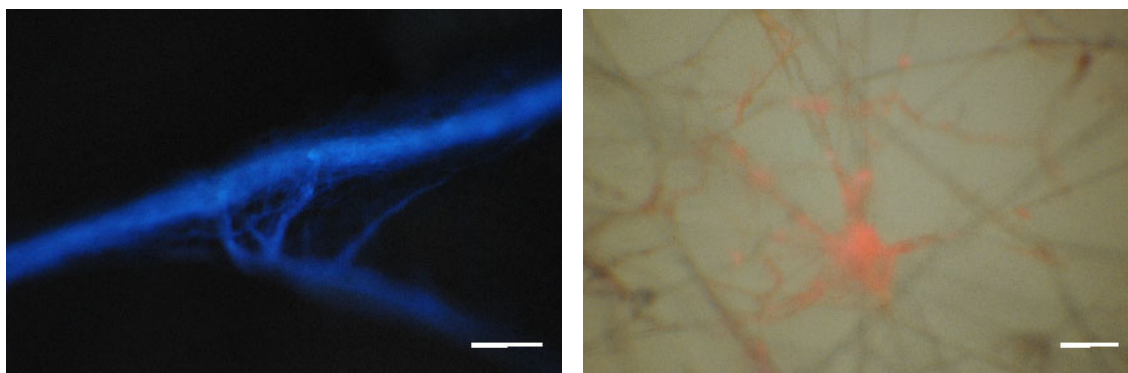
HOUBY:



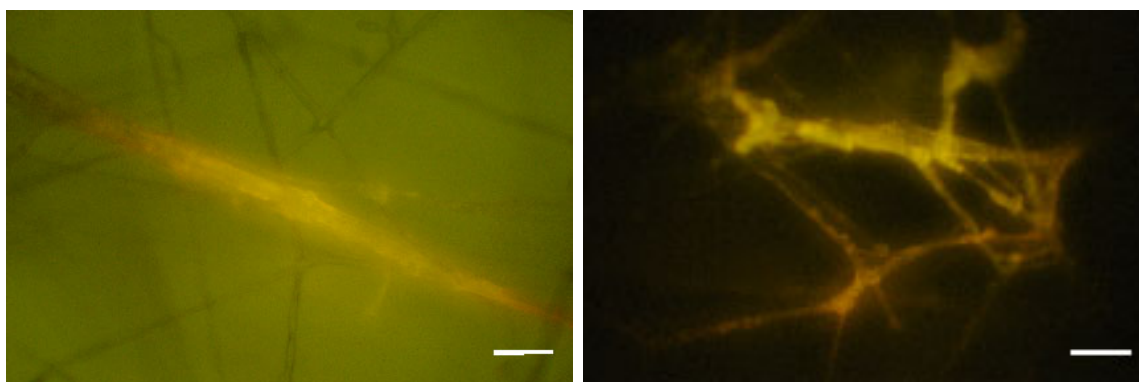
Luminiscenci hub se rozsáhleji věnuje např. článek "Bioluminiscence hub – odvěký a stále záhadný fenomén", M. Sochor, Z. Egertová, *Živa* 6/2015, str. 283-284. Sám jsem navzdory mnoha nočním experimentům (s václavkami) v přírodě tento fenomén nikdy nepozoroval.

V laboratorních podmínkách byla popsána autofluorescence několika basidiomycetů, např. *Macrolepiota rhacodes*, *Morchella conica* nebo *Fomes fomentarius* (Žižka a Gabriel, *Folia Microbiologica*, r. 2006, 2011). Vliv některých kovů, přítomných v kultivačním médiu na autofluorescenci březovníku (*P. betulinus*) nebo dřevomorky (*S.*

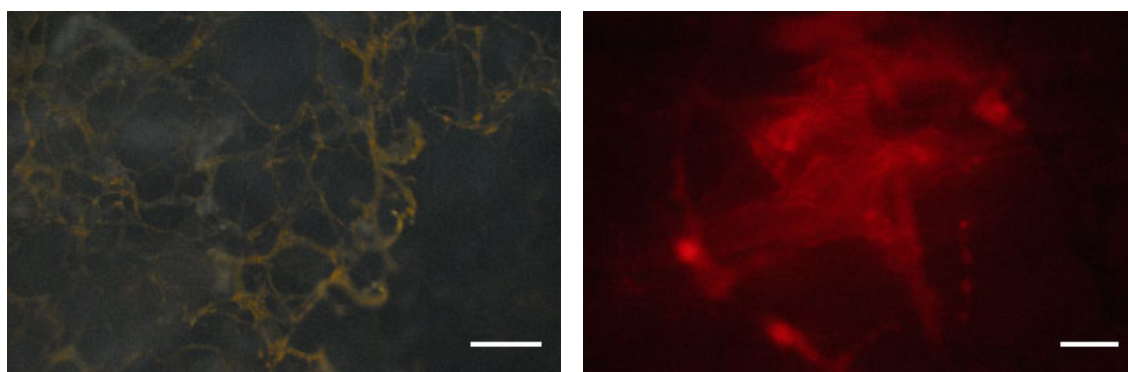
lacrymans) je dokumentovaný na následujících obrázcích (více viz Žižka, Gabriel, Folia Microbiologica 55, 625-628 (2010), nebo Gabriel et al. Folia Microbiologica 61, 119-128 (2016). Sám chitin fluoreskuje výrazně žlutě (při excitaci modrým světlem).



Obr. 26. Běžná autofluorescence mycelia *S. lacrymans* (vlevo UV excitace, vpravo excitace modrým světlem).



Obr. 27. Žlutá autofluorescence nalezená při kultivaci *S. lacrymans* v přítomnosti Mn (vlevo) a Cd (vpravo), excitace modrým světlem.



Obr. 28. Žlutá autofluorescence nalezená při kultivaci *S. lacrymans* v přítomnosti Cd (vlevo, UV excitace) a červená (vpravo, excitace zeleným světlem).

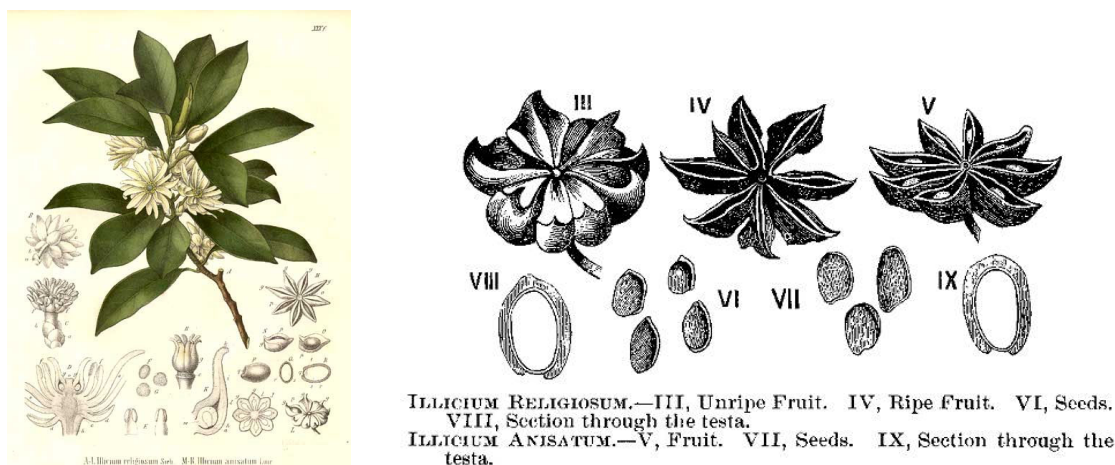
2. Hlavní metabolické dráhy sekundárního metabolismu

Při studiu sekundárního metabolismu je třeba si v první řadě uvědomit, že nejde o izolovaný systém enzymů, ale že tyto enzymové dráhy volně navazují na dráhy primárního metabolismu. Např. D-glukosa může být u hub spotřebována v primárním metabolismu např. redukcí na sorbitol, isomerací na fruktosu nebo může být po fosforylaci spotřebována v glykolytickém systému. U některých hub je ale popsána C-2 oxidace na 2-keto-D-glukosu (dikarbonylový cukr, D-glukoson), která je dále dehydratována za vzniku β -pyronu cortalceronu, látky s antibiotickou aktivitou.

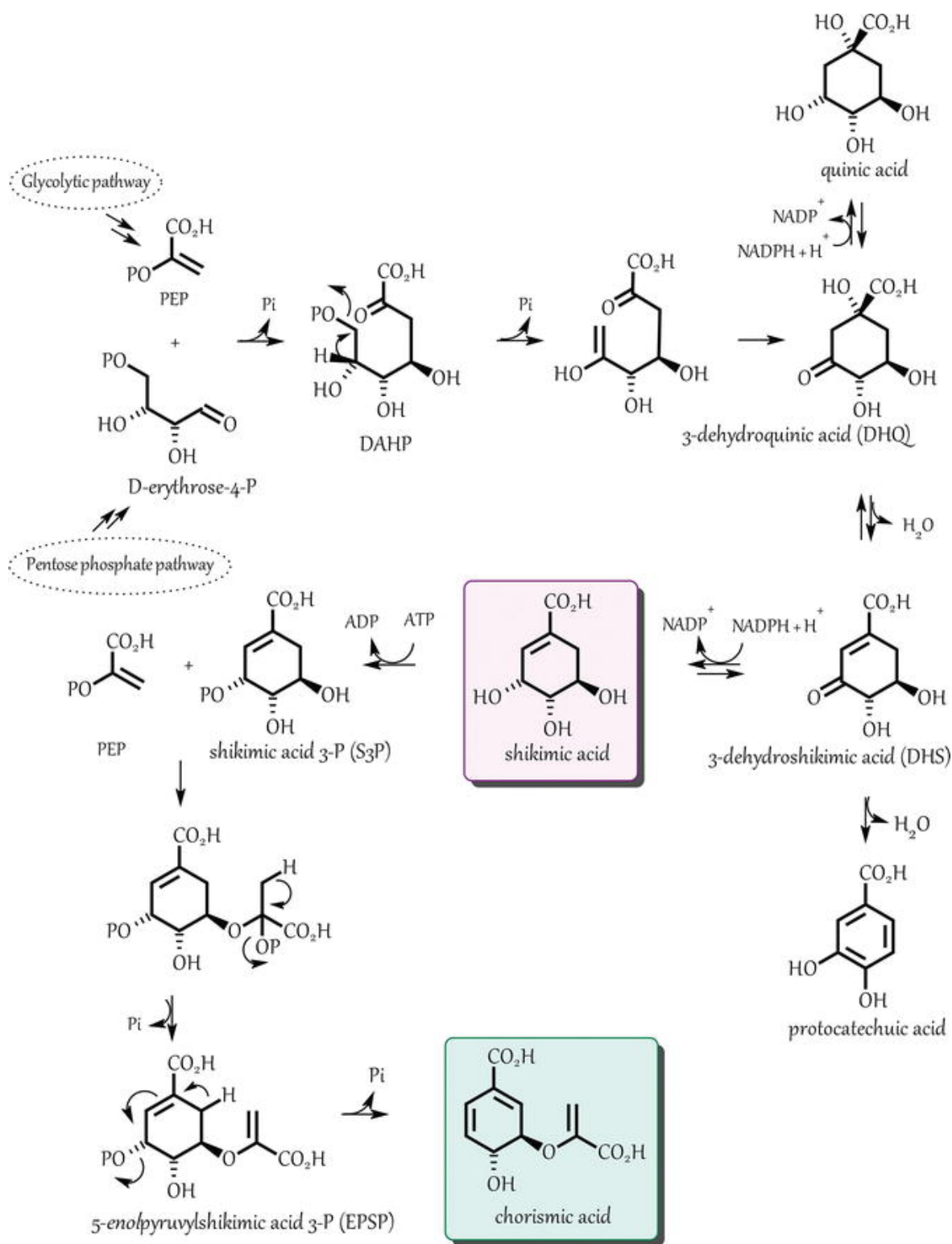
Řada produktů sekundárního metabolismu má výrazné farmakologické účinky. Houby byly proto od pradávna využívány jak v lidové, tak později i v oficiální medicíně; více se tomuto tématu věnuje samostatná kapitola.

2.1. Cesta šikimátová

Základní význam šikimátové dráhy spočívá v biosyntéze aromatických aminokyselin fenyloalaninu, tyrosinu a tryptofanu. Její intermediáty jsou ale častým výchozím materiálem pro biosyntézu sekundárních metabolitů, obsahujících aromatické jádro. Schema cesty šikimátové je uvedeno dále. Kyselinu šikimovou isoloval v r. 1885 holandský badatel J. F. Eijkman během své stáže v Tokiu z badyánníku posvátného (*Illicium religiosum*), který se japonsky nazývá šikimi-no-ki.



Obr. 29. *I. religiosum*. Převzato z <http://giulioveronese.com/illicium-religiosum/>



Obr. 30. Dráha šikimátová. Podle <https://www.intechopen.com/books/plant-physiological-aspects-of-phenolic-compounds/shikimic-acid-pathway-in-biosynthesis-of-phenolic-compounds>.

Příklady některých metabolitů:

*drosophilin A, např. *Drosophila substrata*

Drosophilin A (*p*-methoxy-tetrachlorfenol) byl izolován z křehutičky rezavoumbrové (*Psathyrella substrata*, syn. *Drosophila substrata*). Působí proti viru poliomyelitidy. Derivát tohoto antibiotika, *o*-methyl-drosophilin A byl izolován z ohňovce bujného (*Phellinus faustus*).

*pulvinová kyselina a její deriváty (např. *Boletus satanas*)

Deriváty kyseliny pulvinové, kys. xerokomová nebo variegová jsou odpovědné za modrání dužiny modrajících hřibů. Vyskytují se i v některých lupenatých houbách. Některé z těchto látek mají podle laboratorních pokusů stimulační účinek na hladké svalstvo nebo antikoagulační účinky.

*2,5-dimethoxybenzochinon (thermofylin, např. *Gloeophyllum trabeum*).

Byl izolován z *Gl. Trabeum*. Je účinný proti kokům. Podobná látka byla izolována z trávky plotní ruskými autory, její struktura však nebyla dosud určena.

Některé další významnější látky:

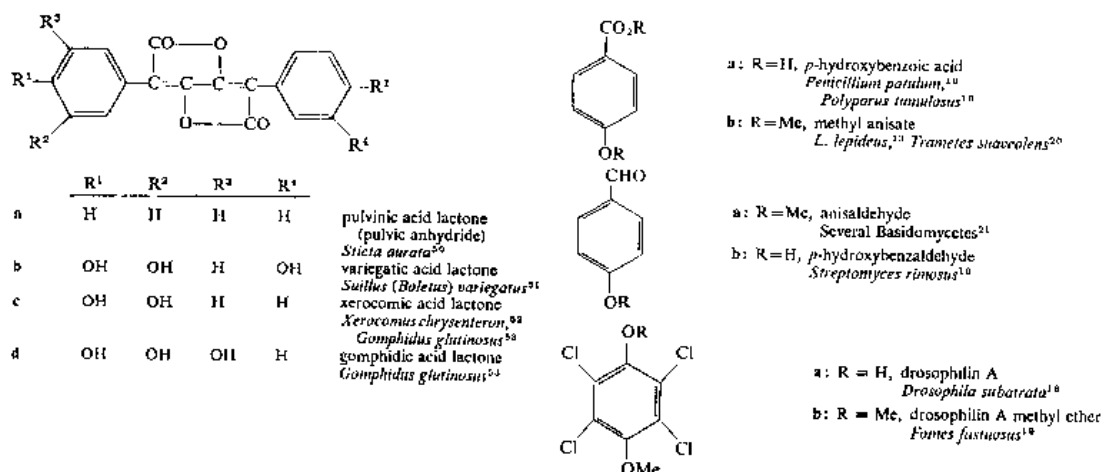
* anisaldehyd, produkován četnými basidiomycety

* 3,4,5-trihydroxybenzaldehyd, např. *Boletus scaber*

* polyporic acid, *Polyporus* spp., lišejníky

*3,4-dihydroxyskořicová kyselina, např. *Boletus scaber*

*4-hydroxyfenyloctová kyselina, např. *Polyporus tumulosus*



2.2. Polyketidy: acetát-malonátová dráha

Zatímco řada metabolických drah uvedených v této části může poskytovat primární i sekundární metabolity, polyketidová cesta vede téměř výlučně k sekundárním metabolitům. Charakteristickým rysem je kondensace acetátu s malonátem a následnou dekarboxylací (podobně jako při biosyntéze mastných kyselin), avšak bez redukce

výsledného beta-dikarbonylového systému. Výsledný systém (poly- β -ketometylen) zvaný zkráceně polyketid dal název celé metabolické dráze. Enzym odpovědný za syntézu poly- β -ketometylenů patří mezi HS-specifické ligázy a kromě cesty šikimátové jde o druhý dosud známý způsob vzniku aromatů v přírodě. Mezi polyketidy se řadí velké množství obecně známých sekundárních metabolitů, např. tetracykliny nebo aflatoxiny. Příklady některých látek jsou uvedeny níže.

