

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovatelů.

Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie



**Profil lakasové aktivity v kulturách houby *Trametes*
versicolor během degradace endokrinně disruptivní látky
Delor 103**

Laccase activity profiling in *Trametes versicolor* cultures degrading
endocrine-disrupting compound Delor 103

Martina Plačková

Praha 2011

Vedoucí práce: Mgr. Kateřina Svobodová, PhD.
 (Laboratoř Environmentální Biotechnologie, Mikrobiologický ústav
 Akademie věd ČR, v.v.i.)

Práce byla vypracována samostatně, jen s použitím citované literatury a pod vedením příslušného vedoucího diplomové práce.

.....

.....

Práce byla finančně podporována grantem GAČR 503/10/0408 a MŠMT 2B06156 a ústavním výzkumným záměrem č. AV0Z50200510.

Poděkování:

Mé poděkování patří především mojí školitelce Mgr. Kateřině Svobodové, PhD., které děkuji za odborné rady, pomoc při sepisování práce, přátelský přístup a hlavně za spoustu podnětných informací, které jsem díky ní získala. Děkuji i zbytku osazenstva Laboratoře Environmentální Biotechnologie za pomoc při práci a hlavně za velice přátelské prostředí. V neposlední řadě děkuji svému Tomášovi, rodině a přátelům za jejich podporu po celou dobu mého studia.

ABSTRACT

In this work endocrine disrupting potential of Delor 103, a commercial mixture of PCB congeners, was studied along with its effect on production of laccase by the ligninolytic fungus *Trametes versicolor*.

Using a gene-reporter yeast assay for evaluation of hormonal activity Delor 103 showed an androgenic activity with an EC_{50} value of $2.29 \cdot 10^{-2}$ mg/l. Chlorbenzoic acids, Delor 103 potential metabolites resulting from microbial degradation, displayed on the other hand an estrogenic activity, indicating possible changes in hormonal activity of Delor 103 during its microbial degradation.

The addition of Delor 103 to mineral medium *T. versicolor* cultures resulted in an up to 257times higher laccase activities detected in fungal cultures. Delor 103 induced enzymes showed different pI values from those of control cultures. In a complex malt-extract glucose medium (MEG) the stimulation effect of Delor 103 was kept down. Further, the production of laccase and synthesis of different pI forms depended strongly on the growth phase of fungal cultures. Exponentially growing cultures of *T. versicolor* were able to produce up to 7 different pI forms of laccase in response to Delor 103 whereas stationary cultures produced only 4 enzyme forms with higher pI values.

Stimulation of laccase activities in *T. versicolor*, however, did not correlate with Delor 103 degradation by the fungal cultures. The highest Delor 103 removal was observed in MEG cultures with low laccase activity. Concurrently, stationary phase cultures were not able significantly degrade Delor 103, although laccase activity stimulation and an induction of laccase encoding genes transcription was observed in these cultures.

In vitro experiments revealed that Delor 103 addition to fungal cultures affected also dye decolorization and Delor 103 degradation potential of culture supernatants. The most efficient Delor 103 degradation was observed with Delor 103 induced enzymes with pI of 3.5 - 3.6. On the contrary, most efficient dye decolorization was observed with control culture supernatants containing laccases with higher pI (3.0 - 4.0).

Key words: *Trametes versicolor*, Delor 103, laccase, PCB biodegradation, gene expression, endocrine disrupting compounds

ABSTRAKT

V této práci byl studován endokrinně disruptivní potenciál Deloru 103 (směs kongenerů PCB) a jeho vliv na produkci a vlastnosti ligninolytického enzymu lakasy u houbové kultury *Trametes versicolor*.

Byla prokázána androgenní aktivita Deloru 103 ($EC_{50} = 2,29 \cdot 10^{-2}$ mg/l). Potenciální metabolity vznikající mikrobiální degradací této látky (chlorbenzoové kyseliny) vykazovaly estrogenní aktivitu, což naznačuje možné změny v hormonální aktivitě Deloru 103 v průběhu jeho mikrobiální degradace.

Přítomnost Deloru 103 v kulturách *T. versicolor* v minerálním médiu stimulovala u houby vyšší produkci lakasy (až 257 krát), která vykazovala zároveň jiné izoformové složení než enzymy z kontrolních kultur. V komplexním médiu s Delorem 103 byla pozorovaná indukce produkce aktivního enzymu 64x nižší než u kultur rostlých v minerálním médiu. Dále bylo prokázáno, že indukce lakasy a produkce jejích různých forem závisela na stavu kultury v době přidání polutantu. Exponenciálně rostoucí kultury *T. versicolor* po přidání Deloru 103 produkovaly 7 různých pI forem lakasy, kdežto kultury v stacionární fázi růstu produkovaly pouze 4 formy o vyšším pI.