Rozhodnout, zda aromatická látka vznikla cestou šikimátovou nebo acetátovou, je možné s použitím značených substrátů. Na příkladu antibiotika griseofulvinu (heptaketidu) je také dobře vidět, který uhlík pochází z karboxylové a který z metylové skupiny acetátu.

Podle počtu acetátových jednotek se polyketidy v rámci podrobnějšího členění rozlišují na tetraketidy, pentaketidy atd. Na schématu tedy patří norsolorinic acid (lišejník *Solorinia crocea*) mezi deketetidy, aflatoxiny (*Aspergillus flavus*) mezi nonaketidy (8 x C₂).

Příklady metabolitů:

* orsellinic acid, lišejníky, houby

Jeden z nejjednodušších tetraketidů. Je základem řady strukturně podobných látek; byla izolována z lišejníků a z řady nižších hub. Je detekována ve velmi malých množstvích, což patrně souvisí s jejími dalšími metabolickými přeměnami.

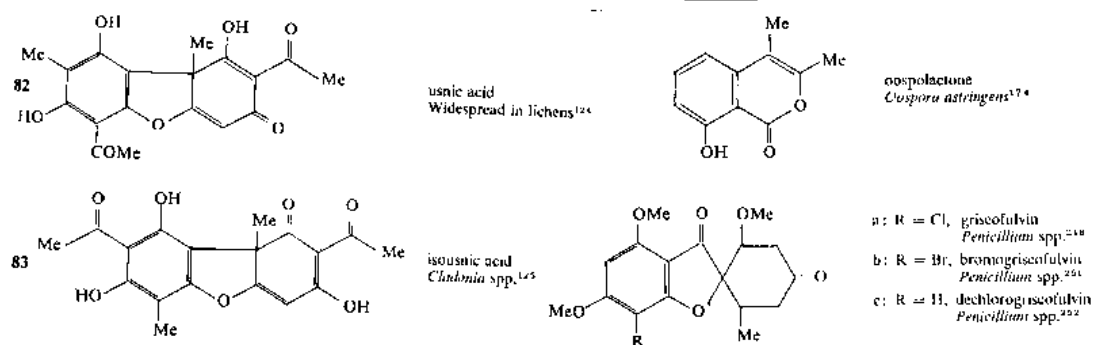
* usnic acid, lišejníky

Kyselina usnová (také tetraketid) se nachází v poměrně velkém množství v různých lišejnících. Je to jedno z mála lišejníkových antibiotik, které bylo používáno v praxi: ve formě sodné soli se užívalo v bývalém SSSR, ale i v NSR především zevně na záněty a různé kožní infekce. Z lišejníků, především z *Cladonia* sp. ji je možné izolovat jednoduchou extrakcí do acetonu a následným překrystalováním. Dává žluté tenké jehlice.

* oospolakton, *Gl. sepiarium*

Toto antifungální antibiotikum isokumarinového typu bylo poprvé izolováno z kultur *Oospora astrigens*. Později jej Japonci izolovali i z trávky plotní. Je představitelem pentaketidů.

Z dalších známějších oligoketidů jmenujme např. heptaketid griseofulvin, nonaketidy aflatoxiny a tetracykliny.



2.3. Terpeny: cesta mevalonátová

Terpeny a steroidy jsou obecně rozšířené látky a je nutno říci, že pouze malá část dosud popsaných terpenů je houbového původu. Biosyntéza terpenů, vycházející z isopentenyl fosfátu je někdy označována jako cesta mevalonátová. Na rozdíl od polyketidů, které jsou často dobře krystalisující látky, jsou terpeny zhusta amorfni a hygroskopické látky, jež nebývají stabilní a na světle a teple se brzy rozkládají.

Příklady metabolitů:

* kyselina hirsutová, *Stereum hirsutum*

Z pevníku chlupatého byla izolována kyselina hirsutová, účinná např. proti *Micrococcus pyogenes*, *Corynebacterium diphtheriae* a *Neisseria meningitis*. Tato látka je však značně toxická; množství 3 mg je pro myš smrtelné.

* kyselina marasmiová, např. *Marasmius conigenus*

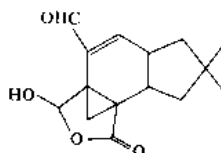
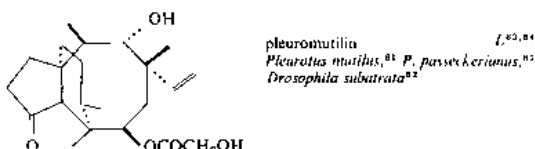
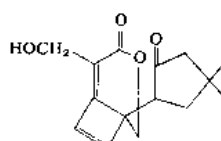
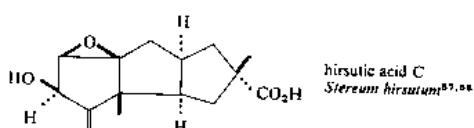
Z kultur penízovky provázkové (*Strobilurus conigenus*, syn. *Marasmius conigenus*), vyrůstající na borových šiškách, byla izolována kyselina marasmiová. Je účinná proti bakteriím (mj. *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*) i některým houbám.

* fomannosin a fomannoxin, *Heterobasidium annosus*

Tyto látky jsou velmi fyto toxické; udává se, že 88 µg dostačuje k uhynutí mladého stromu. Kořenovník vrstevnatý (*Heterobasidium annosus*, syn. *Fomes annosus*) je znám jako velmi rozšířená fytopatogenní houba, který napadá a hubí jehličnany.

* pleuromutilin, *Pleurotus mutilis*

Ze strmělky Josserandovy (*Clitocybe josserandii*, syn. *Pl. mutilis*) bylo izolováno antibiotikum pleuromutilin, účinné proti bakteriím i virům. V r. 1976 bylo vyrobeno 70 derivátů pleuromutilinu, které byly až stonásobně účinnější než původní pleuromutilin, a to především proti G+ bakteriím a mykoplazmám. Současně vykazovaly relativně malou toxicitu a léčivo na bázi pleuromutilinu (Tiamulin) bylo používáno v SRN ve veterinární praxi.



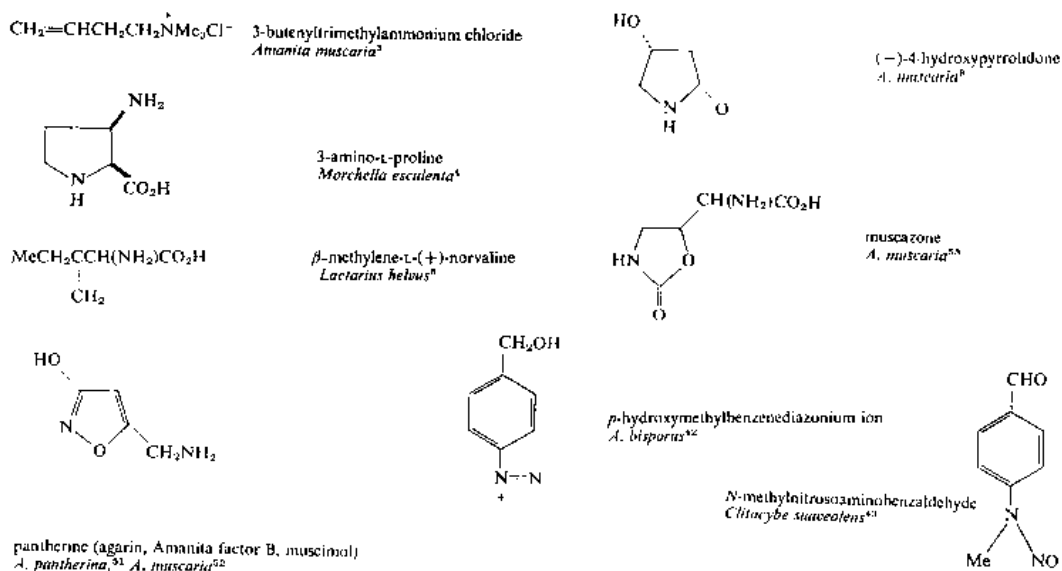
2.4. Deriváty aminokyselin

Některé sekundární metabolity vznikají bezprostřední přeměnou běžných primárních metabolitů. Jejich biosyntéza nevychází tedy ze základních acetátových jednotek, nýbrž z cukrů, aminokyselin nebo alifatických kyselin syntetizovaných v rámci

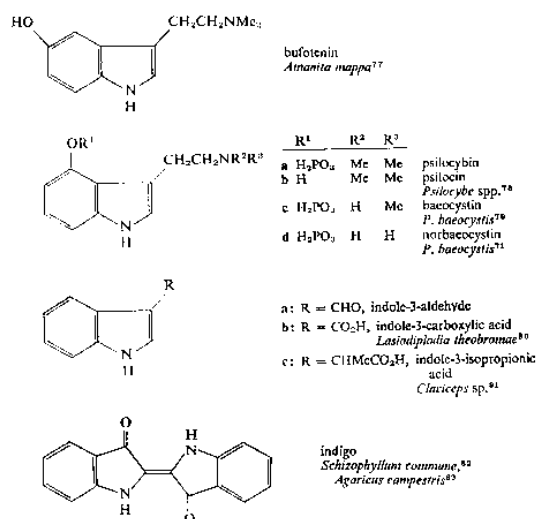
primárního metabolismu. Deriváty aminokyselin jsou díky přítomnosti dusíku strukturně i biologickými účinky poněkud odlišné od derivátů ostatních primárních metabolitů.

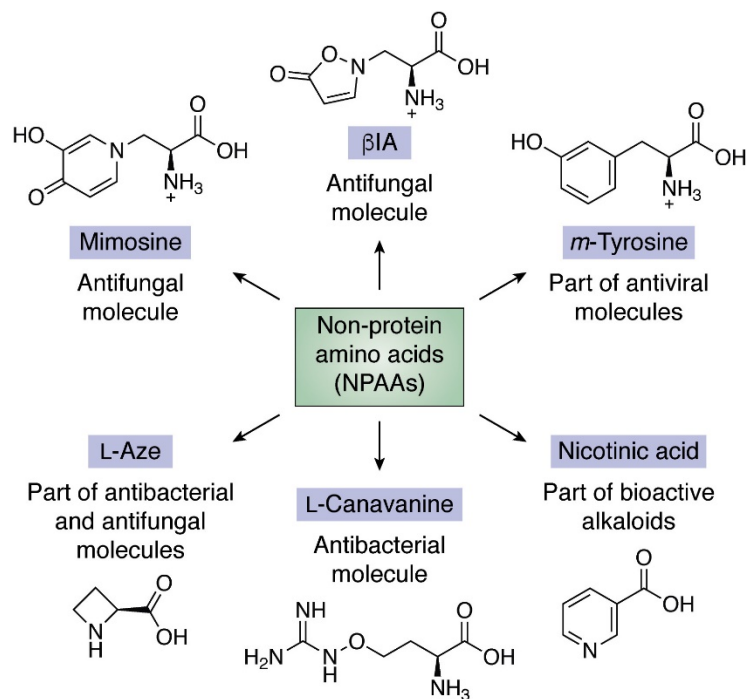
A. Deriváty jedné aminokyseliny

Mezi látky s jednoduchou strukturou patří např. 3-amino-L-prolin (*Morchella esculenta*) nebo β -methylene-L-(+)-norvalin (*Lactarius helvus*). N-methylnitrosaminobenzaldehyd (*Clitocybe suaveolens*) je jednou z několika málo látek obsahujících N-N vazbu. Insekticidní látky izolované z plodnic *Amanita muscaria*, např. muscazon



nebo (-)-4-hydroxypyrrolidon jsou strukturně podobné s cykloserinem, produkovaným streptomycety. Za zmínku stojí i barevný pigment cinnabarin (*Polyporus cinnabarinus*), účinný proti G⁺ bakteriím a *Micrococcus pyogenes* a dále např. látky iontového charakteru, p-hydroxymethylbenzendiazonium (*Agaricus bisporus*) nebo trigonellin (*Polyporus sulphureus*). Z farmaceutického hlediska jsou významné ještě dvě skupiny látek, deriváty indolu psilocin a psilocybin (*Psilocybe* spp.), látky s halucinogenními vlastnostmi a námelové alkaloidy (agroclavin, elymoclavin).

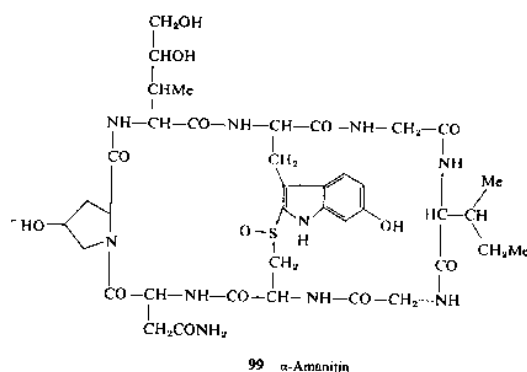
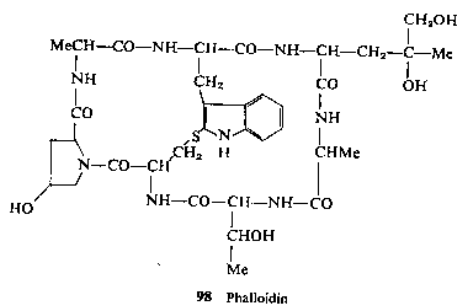




Toto schema je převzato z A. Parthasarathy et al., JBC 296:100438 (2021).

B. Deriváty dvou a více aminokyselin

Sem náleží např. jednoduché diketopiperaziny, jako u lišejníků běžný picroroccellin, peniciliny a cefalosporiny. Mezi deriváty více aminokyselin patří mj. toxiny muchomůrek, phalloidin a α -amanitin. Rychleji účinkují látky skupiny faloidinů, účinek amanitinů nastupuje spíše později. Amanitiny napadají především jádra jaterních buněk a způsobují jejich odumření.



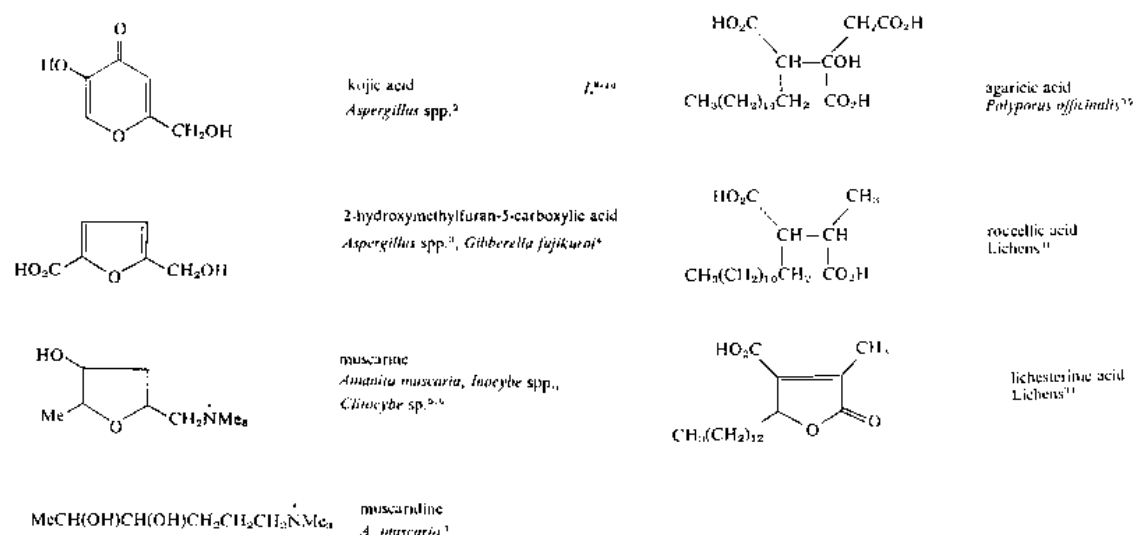
2.5. Deriváty ostatních primárních metabolitů

A. Deriváty glukózy

Mezi látky, jejichž prekursorem je D-glukóza, patří např. muscarin a muscaridin, známé z *Amanita muscaria* nebo antibiotika kojic acid nebo cortalceron. Cortalceron byl původně izolován z mycelia *Corticium caeruleum*, vystaveného vlivu stressových faktorů (resp. toxickým rozpouštědly), později byla jeho tvorba prokázána u *Phanerochaete chrysosporium* za zcela fyziologických podmínek.