Indukce lakasové aktivity u *T. versicolor* však nekorelovala s degradačním potenciálem kultur. Vyšší degradace (přibližně o 21 %) byla pozorována v kulturách rostlých v komplexním médiu. Zároveň stacionární kultury v minerálním médiu nevykázaly dostatečně prokazatelnou schopnost degradovat Delor 103, ikdyž indukce produkce lakasy v těchto kulturách (až 2,6x oproti kontrolní kultuře) byla prokázána i na úrovni transkripce genů.

In vitro pokusy ukázaly, že lakasy ze supernatantů odebraných z různých fází kultivace vykazovaly rozdílnou schopnost degradovat Delor 103. Nejlépe degradovaly tuto látku enzymy s pI 3,5 - 3,6 získané z kultur ovlivněných Delorem 103. Dekolorizace modelových syntetických barviv byla naopak nejlépe katalyzována enzymy s vyšším pI 3,8 - 4,0.

Klíčová slova: *Trametes versicolor*, Delor 103, lakasa, biodegradace PCB, exprese genu, endokrinně disruptivní látky.

OBSAH

Seznam použitých zkratk	9
1. Úvod	11
2. Cíle práce	12
3. Přehled literatury	13
3.1. Polychlorované bifenyly	13
3.1.1. Fyzikální a chemické vlastnosti PCB	13
3.1.2. Delor 103	14
3.1.3. Biologické dopady PCB	14
3.1.4. Biodegradace PCB	15
3.1.4.1. Bakteriální degradace PCB	15
3.1.4.2. Houbová degradace PCB	16
3.2. Houby bílé hniloby a jejich enzymatický aparát	18
3.2.1. <i>Trametes versicolor</i> a jeho degradační potenciál	19
3.2.2. Lakasa (benzodiol: oxygen oxidoreductasa, EC 1.10.3.2.)	21
3.2.2.1. Obecná charakteristika enzymu	21
3.2.2.2. Lakasa <i>T. versicolor</i>	25
3.2.3. Vliv organických znečištění na houbové biodegradující organismy a na produkci houbových enzymů	27
3.3. Endokrinní disruptory (ED)	29
3.3.1. ED a jejich mechanismus účinku	29
3.3.2. <i>In vitro</i> testy pro stanovení hormonální aktivity látek	30
3.3.3. Biodegradace ED	32
4. Materiál a metody	33
4.1. Organismy	33
4.2. Chemikálie	33
4.3. Sterilizace	35
4.4. Kultivační média	35
4.4.1. Dusíkem limitované médium – MM	35
4.4.3. Minimální kvasinkové médium – MMAUT	36
4.4.4. Syntetické minimální médium - SMD	37

4.4.5. LB médium - LB.....	38
4.5. Pufry	38
4.5.5. Sodno-citrátový pufr - SC.....	38
4.5.6. TAE pufr.....	38
4.5.7. TE pufr.....	38
4.5.8. DEPC dH ₂ O.....	38
4.6. Kultivace houbových kultur v tekutém médiu	39
4.7. Stanovení enzymatických aktivit.....	40
4.7.1. Lakasa.....	41
4.7.2. Mn-dependentní peroxidasa	42
4.8. β -galaktosidasový test	42
4.8.1. Příprava kultury.....	42
4.8.3. Výpočet.....	43
4.9. Bioluminiscentní kvasinkový test.....	44
4.9.1. Příprava kultury	44
4.9.2. Provedení testu	44
4.9.3. Výpočet.....	45
4.10. Stanovení houbové biomasy.....	45
4.11. Isoelektrická fokusace IEF	46
4.12. Izolace genomické DNA z houbového mycelia	46
4.13. Stanovení koncentrace DNA	47
4.14. PCR detekce <i>lac</i> genu v gDNA.....	47
4.15. Agarosová elektroforéza.....	48
4.15.1. Agarosová elektroforéza pro DNA vzorky.....	48
4.15.2. Agarosová elektroforéza pro RNA vzorky	49
4.16. Extrakce DNA z gelu.....	49
4.16.1. Extrakce DNA z agarosového gelu	49
4.17. Izolace celkové RNA z mycélia	50
4.18. Reversní transkripce	51
4.19. Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)	52
4.20. Kvantitativní PCR	53
4.21. Transformace DNA do <i>Escherichia coli</i>	54
4.22. Stanovení degradace PCB	55