B. Deriváty trikarboxylových kyselin

Tyto látky vznikají kondensací oxalacetátu s alfa-metylénovou skupinou alifatické kyseliny. Je-li touto kyselinou acetát, produkt je citrát a jde o jednu ze základních reakcí citrátového cyklu. U vyšších hub se např. vyskytuje agaricic acid (*Polyporus officinalis*), u lišejníků se běžně vyskytují např. protolichesterinic acid, roccellic acid atd.

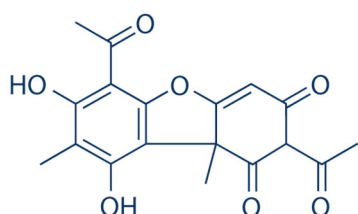


3. Současné názory na funkci sekundárních metabolitů

Sekundárním metabolitům byly dříve připisovány nejrůznější funkce. Některé z nich byly již opuštěny, např. teorie že jde o evoluční relikt, odpadní produkty normálního (primárního) metabolismu či koncentrované živiny, fragmenty větších molekul nebo produkty detoxikace). Nyní spíše převládají názory, že sekundární metabolity mají funkci regulační (v metabolismu i v diferenciaci) a patrně i ekologické (farmakologické vlastnosti včetně ovlivnění/inhibice růstu rostlin nebo mikroorganismů může mít význam při obsazování ekologické niky).

Teorie zmíněné v předešlém odstavci je možné dobře posoudit na příkladu sekundárních metabolitů lišejníků - tzv. lišejníkových kyselin. Tyto látky byly objeveny již počátkem století, ačkoliv jejich fyziologická úloha pro organismus není dosud zcela jasná. Postupně byla vyslovena řada hypotéz, mj. že jde o látky, jež svou hořkou chutí

mají odrazovat býložravce (savce i hlemýžďe) od konzumace stélky, dále že jde o látky podílející se na chelataci kovů a tím usnadňující přestup minerálií do buněk, že jde o antibiotika ochraňující lišejník v podmínkách dlouhodobé vlhkosti od invaze patogenních mikroorganismů atd. Jedna z hypotéz uvažovala, že jde o sloučeniny podílející se na absorpci UV záření, škodlivého pro řasovou složku lišejníků. Nejnovější teorie uvažují o regulační úloze lišejníkových kyselin při kontrole propojeného metabolismu hub a řas.



Obr. 31. Kyselina usnová

4. Vyšší houby v lidové či oficiální medicíně

Antibiotika popř. látky s cytostatickou aktivitou, které byly izolovány z nižších či vyšších hub, jsou téměř vždy produkty sekundárního metabolismu. Ačkoliv pro oficiální medicínu byly houby objeveny poměrně pozdě (viz Mattioliho herbář, 1544 italsky, 1548 latinsky, 1562 v Hájkově překladu česky), v lidové medicíně byly používány odedávna. Je známé např. používání ohňovce šarlatového (*Sarcoscypha coccinea*) Indiány z okolí Velkých jezer jako léku k zastavení krvácení nebo používání porie cocos (*Polyporus cocos*) ve starověké Číně. Pravděpodobně první houbou využívanou v lidové medicíně byla housenice čínská (*Cordyceps sinensis*), kterou před několika tisíci lety používali číňané ve směsi s kachním masem jako posilujícího prostředku. Konečně je nemožné se nezmínit o užívání výtažku z rezavce šikmého (*Inonotus obliquus*; lidově „čága“) proti rakovině v carském Rusku, což, po pravdě, přetrvává dodnes.

Jistěže jedny z prvních známých účinků hub byly halucinogenní, jak je patrné z nástěnných maleb na Čukotce z mladší doby kamenné či z pozdějších reliéfů v Indii (božská droga Sóma, patrně muchomůrka červená), případně z nálezů ze střední či jižní Ameriky (pro změnu druhu *Psilocybe* sp.). Do běžného užívání se houby dostaly nejen jako potrava, ale i jako léčiva (či zdroje jedů) po patrně trpkých prvotních zkušenostech. Přestože jde o nesmírně zajímavé téma, bohužel se mu v rámci tohoto kursu můžeme bohužel věnovat pouze velmi omezeně.

V našich zeměpisných šířkách se houby využívaly především jako potrava resp. jako koření. Některé druhy byly preferovány i jako prostředky léčivé, ačkoliv o jejich účincích lze mnohdy pochybovat – zhusta léčily orgány (/měly léčit), kterým se podobaly. Třebas ucho jidášovo či hadovka smrdutá.

Nicméně, něco mohlo být založeno na realitě, např. outkovka vonná (*Trametes suaveolens*) rostoucí na vrbě mohla obsahovat deriváty salicylové kyseliny, která se úspěšně používá (jako acylpirin) při léčbě nachlazení či dalších respiračních chorob.

Jak u Jidášova ucha píše J. van Beweryck (1672), „Houba tato jest dobrá i na opuchliny ušní“.

Dále je mj. známá věc, že mumie Ötziho měla u sebe kousek březovníku navlečeného na šňůrce (spíš asi talisman) a dále plátky troudnatce kopytovitého, který má údajně antistiprické účinky, tj. zastavuje krvácení. Stejně tak ale může být použit pro snadnější rozdělení ohně.

Použití vyšších hub v lidové medicíně (podle knihy M. Semerdžiev a J. Veselského, Léčivé houby dříve a nyní, Academia Praha 1986) je shrnuto níže.

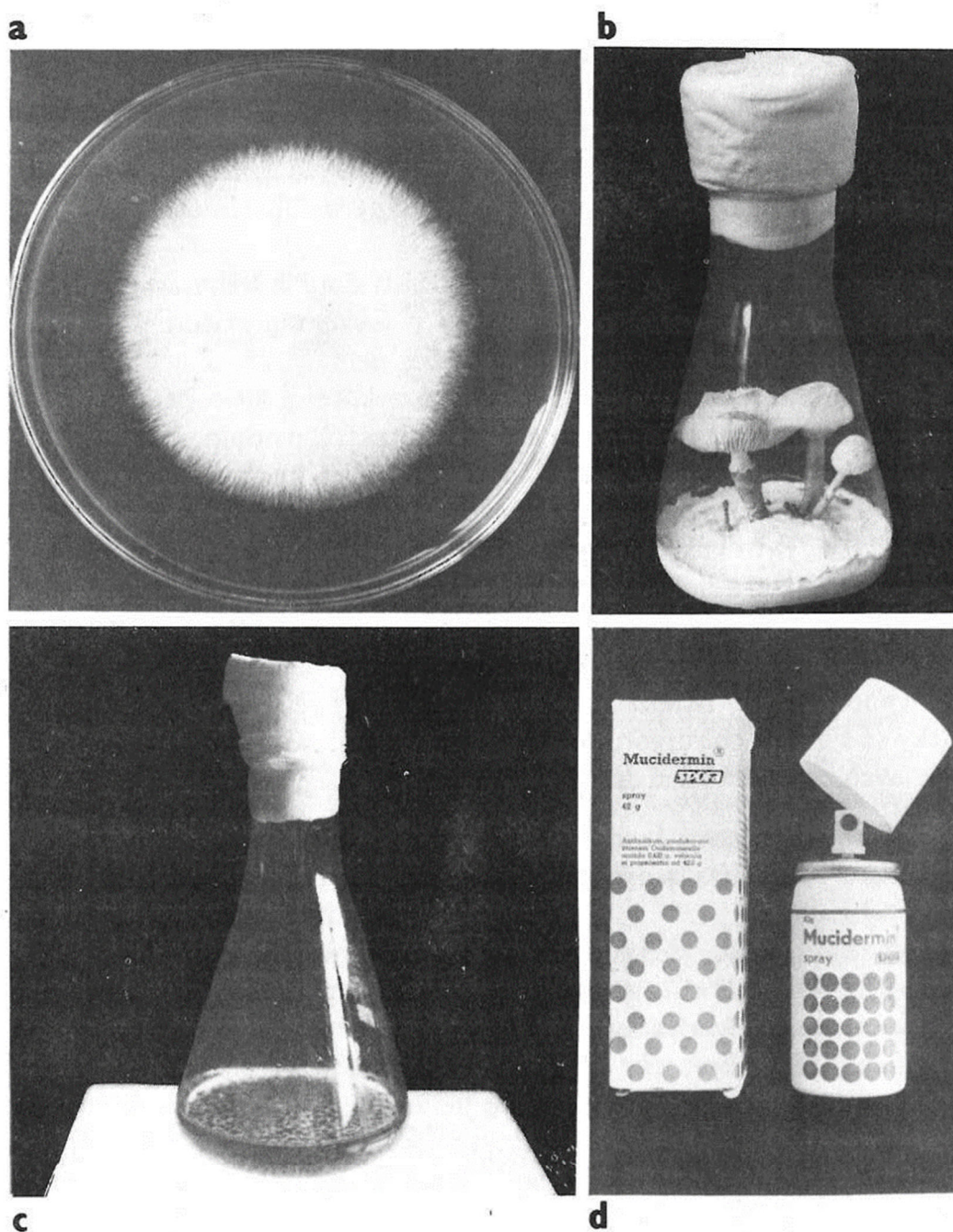
Houba	Latinský název	použití
verpáník obecný	<i>Agaricum officinale</i>	projímadlo, proti revmatismu
troudnatec kopytový	<i>Fomes fomentarius</i>	zastavuje krvácení
ucho Jidášovo	<i>Hirneola auricula-iudae</i>	proti očním neduhům
outkovka vonná	<i>Trametes sauveolens</i>	tuberkulosa
hadovka smrdutá	<i>Phallus impudicus</i>	afrodisiakum
rezavec šikmý	<i>Inonotus obliquus</i>	rakovina
březovnik obecný	<i>Piptoporus betulinus</i>	rakovina žaludku
čirůvka fialová	<i>Lepista nuda</i>	při cukrovce
ryzec peprný	<i>Lactarius piperatus</i>	močopudný přípravek
penízovka sametonohá	<i>Flamulina velutipes</i>	při cukrovce
houževnatec jedlý	<i>Lentinus edodes</i>	snižuje hladinu cholesterolu

Pro úplnost je třeba uvést, že extrakty z některých hub byly nebo jsou využívány i v homeopatii, např. z muchomůrky červené, muchomůrky zelené, hřibu satanu, verpáníku lékařského, outkovky vonné, vatovce obrovského, holubinky vrhavky, paličkovice nachové nebo sněti kukuřičné.

Sněť ostatně stála i mj. za tzv. Aténským morem (430-429 př. n. l.), kdy občané pobíhali s vytřeštěným očima, mávali rukama, nevěda, co se děje a někteří se údajně podle tehdejších historiků „zbavovali svého mužství“.

Co se týká muchomůrek, zachovaly se mj. dopisy napoleonského zajatce von Straleberga, který ze Sibiře domů zděšeně psal, jak odvar z muchomůrek napřed vypije šaman, po „vyčůrání“ toto pijí další muži, po opakování procesu ženy a nakonec dojde i na děti. Dobrou chuť.

Jedinou houbou, která u nás skutečně vešla do historie, je slizečka slizká (neboli porcelánová), *Oudemansiella mucida*, ve které objevil dr. Musílek (z MBÚ z Prahy) dosud jediné původní československé antibiotikum, které se dostalo až do klinické praxe. Mucidin (obchodní název Mucidermin Spofa) byl indikován ve formě masti nebo spreje při zevních dermatomykózách včetně afekcí vyvolaných kvasinkami jako je *Candida*, *Torulopsis* a *Trichosporon*. Produkce antibiotika v Roztokách u Prahy byla kdysi pro údajnou neefektivitu výroby zastavena. Předností tohoto léčiva byla dobrá stabilita a rozpustnost v tucích (důležitá při léčbě kožních onemocnění) a nízká senzibilizační schopnost.



Obr. 23. Slizečka slizká; a – podhoubí v misce, b – plodničky v baňce, c – submersní kuličkovité podhoubí v baňce z třepacího stroje, d – Mucidermin (foto A. Wolf).

Obr. 32 Z knihy M. Semerdžieva, J. Veselský, Léčivé houby dříve a nyní (Academia Praha, 1986). Dr. M. Semerdžieva se na prvotním výzkumu Mucidinu v Mikrobiologickém ústavu ČSAV také významně podílela.

Kapitola V. Metody studia sekundárních metabolitů

1. Rozdělení sekundárních metabolitů

V předchozí kapitole byly sekundární metabolity rozděleny podle způsobu jejich vzniku. Kromě toho bývají v různých monografiích děleny např. podle produkčního organismu, farmaceutického využití, nebo podle chemické struktury.

Právě chemická struktura látky hraje velmi důležitou roli při volbě strategie její izolace z přírodního materiálu. Velmi obecně řečeno, látky se z praktického hlediska dělí na aromatické, alifatické polární a alifatické nepolární. Aromáty se zpravidla rozpouštějí dobře v toluenu a mají výrazná absorpční maxima v UV spektrech (obvykle okolo 205, 254 a 280 nm). Alifatické polární se dobře rozpouštějí v alkoholech a jiných polárních rozpouštědlech, nerozpouštějí se obvykle v hexanu nebo benzenu. Alifatické nepolární látky se naproti tomu rozpouštějí dobře v hexanu, chloroformu nebo benzenu.

2. Metody izolace a zjišťování chemické struktury

Postup při izolaci sekundárních metabolitů závisí především na charakteru výchozího materiálu (plodnice, submersní mycelium, fermentační tekutina) a na chemických resp. biologických vlastnostech izolované látky. Výhodou je, je-li látka barevná nebo má-li měřitelné antibiotické účinky.

Obecný postup zahrnuje desintegraci mycelia, odstranění nežádoucích látek (tzv. předčištění) a finální purifikaci, po které následuje určení resp. ověření chemické struktury, prováděné zpravidla na specializovaném pracovišti. Při izolaci je třeba mít na paměti, že na jednu chemickou analýzu metodami instrumentální analýzy je potřeba alespoň 5 mg čisté látky. Bude-li potřeba zjistit molární složení látky (tj. indexy v sumárním vzorci $C_xH_yO_zN_wS_q...$), bude třeba asi 2 mg čisté látky při klasickém měření, méně než 1 mg při využití nejnovějších metod (kombinace separačních technik a hmotnostní spektrometrie). Kritériem čistoty je přitom obvykle to, že látka poskytuje jeden pík na chromatografickém záznamu nebo jednu skvrnu na velmi předávkovaném tenkovrstvém chromatogramu.

Prvním krokem před zahájením izolace je ovšem literární rešerše zaměřená na předchozí práce. Je dobré si přitom včas uvědomit, že názvy hub (obzvláště vyšších) mají často četná synonyma a rešerši tedy doporučujeme provést důkladně. Nalezneme-li v literatuře podrobný popis izolace žádané látky, ušetříme si často nejen zklamání, ale hlavně čas a drahá rozpouštědla.

2.1. Desintegrace mycelia

Provádí se obvykle mechanicky, tzn. v laboratorním mixéru nebo homogenizátoru. Nízkomolekulární látky na rozdíl od enzymů nejsou obvykle tolik citlivé na teplotu a proto je obvykle možné všechny práce provádět v laboratoři bez chlazení. Desintegrace se provádí po suspendování mycelia v minimálním množství vody. Jde-li o izolaci látky lipofilní, může se postupovat tak, že se mycelium extrahuje organickým rozpouštědlem

(nejčastěji ethanolem, chloroformem nebo toluenem). V obou případech je nutné se před další prací zbavit pevných látek, buďto filtrací, nebo centrifugováním.

2.2. Předčištění

Cílem předčištění je zbavit se většiny balastních látek. Obvykle se postupuje tak, že primární extrakt po desintegraci mycelia (nebo fermentační tekutina po odstranění mycelia, jde-li o metabolit vylučovaný do média) se odpaří na rotační vakuové odparce opatrně dosucha. Odparek je potom extrahován organickým rozpouštědlem, ve kterém se izolovaná látka dobře rozpouští. U vodných odparků zůstanou cukry, aminokyseliny, peptidy a proteiny, které se samozřejmě při desintegraci buněk uvolnily do roztoku, jako nerozpustný zbytek.