4.22.1. Extrakce PCB z kultur <i>T. versicolor</i>	55
4.22.2. <i>In vitro</i> degradace Deloru 103 pomocí extracelulární tekutiny <i>T. versicolor</i> ...	55
4.22.3. Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS)	56
4.23. <i>In vitro</i> dekolizace syntetických barviv	56
4.24. Statistické zpracování	57
5. Výsledky	58
5.1. Měření endokrinní aktivity chemikálií	58
5.1.1. Estrogenní aktivita látek měřená β -galaktosidázovým testem	58
5.1.2. Estrogenní a androgenní aktivita látek měřená bioluminiscentním testem	60
5.2. Průběh enzymatických aktivit v kulturách <i>T. versicolor</i>	62
5.2.1. Kultivace v MEG médiu	62
5.2.2. Kultivace v MM médiu	63
5.2.2.1. Kultivace A	63
5.2.2.2. Kultivace B	65
5.3. Degradace Deloru 103 v kulturách <i>in vivo</i>	67
5.4. <i>In vitro</i> degradace Deloru 103	69
5.5. <i>In vitro</i> dekolizace barviv	70
5.6. Izoelektrická fokusace (IEF) lakasy <i>T. versicolor</i>	73
5.7. Expres genů pro lakasy u houby <i>T. versicolor</i>	74
5.7.1. Izolace RNA	74
5.7.2. Reversní transkripce	75
5.7.3. qPCR z cDNA <i>T. versicolor</i>	76
5.7.4. DGGE analýza exprese lakasových genů <i>T. versicolor</i>	78
5.7.5. Sekvence PCR produktů vyizolovaných z DGGE gelu	80
6. Diskuse	81
7. Souhrn	88
8. Seznam literatury	90
9. Přílohy	102
9.1. Přehled proceedingsů z konferencí a posterových sdělení týkajících se této práce.	109
9.2. Přehled publikací v IF časopisech	109

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid)diammonium salt
APS	Amonium persulfát
Bio	Kultury rostlé bez přítomnosti chemikálií
ClBA	Chlorbenzoové kyseliny
ClP	Chlorfenoly
CO-PCB	Koplanární polychlorované bifenyly
CPRG	Chlorofenol red-b-D-galactopyranoside
CuP	Copper(II) phthalocyanine- tetrasulfonic acid tetrasodium salt
D103	Kultury rostlé s Delorem 103
D1-3	Domény lakasy <i>T. versicolor</i>
DEPC	Diethyl dicarbonate
DGGE	Denaturační gradientová gelová elektroforéza
DMP	2,6-dimethoxyfenol
E2	17 β -estradiol
EA	Enzymatická aktivita
EC ₅₀	Efektivní koncentrace látky odpovídající poloviční odezvě testu
ED	Endokrinní disruptory
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EE2	17 α -ethinylestradiol
EtBr	Ethidium bromid
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
HBA	Kyselina 4-hydroxybenzoová
HBT	1-hydroxybenzotriazol
HO-PCB	Hydroxylované polychlorované bifenyly
IEF	Izoelektrická fokusace
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
L1-4	Konzervované sekvenční regiony lakasy
LiP	Lignin peroxidasa
LME	Lignin modifikující enzymy
MEG	Malt extrakt glukosové médium
MM	Minimální médium
MMAUT	Minimální kvasinkové médium
MnP	Mangan-dependentní peroxidasa
MOPS	3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid
OMW	Médium s odpadem z výroby olivového oleje
PAH	Polycyklický aromatický uhlovodík

PCB	Polychlorované bifenyly
PCR	Polymerázová řetězcová reakce
QPCR	Kvantitativní PCR
RBBR	Remazol Brilliant Blue R
RO16	Reactive Orange 16
SMD	Syntetické minimální médium
SD	Směrodatná odchylka
T1-3	Měďnatá centra lakasy
TNT	2,4,6-trinitrotoluen
U	Jednotka enzymatické aktivity
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -galactoside

1. ÚVOD

Tato práce je zaměřena na extracelulární enzymy, lakasu a mangan-dependentní peroxidasu, kultury *Trametes versicolor* produkované za různých podmínek během kultivace na médiu kontaminovaném Delorem 103 (komerční směs polychlorovaných bifenyly). Největší důraz a pozornost je věnována enzymu lakase, který byl u studované houby potvrzen jako enzym s nejvyšším biodegradačním potenciálem.

Práce byla vypracována v Laboratoři environmentální biotechnologie Mikrobiologického ústavu AVČR jako součást projektu, který se zabývá studiem mechanismu degradace organických polutantů, jako jsou polycyklické aromatické uhlovodíky, polychlorované bifenyly, endokrinně disruptivní látky a syntetická barviva, pomocí ligninolytických hub, bakterií a kompostování. Hlavním cílem laboratoře je připravit bioremediační metodu aplikovatelnou pro tyto polutanty, která by byla vhodně využitelná v praxi.