Prakticky se extrakce provádí tak, že do baňky s odparkem přidáme malé množství rozpouštědla (např. 100 ml do püllitrové baňky) a opatrně baňkou kroužíme. Roztok slijeme opatrně do zábrusové erlenmeyerovy baňky (ne do kádinky - rozpouštědla jsou vesměs toxická a velmi těkavá). Musíme-li práci přerušit, uchováváme extrakty v lednici. Každou nádobu označíme papírovým samolepícím štítkem, kde je obyčejnou tužkou napsáno, o jaký vzorek jde (organická rozpouštědla velmi účinně smývají lihové fixy). Extrahujeme zpravidla toluenem (při izolaci látek aromatických), acetonem, methanolem nebo etherem (spíše při izolaci látek polárních), a konečně chloroformem nebo hexanem (spíše při izolaci látek nepochárních). Tento druhý extrakt již zpravidla obsahuje menší počet rozpuštěných látek. Zjistíme-li, že obsahuje námi hledanou látku, přistoupíme k finální purifikaci. Není-li hledaná látka v extraktu obsažena, musíme postup opakovat a volit jiná organická rozpouštědla pro extrakci.

Místo odpaření dosucha a extrakce odparku jiným rozpouštědlem se občas používá i frakční srážení, tj. k extraktu získanému macerací výchozího materiálu se přidá stejný (někdy i několikanásobný) objem jiného rozpouštědla, které se s původním dobře mísí. Změnou chemických vlastností směsi (především změnou polarity) dochází k vysrážení látek.

2.3. Finální purifikace

Nejjednodušší a nejčastější metodou finální purifikace je krystalisace, kdy se látka rozpustí v minimálním množství pokud možno zahřátého rozpouštědla a ochlazením (i v mrazáku přes noc) vykrystalisuje. Krystalisaci je možno i několikrát opakovat. Dále se používá tenkovrstvá chromatografie na nejrůznějších nosičích (silikagel, alumina, celulóza). Postup při tenkovrstvé chromatografii je podrobně popsán dále. Místo tenkovrstvé chromatografie je samozřejmě možné použít i kolonovou chromatografii: látky se nanášejí na sloupec silikagelu (resp. jiného nosiče) a po vsáknutí jsou eluovány mobilní fází. Jímají se frakce o vhodném objemu, ve kterých se pátrá po přítomnosti látek.

Naprosto nutnou podmínkou finální purifikace je použití vysoce čistých rozpouštědel.

Přečištění na tenkých vrstvách (TLC). Extrakt získaný v předchozím kroku se zahustí na minimální objem (často při zahušťování dochází ke krystalisaci) na rotační vakuové odparce. Získaný koncentrát přeneseme do menší zábrusové baňky pipetou. Zásadně ho nepřelíváme; ztráty ulpěním na skle a zábrusech bývají v případě koncentrovaných vzorků již obrovské. Dojde-li k vykrytalování látky, přidáme rozpouštědlo a směs mírně zahřejeme. Přenášíme ji potom do menší baňky za tepla.

Tenkovrstvá chromatografie se dnes již téměř výhradně provádí na komerčních vrstvách silikagelu s UV indikátorem. Desky držíme opatrně za hrany a vrstvy silikagelu se nedotýkáme. Před prací si všimneme, že na zadní straně aluminiových desek bývají jemné rýhy od nanášecího stroje. Desku orientujeme tak, aby tyto rýhy byly vodorovně. Měkkou tužkou uděláme na desce asi jeden a půl cm od spodního okraje rovnou čáru, na které si vyznačíme malými značkami místa pro nanášení vzorků.

Prvním nezbytným krokem je nalezení optimální mobilní fáze. Na start nanесeme opatrně asi 5 mikrolitrů extraktu a počkáme až úplně zaschne (lze použít fénu). Desku potom vložíme do chromatografické vany obsahující mobilní fázi (v takovém objemu, aby výška hladiny nepřevýšila 1 cm), vanu rychle uzavřeme a počkáme, dokud mobilní fáze nevyvzlíná cca 1 až 2 cm pod horní okraj desky. Poté desku vyjmeme, vysušíme a pozorujeme pod UV lampou. Měkkou tužkou vyznačíme polohu skvrn. Při volbě mobilní fáze se řídíme literaturou popisující dělení látek s podobnou chemickou strukturou. Nemáme-li naději na potřebné informace, můžeme začít se soustavou chloroform-methanol 10:1 a postupně upravovat složení mobilní fáze: zůstávají-li látky na startu, zvýšíme obsah methanolu, jsou-li eluovány s čelem rozpouštědla, zvýšíme obsah chloroformu (třebas až na 100:1). Zůstávají-li látky na startu při použití samotného methanolu i chloroformu, je třeba mobilní fázi modifikovat nebo použít jiný typ tenké vrstvy (např. celulózu).

Jakmile zjistíme vyvíjecí soustavu, ve které se látky obsažené v extraktu dostatečně dělí, přistoupíme k preparativní chromatografii. Na vrstvu nanášíme opatrně 100 až 200 mikrolitrů (automatickou pipetou) v jednom dlouhém tenkém pásu (asi 0.5 cm vlevo i vpravo ale ponecháme volných). Po vyvinutí a vysušení si označíme tužkou pásy jednotlivých látek a aniž bychom se jich dotýkali prsty, rozstříháme je na cca 3 cm dlouhé pásy. Ty potom sbíráme do zábrusových nádob obsahujících vhodné rozpouštědlo.

Zpravidla se nejprve sbírají pruhy látek poskytujících pod UV lampou nejintenzivnější signál. Takto vyextrahované látky přefiltrujeme přes fritu, abychom se zbavili stříháním uvolněného silikagelu a po zahuštění kontrolujeme čistotu. Zřídka kdy látka po jednom přečištění na silikagelu poskytuje jednu skvrnu; preparativní chromatografii můžeme ale i několikrát opakovat. Má-li látka tendenci ke krystalizování, pak ji před odevzdáním k analýze alespoň jednou překrystalizujeme.

3. Zjišťování chemické struktury

U každé nové látky se zjišťují základní charakteristiky, tj. bod tání, UV/VIS spektra, rozpustnost, případně i optická aktivita. Chemická struktura se zpravidla odvozuje z výsledků měření hmotnostních a infračervených spekter a z výsledků nukleární magnetické rezonance (spekter ^1H a ^{13}C NMR). Protože jde o výklad nad rámec tohoto

kurzu, stručně zmíníme pouze techniky IR a MS; zájemce nalezne jistě mnoho chemických učebnic či webových stránek, věnovaných moderním metodám identifikace organických látek sám.

Infračervená spektroskopie (IR) poskytuje informace o funkčních skupinách, přítomných v molekule zkoumané látky. Princip metody je zhruba ten, že vzorkem látky ve speciální kyvetě prochází infračervené světlo, které molekule dodává energii. Tato energie ovšem není vysoká; molekula se po absorbování části světla rozkmitá. Kmitá všemi směry, které přicházejí v úvahu. Např. v molekule vody se budou přibližovat a vzdalovat protony ke kyslíku (buď oba současně, nebo střídavě) a kromě toho se mohou oba protony přibližovat k sobě nebo vzdalovat (jako rozevírání nůžek). Ke každé vibraci je třeba určité energie, resp. záření o určité vlnové délce. Záření, před průchodem látkou homogenní, je po průchodu vzorkem chudší o vlnové délky, které rozkmitaly molekuly. Získané spektrum se proto nazývá absorpční. Z historických důvodů se spektra registrují jako závislost transmittance na vlnočtu (uváděném v cm^{-1}). Vyhodnocování spekter náleží odborníkům, přesto uveďme pro ilustraci několik typických příkladů vlnočtů funkčních skupin: C=O (karbonyl, 1700 cm^{-1}), -OH (hydroxyskupina, 3600 cm^{-1}), C-H (proton na alifatickém uhlíku, 3000 cm^{-1}), C-H (proton na aromatickém uhlíku, 3000 cm^{-1}), -Cl (chlor, 780 cm^{-1}).

Hmotnostní spektrometrie (MS) je na rozdíl od IR spektrometrie metodou destrukční, to znamená, že vzorek je při měření zpotřebován a nelze jej dále použít. Hmotnostní spektrometrie je destrukční metodou v pravém slova smyslu: látka je po ionisaci ve vakuu bombardována různými částicemi o vysoké energii (elektrony, amoniak atd.). Při tom dochází k rozpadu molekuly na několik fragmentů (rozpad ale může být iniciován i jinými metodami). Směs produktů takových srážek (která ale obsahuje i určité - i když často mizivé - procento "nezreagované" výchozí látky) je dělena v elektrickém a magnetickém poli na částice lišící se vzájemně molekulovou hmotností. Výstupem z přístroje je tzv. hmotnostní spektrum, tj. na ose x je molekulová hmotnost (cca od 20 do 200 jednotek m/z), na ose y potom intenzita dopadů příslušných fragmentů molekul na detektor. Spektrum je tedy čárové a nejčastější fragment molekuly poskytuje nejvyšší signál. Fragmentace látek se sice řídí určitými pravidly, ale podrobnější výklad získávání a vyhodnocování hmotnostních spekter přesahuje rámec tohoto kursu.

Jde-li o izolaci látky již známé, tedy ověřujeme-li její produkci houbovým kmenem, postačí zpravidla použití jedné z uvedených instrumentálních technik a srovnání získaného záznamu s již publikovanými spektry. Často také postačí chromatografické srovnání se standardem (je-li k dispozici) metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie nebo plynové chromatografie.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je technika založená na stejném principu, jako tenkovrstvá chromatografie. Rozdíl je hlavně v uspořádání systému: stacionární fáze (v mnohem jemnějším zrnění) je uložena v koloně, mobilní fáze kolonou prochází pod velkým tlakem. Přístroje umožňují jednak měnit teplotu (obvykle se pracuje při $30\text{--}40\text{ }^{\circ}\text{C}$), jednak složení mobilní fáze (postupnému zvyšování obsahu jedné složky se říká gradientová eluce). Na trhu je rovněž větší výběr stacionárních fází, ačkoliv nejčastěji se používá silikagel nebo silikagel impregnovaný organickou vrstvou - vyššími alifatickými uhlovodíky. Výsledný produkt je na rozdíl od silikagelu nepolární. Nejběžnější je silikagel se zakotveným oktadecylovým zbytkem (označuje se jako "reverzní fáze", RP nebo C-18). Látky jsou z kolony eluovány v různých časech podle jejich afinity ke stacionární fázi. Kromě registrace těchto časů (retenčních časů, t_r) poskytují lepší

přístroje i další informace o látkách - např. přístroj vybavený diode-array detektorem ukládá i kompletní UV/VIS spektrum každé látky.

Podmínky separací se pro různé látky liší a je třeba je vyzkoušet. Používá-li se kolona plněná reverzní fází (C-18), volí se zpravidla jako mobilní fáze nejprve směs acetonitril:voda nebo methanol:voda a teprve po neúspěchu se složení výrazněji mění.

Látky se detekují nejčastěji měřením absorpance při určité vlnové délce v průtokovém detektoru umístěném za kolonou. Možná je i detekce elektrochemická nebo snímání fluorescenčních spekter. Nejnovější přístroje jsou vybaveny i hmotnostními detektory. Chromatografický záznam (tj. odezva detektoru vs. čas) poskytuje informace o čistotě látky (počet píků) a o jejím množství (plocha píku je přímo úměrná koncentraci) ve vzorku. Máme-li ověřit identitu látky, postupujeme tak, že za stejných podmínek změříme retenční čas neznámé látky a standardu. Poté dávujeme na kolonu směs obou. Je-li naše látka identická se standardem, dává směs vždy jeden pík, ať měníme složení mobilní fáze jak chceme.

4. Zjišťování antibiotické aktivity

Protože řada sekundárních metabolitů má větší či menší antibiotickou aktivitu, patří její testování mezi poměrně běžné práce.

Kvalitativní zjištění přítomnosti antibiotické aktivity se provádí na agaru na petriho misce zaočkované vhodným citlivým mikroorganismem (zpravidla se používá *Bacillus subtilis* nebo *Escherichia coli* v případě antimikrobiálních látek a *Candida utilis* nebo *Candida pseudotropicalis* u látek s antifungální aktivitou). Veprostřed misky se korkovrtem vydlobne kulatý otvor, do kterého se pipetuje koncentrovaný roztok (frakce po chromatografické separaci) testované látky. Po 24 hodinách inkubace je v přítomnosti antibiotika patrná inhibiční zóna kruhového tvaru se středem přibližně ve středu otvoru. Je užitečné si vyzkoušet, jak velkou zónu vytvoří čistý ethanol nebo dimethylsulfoxid (v případě testování ve vodě nerozpustných látek).

Velikost zóny je úměrná citlivosti mikroorganismu k testované látce a její koncentraci. Citlivost mikroorganismu k danému antibiotiku je možné vyjádřit i kvantitativně pomocí tzv. minimální inhibiční koncentrace (MIC). Tato hodnota zároveň umožňuje vzájemné porovnávání účinnosti antibiotik.

Určení hodnoty MIC agarovou difusní metodou. Připravíme si řadu deseti roztoků testované látky (nejvyšší koncentrace 2 mg/mL, dále ředíme vždy na polovinu tj. 1 mg/mL, 0.5, 0.25 atd.). Do ztuhlé agarové vrstvy zaočkované testovacím mikroorganismem vyrobíme korkovrtem v dostatečné vzdálenosti deset otvorů a do každého z nich pipetujeme stejné množství látky (např. 100 μ L). Druhý den odečteme hodnoty průměrů inhibičních zón a vyneseme je v semilogaritmickém měřítku proti koncentraci. Hodnotu MIC odečteme tam, kde přímka protíná osu x.

Příklady postupů:

A. Isolace antibiotika pleuromutilinu z basidiomycetu *Pleurotus mutilis*:

Sušené mycelium bylo extrahováno 60% MeOH. Extrakt byl částečně zahuštěn a získaná suspence byla extrahována petroletherem. Petroletherová frakce, obsahující lipofilní balast byla odstraněna a vodná suspence byla dále extrahována butylacetátem. Butylacetátová frakce byla poté odpařena dosucha. Odparek byl rozpuštěn v malém množství etheru a z něho byl pleuromutilin vykrystalisován.

B. Isolace kys. usnové z *Cladonia* sp.

Sušená stélka byla nadrcena a macerována 6h v acetonu. Acetonový extrakt byl odpařen do sucha a odparek byl extrahován horkým chloroformem. Po přidavku trojnásobného množství ethanolu došlo k tvorbě sraženiny. Ta byla odfiltrována a látka byla dvakrát rekrystalována z acetonu.



Obr. 33. Příklady čirých zón při difusním testu. Někdy se používají papírové terčíky, napuštěné určitou koncentrací látek, jindy se pipetuje stejné množství roztoku o různých koncentracích přímo do otvorů vyrobených korkovrtem. Z webu.

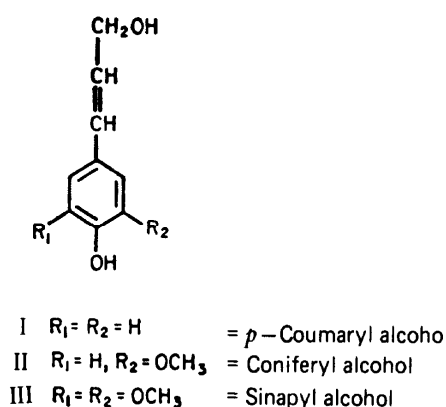
Kapitola VI. Ligninolytický systém hub bílé hniloby

1. Struktura a vlastnosti ligninu

Asimilace atmosférického CO₂ na lignin představuje asi 40 % rostlinami využívané sluneční energie a lignin je po celulóze druhý nejhojnější organická sloučenina biosféry. Tvoří součást buněčných stěn vyšších rostlin, kde zvyšuje mechanickou a chemickou odolnost. Aromatická molekula ligninu je díky své struktuře neobyčejně resistantní vůči enzymatické degradaci, následkem čehož její biologické odbourávání probíhá velmi pomalu. Je proto pravděpodobné, že dekompozice ligninu je limitujícím krokem v biosférickém koloběhu uhlíku.

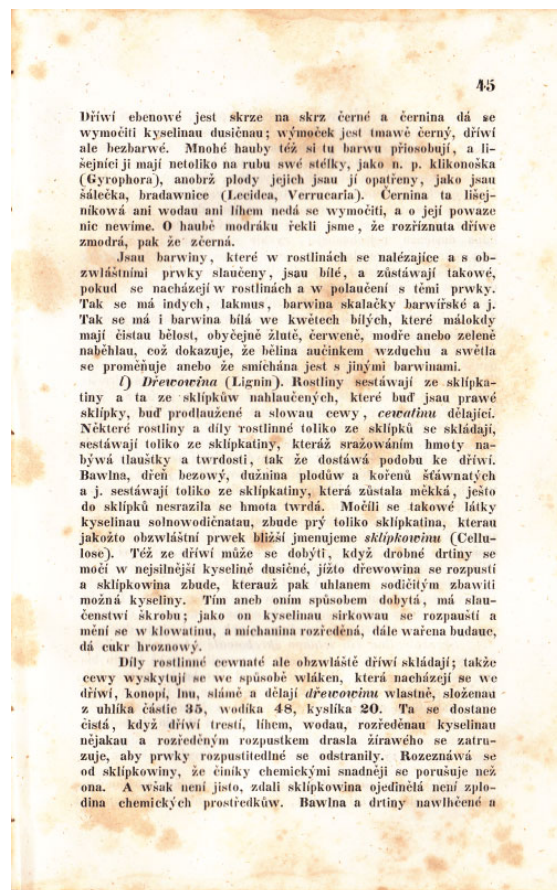
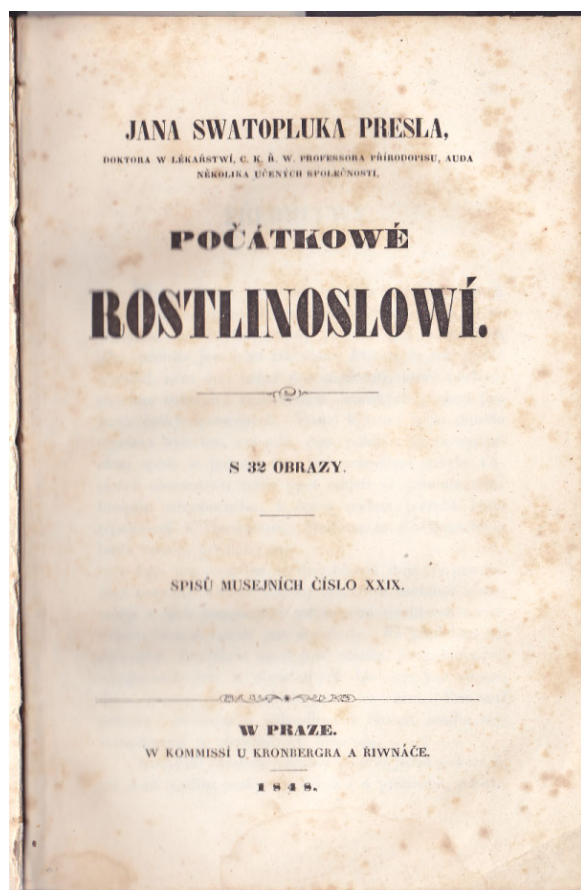
Kromě ligninu jsou z hlediska hub, způsobujících hnilobu dřeva, důležité dvě další látky: celulóza, lineární polymer glukózy, ve kterém se téměř výhradně vyskytují beta-1,4 vazby a hemicelulózy, což jsou polymerní sloučeniny cukrů, které jsou větvené a zpravidla obsahují (kromě občasných molekul glukózy) jiné cukry, jako je galaktóza, xylóza, mannóza, arabinóza a glukuronová kyselina. Volné cukerné hydroxylové skupiny bývají běžně acetylovány.

Lignin byl poprvé popsán Anselmem Payenem v r. 1838. Peter Klason zjistil, že obsahuje koniferylalkohol (1887) a v r. 1907 vyslovil domněnku, že lignin má polymerní strukturu ve které se vyskytují etherové vazby. Později se ukázalo, že lignin je skupina strukturně příbuzných vysokomolekulárních látek tvořených větvenými polymery na bázi *p*-kumarylalkoholu, koniferylalkoholu a sinapylalkoholu.



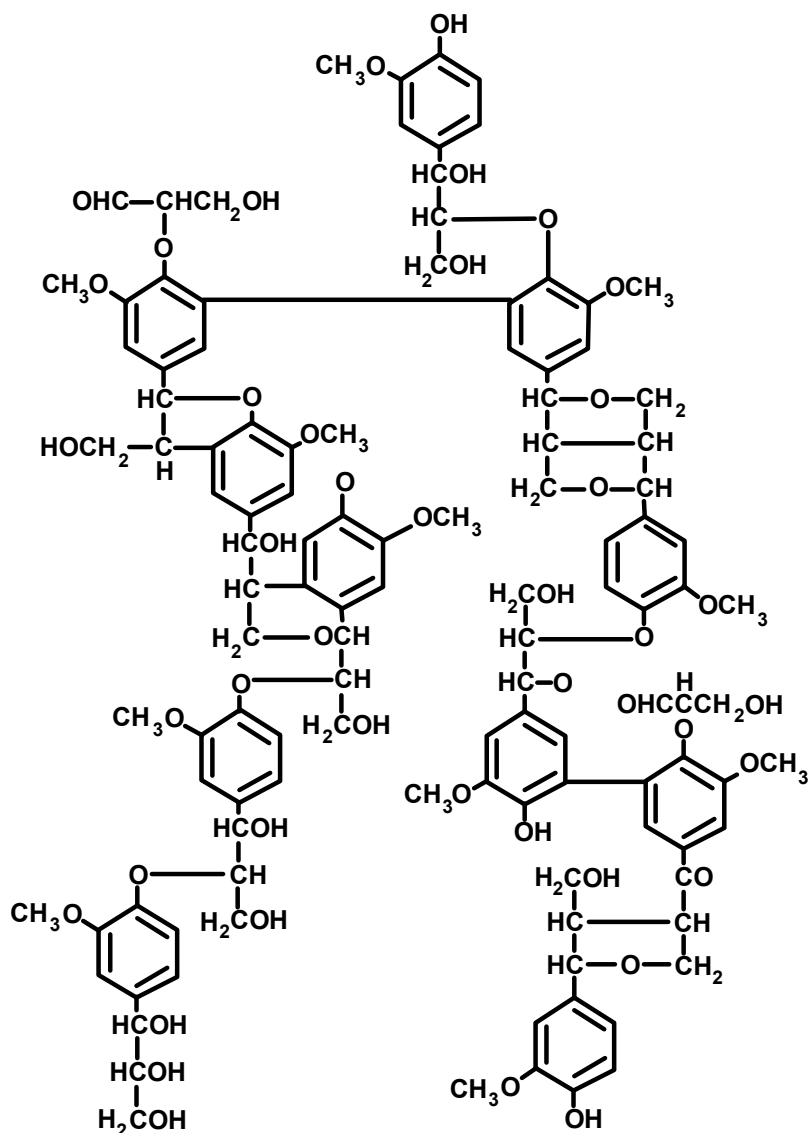
Kvantitativní poměry těchto tří složek se mohou výrazně lišit podle stáří a druhu rostlin. Lignin izolovaný z nahosemenných obsahuje převážně koniferylalkohol a malé množství kumarylalkoholu a sinapylalkoholu, lignin krytosemenných obsahuje koniferylalkohol a sinapylalkohol přibližně ve stejném množství a obsahuje pouze stopy *p*-kumarylalkoholu. Lignin jedno-
děložných, především trav, obsahuje všechny tři složky s vysokým obsahem *p*-kumarylalkoholu. Je zde patrně zřetelná souvislost s aktivitou tyrosin-
amoniaklyázy, která je právě v travách rozšířená a katalyzuje deaminaci tyrosinu na kyselinu *p*-kumarovou.

Pro informaci uvedme dvě další definice ligninu: Lignin je dřevovina, která zbývá po odstranění celulózy, dodává dřevu pevnost. (Příruční slovník vědy a techniky, 1979). Lignin je část rostlinného materiálu, která není hydrolyzovatelná působením 72% kyseliny sírové nebo 36% kyseliny chlorovodíkové po odstranění vosků, klovatin a taninu (slovník na serveru NASA přístupný na internetu). Představa J. S. Presla je uvedena níže.



Obr. 34. Z knihy Počátkové rostlinosloví (1848). Kniha je k vidění u mne doma.

Biosyntéza ligninu vychází z šikimátu. Kyseliny jsou na alkoholy redukovány na CoA-esterech. Vzniklé alkoholy jsou enzymaticky dehydrogenovány na volné radikály, které mají četné rezonanční struktury a mohou spontánně reagovat za vzniku síťovaného polymeru. Jako oxidační enzymy zde fungují fenoloxidázy a peroxidázy. Celý proces lze nazvat „oxidační polymerací“. Na místo určení se alkoholy dostávají ve formě glukosidů (proton hydroxyskupiny na jádře je zaměněn zbytkem glukózy), glukóza je odštěpena beta-glukozidázami. Ramanova spektra domén buněčných stěn naznačují, že tato makromolekula je orientována tak, že roviny aromatických jader jsou rovnoběžné s rovinou buněčné stěny.



Zde vizme část molekuly ligninu z jehličnanového dřeva.

V nativním pletivu je lignin vázán s polysacharidy a někdy i s proteiny. Aminokyselinová analýza naznačuje, že polymerizující lignin se kovalentně váže s glykoproteiny buněčné stěny a že tyto vazby jsou tvořeny převážně s hydroxyprolinem.

Lignin je tmavohnědý prášek, špatně rozpustný ve vodě, lépe v louhu. Má absorpční maximum v UV oblasti při 280 nm, které se připisuje aromatickým OH-skupinám. Maxima je možné využít ke spektrofotometrickému stanovení ligninu nebo ligninmodelových látek v roztocích.

Příprava ligninu z přírodního materiálu je velmi obtížná a téměř vždy při ní dochází ke změně původní chemické struktury. Rozeznávají se proto různé „ligniny“, podle toho, jakým způsobem byly ze dřeva izolovány. Např. „Klasonův lignin“ se připravuje jako zbytek po luhování studenou koncentrovanou kyselinou sírovou, „Willsaterův lignin“ se připravuje stejně avšak s použitím kyseliny chlorovodíkové, „Celulolytický lignin“ vzniká

tak, že se dřevo inokuluje houbami tzv. hnědé hniloby, které zužitkují polysacharidy a zbývá téměř nativní lignin (proces je ale velmi pomalý).

2. Biodegradace ligninu dřevokaznými houbami

Ve volné přírodě se na biodegradaci dřevní hmoty obecně podílejí bakterie, aktinomycety a především velká skupina dřevokazných hub. To jsou houby, které ke svému růstu a fruktifikaci vyžadují dřevní hmotu. Podle schopnosti využívat hlavní složky dřeva (lignin a celulózu) se rozlišují do tří hlavních skupin:

Houby bílé hniloby, které jsou schopné využívat lignin současně s celulózou a hemicelulózami, houby hnědé hniloby a houby tzv. měkké hniloby, které utilísují celulózu a hemicelulózu, ale lignin nedegradují, nanejvýš modifikují. Mezi houby bílé hniloby (white-rot fungi) patří např. václavky, hlívy (*Pleurotus ostreatus*, *Pl. sajor-caju*), outkovky (*Trametes versicolor*, *Trametes hirsuta*, *Pycnoporus cinnabarinus*), *Lentinus edodes*, *Stereum hirsutum* a jedna z nejčastěji studovaných hub v laboratoři, *Phanerochaete chrysosporium*.

Mezi houby hnědé hniloby (brown-rot fungi) patří např. *Piptoporus betulinus*, *Gloeophyllum traubeum*, *Laetiporus sulphureus*, *Osmoporus odoratus* atd. Tyto houby odbourávají dřevní polysacharidy takže dřevo získává tmavé zbarvení. Při vysychání napadené dřevo praská, láme se na hnědé kubické bloky a drolí se. Dřevo, napadené březovníkem obecným bylo údajně po rozemnutí na jemný prášek dříve používáno ve Švýcarsku k cídění a leštění hodinářských součástek. Taxonomicky náleží houby bílé i hnědé hniloby vesměs mezi basidiomycety.

Houby měkké hniloby (soft-rot fungi) napadají vlhké dřevo, přičemž dochází k jeho charakteristickému měknutí. Taxonomicky se jedná převážně o askomycety a deuteromycety, např. askomycet *Chaetomium globosum*, *Chaetomium piluliferum* nebo deuteromycet *Stachybotris chartarum*.

Pro rozlišení mezi houbami bílé a hnědé hniloby se používal v dávných dobách tzv. Bavendamův test (1928), kdy testovaná houba rostla na agaru s přídávkem kys. gallové (taninu). Dochází-li v průběhu růstu k vzniku tmavohnědého kola okolo kultury, jde o houbu bílé hniloby. Je však třeba poznamenat, že tento test není zcela spolehlivý; dnes je možné dát přednost zjištění genů pro lakázu či Mn-peroxidázu.

Pro úplnost uvádíme, že na rozkladu dřeva včetně ligninu participují též bakterie (např. *Xanthomonas* sp., *Bacillus megatherium*) a některé enzymy byly nalezeny i u *Aspergillus fumigatus* a *Fusarium solani*. Kromě toho tyto enzymy byly nalezeny i u některých streptomycetů. Ve srovnání s houbami bílé hniloby jsou však aktivity těchto skupin nevýznamné.

3. Enzymový komplex hub bílé hniloby.

Hlavní reakce, které se uplatňují při biodegradaci ligninu jsou depolymerace ligninu na monoaromatické sloučeniny a dále otevření aromatického kruhu těchto látek za vzniku nízkouhlíkatých sloučenin, které jsou pak využity jako zdroj uhlíku

a energie. Za depolymeraci jsou odpovědné peroxidázy (Ligninová a Mn-dependentní), oxidace fenolů na fenoxylradikály je opět kromě peroxidáz dílem lakázy. K depolymeraci je nutný peroxid vodíku, jenž vzniká působením arylalkohol oxidázy (z aromat. alkoholu současně vzniká aldehyd), glyoxal oxidáza a pyranosa 2-oxidáza.

3.1. Ligninová peroxidáza a Mn-dependentní peroxidáza.

LiP je enzym depolymerizující lignin na kationradikály, které spontánně přecházejí na nízkomolekulární aromatické i nearomatické látky. Jde o enzym obsahující železo vázané na hemovou skupinu a molekula enzymu obsahuje vysoké procento cukrů (jde o glykoprotein). Tento enzym produkuje velká většina hub bílé hniloby. Jeho pH optimum je okolo pH 3, což je neobvykle nízká hodnota. Ke své činnosti navíc vyžaduje i veratrylalkohol, který je zároveň jejím substrátem: pravděpodobně veratrylalkohol přispívá ke stabilizaci enzymu. Hlavní reakce jsou depolymerace lignin a oxidace veratrylalkoholu na veratrylaldehyd (70-90%) a dále na nearomatické laktony (cca 20%). Ke všem uvedeným reakcím je však potřeba peroxid vodíku (proto "peroxidázy").

Kromě LiP byla popsána i tzv. Mn-dependentní peroxidáza, která je podobně jako LiP glykosylovaný hemoprotein. Ke své činnosti vyžaduje dvojmocný mangan, který je v průběhu reakce oxidován na trojmocný, jenž může ve formě komplexu s chelátorem (organická kyselina) volně difundovat do dřevní tkáně a přímo oxidovat lignin. Je známo, že basidiomycety produkují např. oxalát, malát, malonát a pyruvát. MnP bez přítomnosti manganových iontů a samozřejmě peroxidu vodíku není aktivní.

Nízkomolekulární reaktivní látky, jako je trojmocný mangan, popř. peroxidový radikál nebo trojmocné železo, se zcela jistě podílejí na prvotním ataku ligninové struktury. Je totiž velmi obtížné si představit, jak poměrně velká makromolekula jakéhokoliv enzymu napadá planární (a ještě větší) makromolekulu ligninu a snaží se dostat její část do svého aktivního místa. Často se setkáváme s názorem, že MnP se podílí na iniciaci degradace ligninu a tvorbě štěpů a LiP v až další fázi degraduje především tyto oligomery.

Ostatní peroxidázy. Je zřejmé, že houby produkují i jiné peroxidázy. Řada z nich neoxiduje veratrylalkohol (standardní "assay"), např. peroxidáza z *Pycnoporus cinnabarinus* nebo z houby *Bjerkandera adusta*. Vesměs to jsou peroxidázy unikátní a nebyly dosud dostatečně charakterisovány.

3.2. Lakáza

Lakáza je na rozdíl od obou peroxidáz nehemový enzym, který obsahuje několik molekul mědi. Katalyzuje oxidaci fenolů na fenoxylradikály, a proton přenáší na molekulární kyslík (vzniká voda). Nevyžaduje tudíž peroxid vodíku. Vzniklé fenoxylradikály jsou nestabilní a podobně jak bylo zmíněno u LiP mohou spontánně přecházet na nearomatické laktony.

Obecně se má za to, že geny pro enzymy hub bílé hniloby jsou přítomny vesměs u všech dřevokazných hub (tj. i hnědé hniloby), ale nejsou aktivovány.

3.3 Enzymy produkující peroxid vodíku

Peroxidázy vyžadují ke své činnosti peroxid vodíku, což je ovšem ve vyšších koncentracích buněčný jed a jeho nadbytky jsou zpravidla likvidovány katalázou. Peroxid vodíku proto vzniká účinkem extracelulárních enzymů přímo v okolí hyfy. Je dosud popsáno několik enzymů, produkujících tuto látku, z nichž nejběžnější jsou arylalkohol oxidázy, pyranosa 2-oxidázy a glyoxaloxidáza.

Arylalkohol oxidázy oxidují aromatické alkoholy za spotřeby molekulárního kyslíku na odpovídající aldehydy a peroxid vodíku. Jako substráty byly mj. popsány anisyl alkohol, benzylalkohol, veratrylalkohol a chlorované deriváty anisylalkoholu.

Pyranosa 2-oxidáza katalysuje oxidaci monosacharidů na osony, tj. dikarboxylové cukry, při které je spotřebováván atmosférický kyslík a vzniká peroxid vodíku. Glyoxaloxidáza oxiduje glyoxal na kyselinu glyoxalovou. Vyžaduje molekulu vody, na kterou je přenesen jeden atom kyslíku.

3.4. Štěpení aromatického jádra intracelulárními enzymy

Přestože aromatické jádro může být štěpeno již účinkem LiP nebo Lac, z velké části k tomuto metabolickému kroku dochází uvnitř mycelia. Houby jsou schopné štěpit aromatické jádro pouze mezi dvěma sousedními hydroxyskupinami (tzv. intra-diol ortho-štěpení). Naproti tomu bakterie jsou schopny štěpit jádro i mimo vicinální OH- skupiny. Příkladem enzymů je poměrně běžná intracelulární 1,2,4-trihydroxybenzen-1,2-dioxygenáza.

Dalším popsaným enzymem je cellobiosa-chinon oxidáza, která katalyzuje redukci chinonů za současné oxidace cellobiózy. Má se za to, že zabraňuje repolymeraci ligninových štěpů v průběhu degradace.

Ostatní známé enzymy se podílejí na modifikacích a odštěpování hemicelulos: např. endo-1,4- β -xylanáza, která produkuje oligosacharidy z náhodného štěpení xylanu nebo xylan 1,4- β -xylosidáza, která odštěpuje monomery xylózy. Dále je to např. acetyl xylan esteráza, která deacetyluje xylózové zbytky nebo esteráza kys. ferulové, která odštěpuje zbytky kys. ferulové. Samozřejmě řada analogických úzce specifických enzymů existuje i pro ostatní složky hemicelulos.

4. Měření biodegradace ligninu v experimentech.

V podstatě je možné použít několik způsobů podle použitého substrátu.

Dřevo: Váhový úbytek. Dřevěný špalíček je zvážen před inokulací a po několika týdnech či měsících (více např. v EN 113-1:2020) inkubace s dřevokaznou houbou (a po očištění a vysušení do konstantní hmotnosti). Rozdíl hmotností však neřekne, co jde na vrub ligninu a co jde na vrub celulosy resp. hemi- a lignocelulos.

Dřevo: Procento extrahovatelného ligninu. Dřevo se před i po experimentu extrahuje příslušným způsobem (např. ethanolom nebo DMSO), lignin se vysráží etherem a měří se rozdíl. Nevýhoda je, že do organického rozpouštědla přechází cca 0,2 - 1% ligninu. Je možné ovšem použít silné minerální kyseliny, to sice vede k vyšším výtěžkům, ale je to experimentálně náročné.

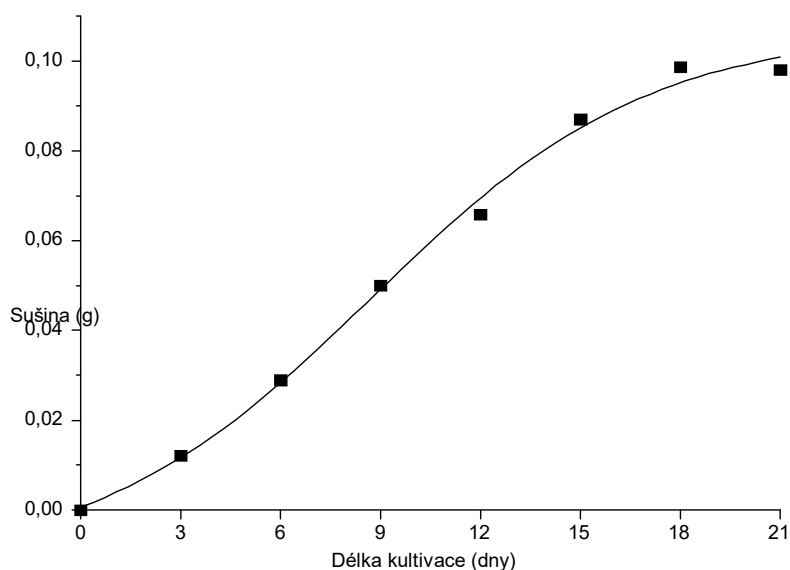
Lignomodelové látky: Induliny - spektrofotometrické měření úbytku absorbance při 280 nm. Je tak možné odhadnout stupeň štepení aromatických jader.

Lignomodelové látky: Radioaktivně značené substráty. Metoda je velmi přesná, neboť se měří uvolněný $^{14}\text{CO}_2$, pohlcovaný za baňkou do absorpčního roztoku. Zjistí se velmi přesně kolik procent substrátu houba mineralizovala. Je to ale poměrně náročné na vybavení, ačkoliv se zpravidla pracuje s minimálními aktivitami.

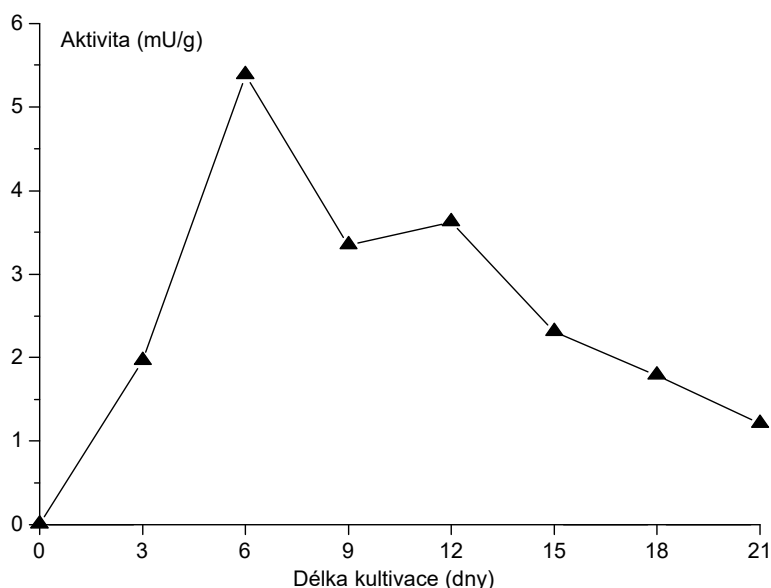
5. Ligninolytický systém basidiomycetů jako projev sekundárního metabolismu

Některé enzymy náležící do ligninolytického systému je možné detekovat v kultivačních tekutinách při (zpravidla stacionárních) kultivacích dřevokazných hub. Dřevokazné houby je totiž možno celkem bez obtíží kultivovat nejen na pevných substrátech (sláma, dřevěné špalíčky), na agarových půdách, ale i na tekutých půdách. Jak jsme uvedli dříve, houby kultivované na tekutých půdách za třepání vytvářejí kuličky (pelety) o průměru od 2 mm do 2 cm. Nejsou-li kultury třepány, tedy při stacionární kultivaci tvoří houby plísňovitý povlak na povrchu.

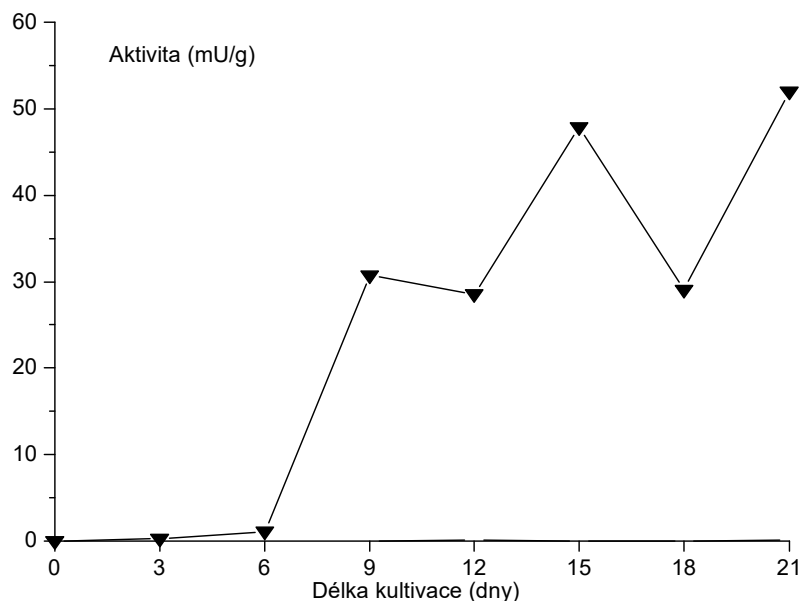
Pro detekci enzymů je nutné mít možnost pravidelných odběrů kultivační tekutiny (jde o extracelulární enzymy) a proto se pro sledování ligninolytických enzymů používají stacionární kultivace na tekutých půdách. Je zajímavé, že většina enzymů není tvořena v třepaných kulturách. Zde můžeme měřit obvykle pouze aktivity enzymů produkujících peroxid vodíku (např. pyranosa 2-oxidázy). Taková kultivace trvá zpravidla 6-13 dní. V případě netřepaných kultur je doba kultivace delší, asi dva až tři týdny. Ligninolytické enzymy jsou produkovány zpravidla ve stacionární fázi růstu, ačkoliv některé aktivity je možné zachytit i v časnějších fázích. Je jasné, že pro dostatečný počet experimentálně zjištěných hodnot je nutno mít velké množství paralel.



Obr. 35: Příklad průběhu stacionární kultivace *Stereum hirsutum* na tekuté Kirkově půdě.



Obr. 36: Příklad průběhu aktivity lakázy (podmínky viz předchozí obrázky).



Obr. 37: Příklad průběhu aktivity Mn-dependentní peroxidázy (podmínky viz předchozí obrázky).

6. Využití ligninolytických enzymů k degradaci jiných aromatických látek

Ligninolytického enzymového systému hub bílé hniloby je možné prakticky využít i k degradaci toxických organických látek, obsahujících aromatická jádra. Nejčastěji studovanými látkami z tohoto hlediska jsou polyaromatické uhlovodíky (PAH), polychlorované bifenylly (PCB) a některé další látky, např. aromatické herbicidy, trinitrotoluene či v poslední době léčiva, zejména pak ze skupiny tzv. endokrinních

disruptorů. V současnosti několik výzkumných týmů studuje možnost praktické aplikace hub bílé hniloby při dekontaminaci znečištěných půd nebo vod. Prakticky se v laboratorním měřítku experimenty provádí tak, že zaočkovaná sláma se po několika týdnech (až je houbou dobře prorostlá) převrství vzorkem hlíny obsahující toxický organopolutant. V časových intervalech se odebírají vzorky a zjišťuje se jeho úbytek.

Použití hub bílé hniloby, popř. jejich směsných kultur s kvasinkami a bakteriemi při odstraňování starých ekologických zátěží je podle dosavadních výsledků velmi nadějně a dávno již přesáhlo rámec výzkumných laboratoří: nejen v ČR v této oblasti podniká v poslední době řada firem.

VII. Rozklad dřevní hmoty houbami hnědé hniloby

Po pravdě řečeno, tato kapitola v původní verzi skript nebyla zařazena. Protože jde ale o skupinu hub, které páchají značné ekonomické škody v lese či v bydlišti, nebude od věci se o nich alespoň ve stručnosti zmínit. Rozdíl mezi rozkladem dřeva houbami bílé a hnědé hniloby je naprosto jasný z následujících obrázků:



Obr. 38. Rozklad dřeva houbami bílé (vlevo) a hnědé (vpravo) hniloby.

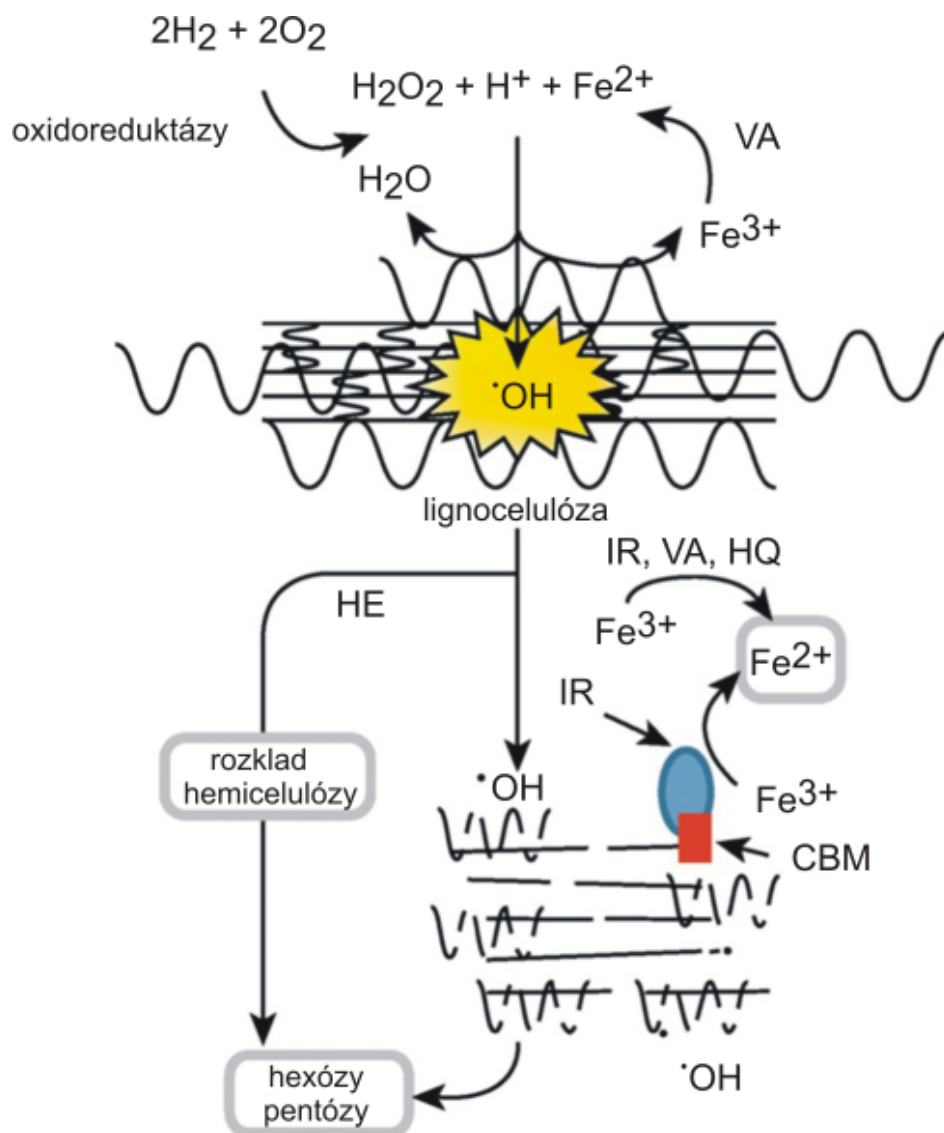
1. Houby hnědé hniloby

Houby hnědé hniloby využívají celulózu, což vede – jak již bylo zmíněno dříve – k rozpadu dřeva na krychličky či až na prášek (totiž tmavohnědý lignin). Dřevo tak ztrácí mechanické vlastnosti a z hlediska jeho dalšího využití je bezcenné. To je velký problém jednak při primárním napadení v lesních porostech, jednak při sekundárním v dřevěných stavbách či dalších konstrukcích. (vice viz např. Fojtík R., Lokaj A., Gabriel J.: Dřevěné mosty a lávky, ČKAIT 2017).

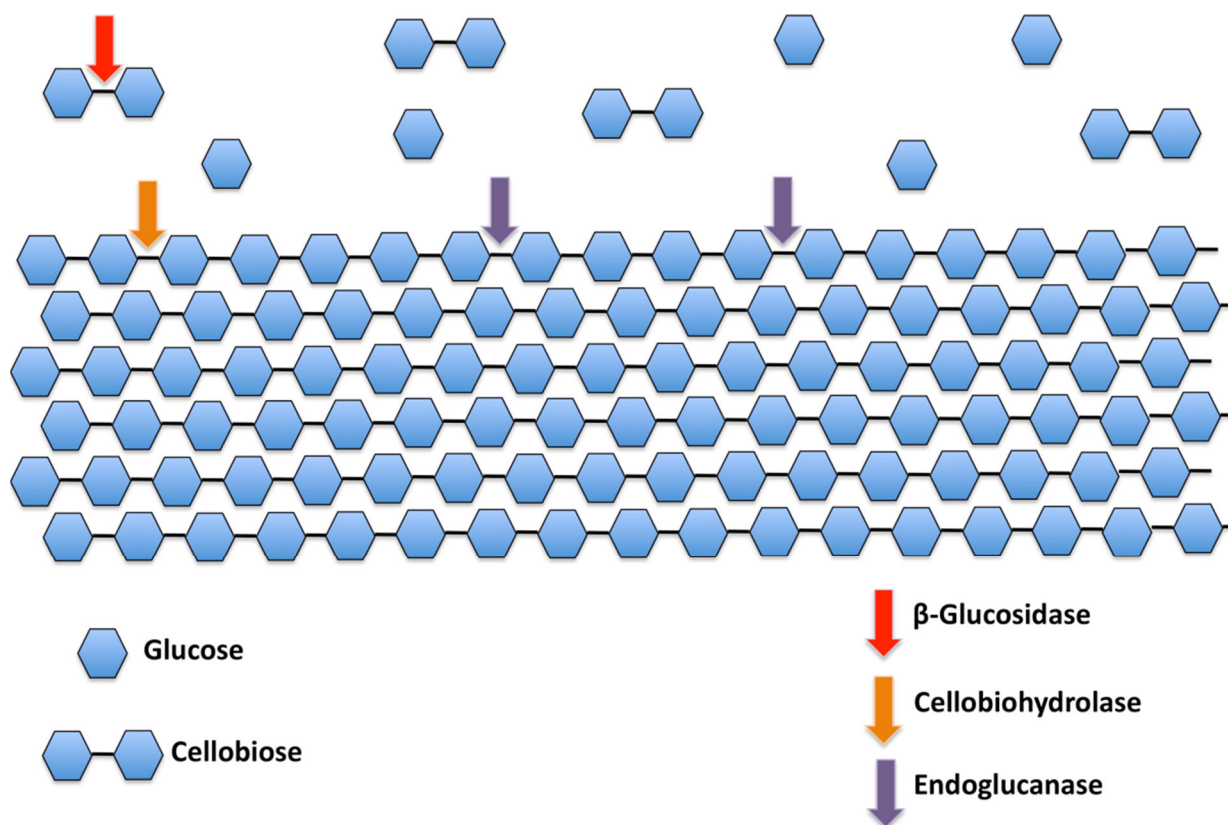
Věc má samozřejmě jednoduchý biochemický výklad; houby hnědé hniloby nedisponují ligninolýtickým systémem (přestože podle posledních výzkumů si geny pro něj mohou nest). Dřevo tedy rozkládají jednak enzymově (celulázami, xilanázami),

jednak využívají i Fentonovské systémy (peroxid vodíku v kombinaci s Fe^{2+} ionty, či případně v přítomnosti dalších dvojmocných tvoří velmi reaktivní radikály, schopné rozrušovat C-C vazby). Celulolytický enzymový systém hub je velmi dobře popsán v mnoha pracích či učebnicích, proto dale zmíníme jen stručně uvedme základní mechanismy.

Jak už bylo řečeno mezi houby hnědé hniloby patří např. outkovky rodu *Antrodia*, popraška sklepní (*Coniophora puteana*), trámovky (*Gloeophyllum* sp.), březovník (*Piptoporus betulinus*), sírovec žlutooranžový (*Laetiporus sulphureus*) troudnatce (*Fomitopsis* sp.) a samozřejmě dřevomorka domácí.

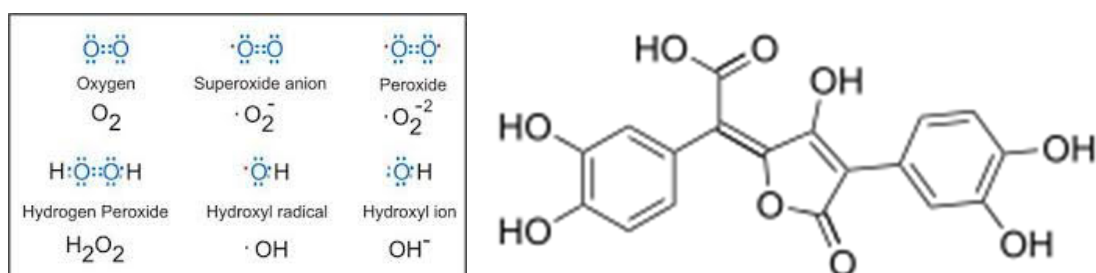


Obr. 39. Současné představy o mechanismu rozkladu dřeva dřevomorkou domácí. Po kolonizaci dřeva dochází k produkci kyseliny variegové (VA), hydrochinonů (HQ) a oxidoreduktáz, generujících hydroxylové radikály (OH) napadající hemi-celulózové struktury. Ty jsou rozkládány hydrolytickými enzymy (HE), a také neenzymovými Fentonovskými systémy. Komplex $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ oxidoreduktázy (IR) a celulózu vázajícího proteinu (CBM) směřuje produkci reaktivních radikálů ke konci celulóзовých řetězců. Upraveno podle: S. C. Watkinson a D. C. Eastwood (Advances in Microbiology 2012, viz Živa 2/2013).



Obr. 40. Základní schema rozkladu celulózy extracelulárními enzymy hub hnědé hniloby” od celulózy po glukózu.

Pro vlastní detekci celulolytických enzymů byla vypracována řada standardních metodik, zpravidla jsou založeny na spektrofotometrickém stanovení barevné (resp. absorbujícího) látky, původně navázané na přirozený substrát enzymu (např. azobarviva vázaná na karboxymethylcelulózu). Více např. v práci Větrovský et al, Ecology of coarse wood decomposition by the saprotrophic fungus *Fomes fomentarius*, Biodegradation 2011, 22:709-718.



Obr. 41. Fentonovská činidla a kyselina variegová, odpovědná mj. za modrání hřibovitých hub; hraje však patrně významnou roli i při rozkladu dřeva v přírodě.

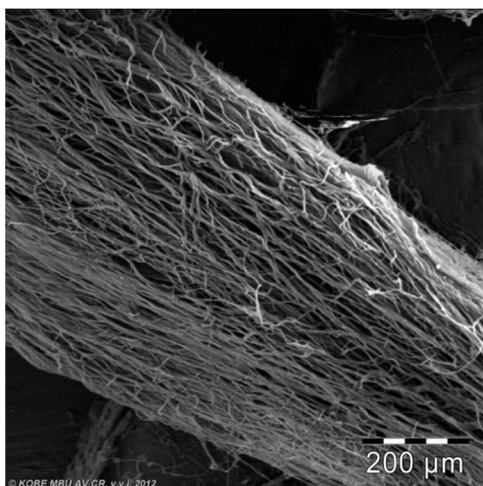
2. Problém zvaný dřevomorka

V tomto textu jsme se mnohokrát setkali s dřevomorkou domácí (*S. lacrymans*). Protože jde patrně o nejdůležitější houbu hnědé hniloby, zaslouží si něco místa. Původem je zčásti patrně z Himalájí, odkud si ji Angličané dovezli na počátku předminulého století na stromech, když předtím byli vyhubili své – bylo jich totiž třeba na výrobu lodí. Při tom si povšimli, že jim lode hnijí, a to kupodivu ne pod vodou, ale nad ní. Proto se někdy dřevomorka uvádí za “dry-rot” houbu. Postupem doby se rozšířila po celé Evropě, jak je možné najít mj. v práci Occurrence of indoor wood decay basidiomycetes in Europe; J. Gabriel, K. Švec (Fungal Biology Reviews, 31:212-217 (2017)). Kromě dřevomorky byly zaznamenány mj. záchyty *C. puteana*, *Antrodia vaillantii*, *A. sinuosa*, *Gloeophyllum* sp., *Donkioporia exansa*, *Poria placenta* aj. Dlužno však poznamenat, že dřevomorku pozná každý trohl, což patrně ovlivnilo množství záchyťů ve statistikách.

Dřevomorka je nebezpečná také díky tomu, že nejen efektivně rozkládá dřevo, ale je schopná se velmi rychle šířit nejen sporami či úlomky mycelia (to spíš), ale i rhizomorfami, což jsou vlákna, tvořená spleť hyf a schopná proniknout i přes zeď. Na svém apexu (špičce) bývá zvýšená produkce kyseliny šťavelové (oxalové), která tento proces snad usnadňuje. Rhizomorfy mohou být až několik metrů dlouhé, jak jsme se sami mnohokrát při výkonu soudně-znalecké činnosti přesvědčili a zdi, strop či podlaha pro ně není významnější překážka. Hubit ji lze zatím pouze fyzikálně (vysoká teplota, otevřený oheň). Chemické přípravky (komerční fungistatika či fungicidy) působí pouze preventivně



Obr. 42. Rhizomorfy dřevomorky vyvinuté po 60-denní kultivaci na smrkovém špalíčku. Petriho miska byla samozřejmě obalena parafilmem.



Obr. 43. Bližší náhled na strukturu rhizomorfy dřevomorky (SEM) a příklad plodnic.



Obr. 44. Dřevomorka pojídající koníka a podlahu rekreační chalupy v Krkonoších.



Obr. 45. Spravedlivá odplata. Je to hřibovitá houba, tj. je jedlá.

Kapitola VIII. Akumulace kovů v myceliu

Schopnost hub akumulovat kovy je známá desítky let. Největší pozornost byla dříve věnována obsahům toxických (především těžkých) kovů v plodnicích jedlých, resp. tržních druhů hub. Přirozené koncentrace kovů v houbách jsou však malé (obvykle se pohybují v řádech mg/kg sušiny), proto jejich spolehlivé měření je možné teprve díky moderním instrumentálním technikám. Nyní se používá nejčastěji atomová absorpční spektrometrie (AAS) popř. její modifikace ICP-MS.

1. Faktory ovlivňující obsah kovů v plodnicích

Mezi nejdůležitější faktory, ovlivňující obsahy kovů v plodnicích terrestrických druhů hub, patří především chemické složení půdy v dané lokalitě, její pH, vlhkost, popř. přítomnost dalších mikro- a makroorganismů. Houby rostoucí na dřevní hmotě mají obvykle nižší obsah většiny kovů.

Mycelium hub je schopno transportovat kovy i na relativně velké vzdálenosti. V 60. letech byly konány pokusy s transportem izotopů myceliem. Bylo zjištěno, že v poměrně krátké době byla radioaktivita detekována i ve vzdálenější části kultury (byl použit zinek, síra, fosfor, stroncium; rychlost přenosu byla asi 1 cm za den. V případě organických látek je transport mnohem rychlejší: fluorescein se pohybuje plodnicí václavky rychlostí asi dvanáct až patnáct cm za hodinu). V našich vlastních experimentech s polničkou (*Agrocybe* sp.) jsme dokázali přenos kadmia z půdy přes vrstvu slámy až do plodnic (Obr. 17). V jiném pokusu s penízovkou sametonohou (*Flammulina velutipes*) jsme sledovali obsah kadmia přeneseného ze slámy do plodnic ve třech po sobě následujících sklizních (ve čtrnáctidenních intervalech). Mezi obsahy v jednotlivých sklizních nebyly velké rozdíly.

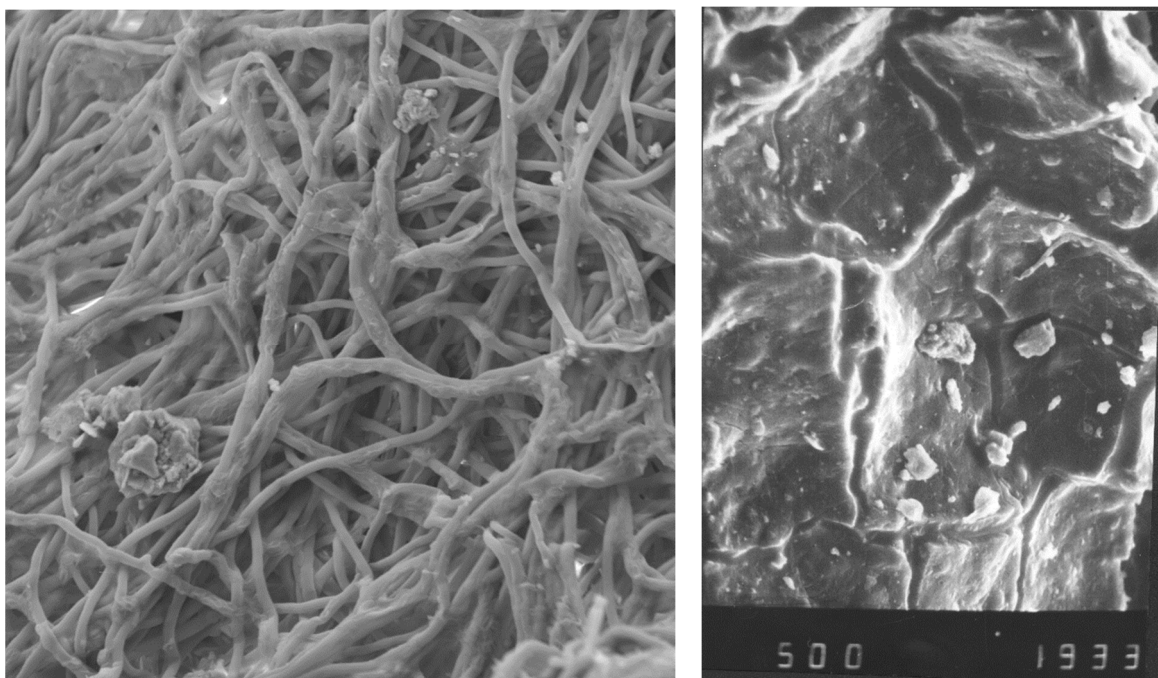
V následující tabulce jsou uvedeny příklady obsahů kadmia v některých houbách, jak byly publikovány různými autory.

houba	hodnota	(reference)
<i>Amanita muscaria</i>	17.4 ppm	(Allen and Steinnes, 1978)
<i>Amanita muscaria</i>	46-101 ppm	(Tyler 1980)
<i>Agaricus macrosporus</i>	100-299 ppm	(Tyler 1980)
<i>Fomes fomentarius</i>	0.15 ppm	(Tyler 1982)
<i>Lacrymaria velutina</i>	36 ppm	(Tyler 1980)
<i>Trametes gibbosus</i>	0.18 ppm	(Tyler 1982)
<i>Pluteus cervinus</i>	4.5 ppm	(Tyler 1982)
<i>Daedalea quercina</i>	0.22 ppm	(Gabriel et al. 1997)
<i>Fomitopsis pinicola</i>	0.43 ppm	(Gabriel et al. 1997)

Přenosu kovů do plodnic dřevokazných hub z půdy brání několik bariér. Především je to mykorrhizní obal na kořenech většiny dřevin, dále morfologická bariéra na přechodu podzemní a nadzemní části rostliny a konečně rozhraní mezi dřevní hmotou a myceliem. Obsah většiny kovů (např. Cd, Cu) klesá v řadě půda>kořeny>nadzemní

část >plodnice. U některých biogenních kovů, které jsou dobře přenášeny vodivým pletivem dřevin (Zn) tento vztah ovšem neplatí.

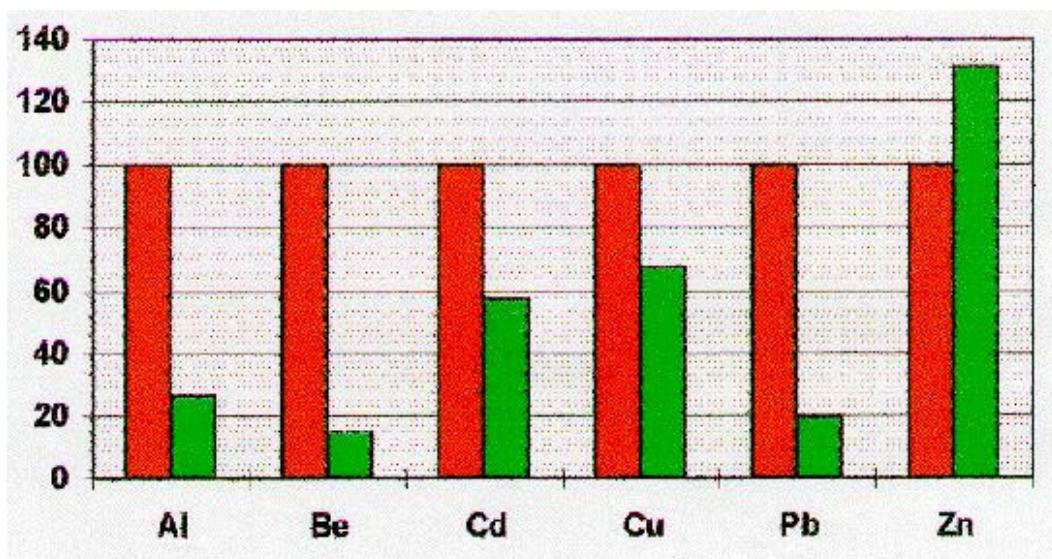
Jak bylo uvedeno výše, obsah antropogenních kovů v dřevokazných houbách neodráží jejich obsah v půdě. Do rostlin, tedy i dřevin se kovy dostávají též prostřednictvím suché a vlhké atmosférické depozice (a to jak bylo zjištěno, v nezanedbatelné míře - např. v experimentu s kukuřicí pocházelo z ovzduší 60 % veškerého kadmia). Kovy nalezené v plodnicích tak mohou mít dva zdroje - přímý spad (viz obrázek) a dále kovy obsažené v dřevu v bezprostředním okolí plodnice, odkud mohou být uvolněny a myceliem do plodnice transportovány.



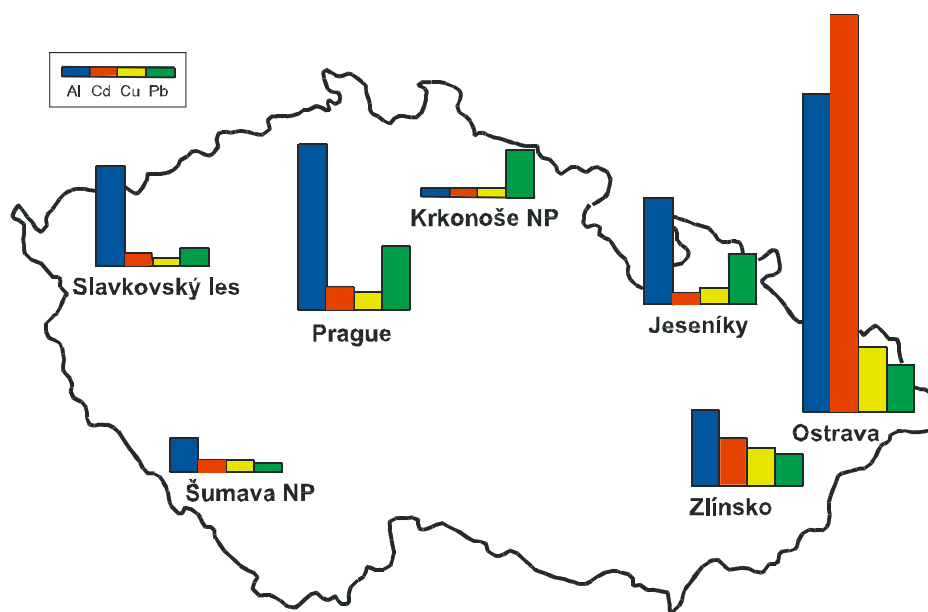
Obr. 46. Vlevo: Prachové částice na povrchu klanolístky obecné, vpravo na povrchu troudnatce pásovaného. Snímek elektronovým mikroskopem, zvětšení 400x resp. 500x.

Přestože je téměř nemožné určit resp. odhadnout celkovou dobu expozice, je možné ze srovnání obsahů kovů v houbách sbíraných v různých lokalitách usuzovat na stupeň znečištění životního prostředí resp. ovzduší. Výsledky našich vlastních měření obsahu kovů v plodnicích šesti druhů dřevokazných hub (sítkovec dubový, troudnatec pásovaný, lesklokorka ploská, ucho Jidášovo, klanolístka obecná a pevník chlupatý) sbíraných v letech 1995-1996 na území NP Šumava a v Praze shrnuje pro ilustraci následující tabulka.

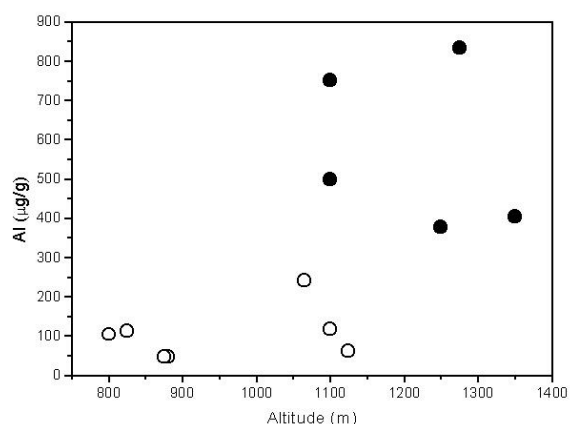
Na další stránce jsou uvedena data, získané pro všechny vzorky. Celkem bylo měřeno cca 50 vzorků z Prahy a 90 vzorků ze Šumavy.



Obr. 47. Normalizované srovnání obsahů kovů v dřevokazných houbách v Praze (červeně) a v NP Šumava (zeleně). Zinek snad jako biogenní prvek primárně obsazuje vazebná místa na povrchu mycelia, která jsou pak zaměňována podle lokálního znečištění (?).

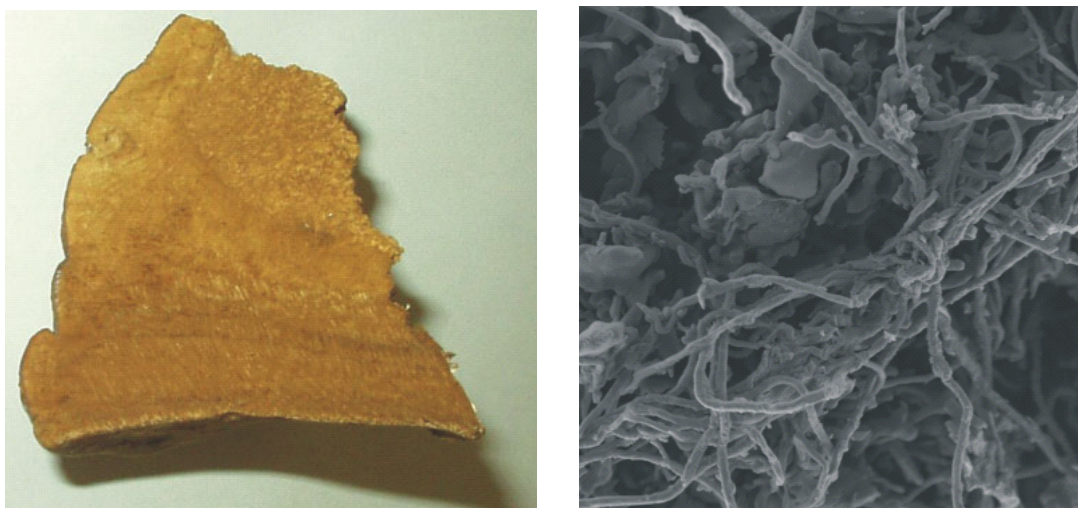


Obr. 48. Srovnání obsahů kovů v plodnicích dřevokazných hub z ekologicky čistých a znečištěných lokalit. Severně ostravska je průmyslová zóna v Katovicích, odkud řada kovů může být rovněž do ovzduší uvolňována.



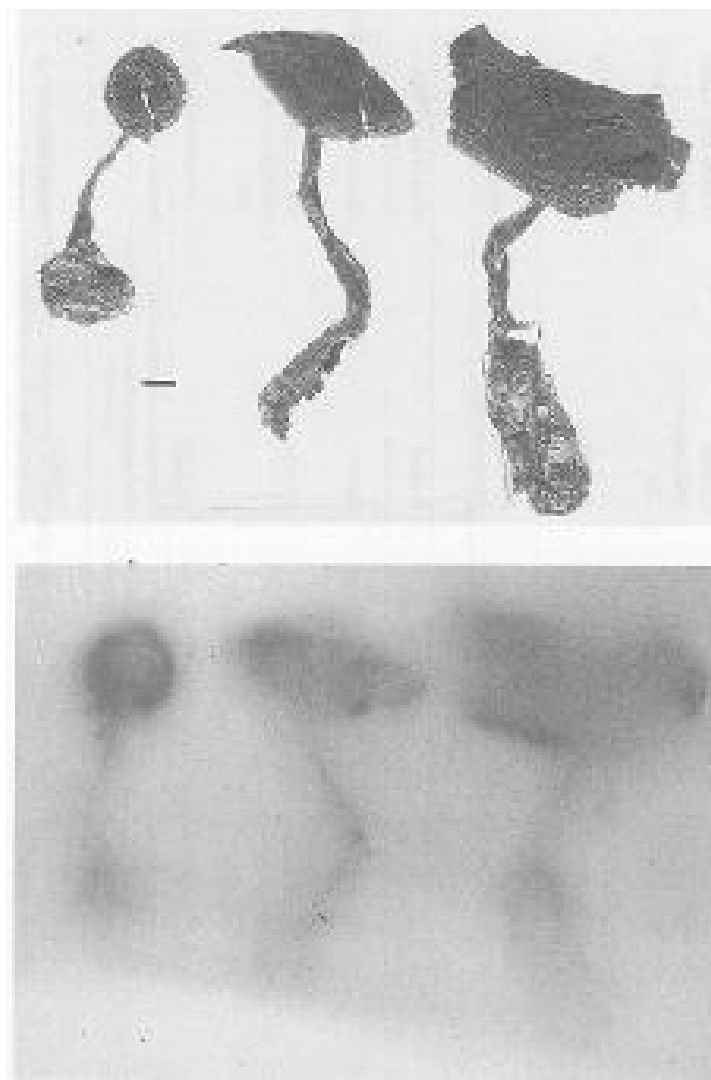
Obr. 49. Dálkový transport hliníku ovzduším: vliv nadmořské výšky na obsahy Al v plodnicích v blízkosti hliníkárný nedaleko Jeseníků.

Distribuce kovů v plodnicích není homogenní; u terestrických druhů bylo zjištěno, že daleko více kovů obsahuje klobouk než třeň (noha). Ve vlastních experimentech jsme se snažili zjistit distribuci kovů v plodnici troudnatce kopytovitého: metodou PIXE jsme skenovali průřez plodnicí a zjistili, že převážná většina manganu byla nalezena v tzv. jádře (kde je i vysoká aktivita Mn-peroxidázy), na povrchu plodnice převažovaly hliník, železo, kdežto toxické kadmium bylo téměř výlučně v hymeniu. U terestrických hub byla popsána akumulace toxických kovů ve sporách, kterých se houba při uvolňování spor zbavuje.



Obr. 50. Průřez plodnicí *F. fomentarius* (vlevo) a oblast jádra (v plodnici je vidět jako nehomogenní útvar vpravo nahoře) s částčkami dřeva (fotografie SEM vpravo). Více v práci Král J. et al.: PIXE determination of element distribution in *Fomes fomentarius*, X-ray spectrometry 2002, 34:341-344.

Houby samozřejmě mohou akumulovat i radionuklidy, jak je patrné z následujícího obrázku. Naštěstí i zde platí pravidlo iontové výměny – po promytí v solném roztoku se obsah radionuklidů zmenší, jenže houba už pak nechutná jako houba, radioaktivní je však stále (i když míň).



Obr. 51. Plodnice pavučince (*Cortinarius* sp.), sbírané ve Finsku r. 1987 (rok po Černobylské havárii). Fotografie zobrazují plodnice hub – nahoře a jejich autoradiogramy – dole).

2. Akumulace kovů submersními kulturami

Po morfologické stránce není rozdílu mezi myceliem tvořícím plodnice hub v přírodě a myceliem získávaným při kultivacích. Stejné mechanismy, které se uplatňují při vazbě kovů na povrch plodnic nebo mycelia vůbec v přírodě se uplatňují i při sorpci kovů houbami z různých modelových roztoků. Odpadní mycelium z průmyslových výrob, podobně jako řada dalších odpadních biologických materiálů (kvasinky, vláknité bakterie) bylo již v minulosti testováno jako možný biosorbent pro některé kovy. Důvody pro takové testování jsou především ekonomické - odpadní biomasa je levná a dostupná.

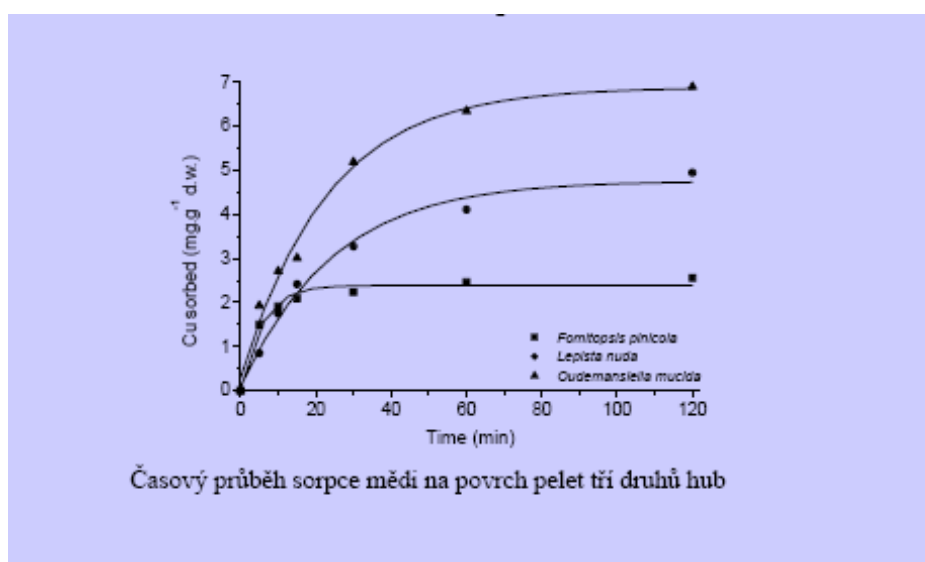
Submersní kultury dřevokazných hub jsou pro biosorpci kovů výhodné z několika důvodů. Jednak myceliální pelety mají dobré fyzikální vlastnosti (velikost, pevnost), jednak jsou schopny vázat často výrazně větší množství kovů na jednotku sušiny než ostatní biosorbenty. Nevýhodou ovšem je nízká dostupnost odpadního mycelia a jejich krátká životnost.

3. Mechanismus biosorpce kovů na povrch mycelia

V obou dříve diskutovaných případech se kovy váží na povrch mycelia. Na vazbě kovů se podílejí především polysacharidy vnější strany buněčných stěn, dále pigmenty popř. peptidy přítomné v buněčné stěně. Zpravidla jde o vazby iontové a koordinační. Klasická kovalentní vazba se patrně uplatňuje pouze výjimečně (např. v případě rtuti). Po chemické stránce se vazby kovů účastní skupiny karboxylové, aminoskupiny, sulfhydrylové skupiny, hydroxyskupiny, fosfátové zbytky apod.

Je zřejmé, že kovy, vázané podobně jako na iontoměniči, lze navzájem vytěsnit a zaměnit. Naše vlastní experimenty skutečně potvrdily možnost záměny navázaného olova a zinku sodíkem, nebo uvolnění sorbované mědi (bílé pelety ve skleněné koloně krásně zmodrají) promytím zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (pelety zase zbělají).

Architektura (sekundární a terciární struktura) a chemické složení polysacharidů buněčných stěn patrně určují, který kov bude vázán přednostně (resp. určují afinitu houby ke kovům). Biosorpce kovů je ale jako každá sorpce ovlivněna teplotou, pH, výchozí koncentrací kovu(ů) a množstvím sorbentu přítomného v roztoku. Je třeba říci, že sorpci kovových iontů houbami (včetně kvasinek) a vláknitými bakteriemi je věnována velká pozornost a existuje o této problematice značné množství literatury, kde případný zájemce nalezne detailnější popis problematiky.



Obr.52. Příklad sorpce Cu na povrch myceliálních pelet hub.

Závěrečná poznámka

Tento text si v žádném případě neklade za cíl vyčerpat nastíněnou problematiku; jde pouze o velmi stručný úvod, který snad čtenáře zaujme a případně dosud zvědavého jedince neodradí od dalšího studia této zajímavé oblasti bádání. Ať už z jakéhokoliv hlediska. S dřevokaznými houbami, kterým je tento spis věnován převážně, zcela určitě ještě nebylo učiněno vše, co mohlo být. V každém případě, pokud opustíme laboratoř či kuchyni, je z nich možno vyrobit úžasnou čepici. Jen nevím, jak by se ten chlapík na obrázku (případně někdo z vás čtenářů, kteří dočetli až sem a nasadili byste si ji na hlavu) tvářil po dešti.

Ale i to je experimentální mykologie, není-liž pravda?



Originelní čepice vyrobená z dužniny choroše zápalného. Domácký výrobek šumavský.

Foto Dr. A. Pilát.

Vesmír, č. 3, ročník IX (1930), str. 49.