Intenzivní růst průmyslu v posledních více než sto letech velice zhoršil ekologickou situaci na Zemi. Do prostředí se dostává velké množství různorodých chemických látek, které kontaminují povrchové i spodní vody, půdu a samozřejmě i vzduch. V případě Deloru 103, i po ukončení jeho výroby v roce 1984, kontaminace půdy a vod touto látkou stále přetrvává v místech starých ekologických zátěží (HNAŤUKOVÁ *et al.* 2010). Tyto látky mají také často velice nepříznivý vliv na lidský organismus. U Deloru 103 je v této práci nově popsán potenciálně estrogenní a androgenní charakter účinku na člověka. Houby bílé hniloby, mezi které patří studovaná kultura *T. versicolor*, v minulých letech prokázaly v laboratorních podmínkách velký potenciál v degradaci xenobiotik. Lze tedy usuzovat, že by se mohly uplatnit i v reálném užití při čištění kontaminovaných odpadů. K tomu je ovšem třeba řádně porozumět procesům, kterými degradace polutantů probíhá, i fyziologii degradujících kultur.

Tato práce navazuje na téma laboratoře s využitím molekulárních metod ke studiu exprese enzymů v závislosti na přítomnosti přírodního polutantu, což by mělo přispět k pochopení procesů probíhajících v degradujících organismech a tak pomoci novými poznatky v dalším studiu dané problematiky. Produkce lakasy je v této práci zkoumána na úrovni vlastností proteinů sekretovaných do kultivační tekutiny (enzymové aktivity, *pI* proteinů, degradační potenciál enzymů) za různých kultivačních podmínek a sledována byla i stimulace transkripce a profil exprimovaných genů kódujících lakasu pomocí kvantitativní real-time PCR a metody RNA-DGGE.

2. CÍLE PRÁCE

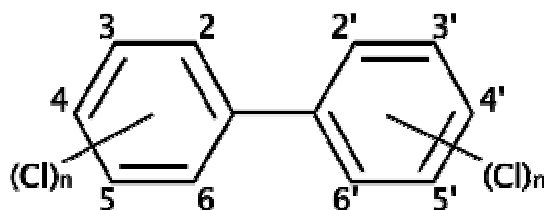
- Studium hormonální aktivity Deloru 103 a jeho potenciálních metabolitů, chlorfenolů a chlorbenzoových kyselin, pomocí *in vitro* kvasinkových reportérových systémů.
- Popis vlivu Deloru 103 a jeho potenciálních metabolitů na produkci ligninolytických enzymů (konkrétně lakasy a mangan-depandentní peroxidasy) u houby *T. versicolor* za různých kultivačních podmínek.
- Studium vlastností lakasy *T. versicolor* stimulované Delorem 103 (*pI*, *in vitro* degradační potenciál) a profil exprese genů kódujících tento enzym u *T. versicolor*.

3. PŘEHLED LITERATURY

3.1. Polychlorované bifenyly

3.1.1. Fyzikální a chemické vlastnosti PCB

Polychlorované bifenily (PCB) a jejich kongenery patří mezi látky znečišťující životní prostředí. Jejich obecná struktura je zobrazena na Obr. 1. Od roku 1929 byly používány pro mnoho průmyslových a komerčních účelů, jako je dielektrika, přenos tepla, hydraulické kapaliny, změkčovače nebo zpomalovače hoření. Díky svojí stabilitě a hydrofobicitě mají tyto látky velice persistentní charakter, který z nich při kontaminaci životního prostředí činí celosvětový ekologický problém (OHSAKI *et al.* 1997).



Obr. 1 Obecná struktura PCB

Komerční směsi PCB obsahují 20 až 70 z 209 teoretických kongenerů, z nichž je jen 130 průmyslově využíváno. Tabulka udávající přesné složení a zavedené číslování jednotlivých kongenerů je uvedena v příloze (Tab. 1p). Každý kongener má vlivem rozdílného stupně chlorace (1-10 atomů chloru) a jejich umístění na bifenylovém jádře jiné chemické a fyzikální vlastnosti a liší se svojí toxicitou (KÁŠ *et al.* 2000, DE *et al.* 2004). Jednotlivé kongenery jsou bezbarvé až žluté krystaly bez zápachu, avšak komerční směsi PCB jsou kapaliny. Hustota směsí závisí na stupni chlorace a s růstem obsahu chloru se zvyšuje. Všechny však mají hustotu vyšší než voda (přibližně 1440 kg/m³). Společnou vlastností všech kongenerů je jejich nízká rozpustnost ve vodě (50-200 µg/l při 20°C), velmi nízká tenze par (<1 Pa) a vysoká dielektrická konstanta. Jsou rozpustné ve většině

organických rozpouštědel, olejích a tucích. Jsou také chemicky i fyzikálně stálé (bod tání je mezi 34-198°C, bod varu v rozmezí 260-450°C), nehořlavé a nekorozivní.

PCB jsou velice odolné vůči účinkům zásad a kyselin, nepodléhají oxidaci běžnými oxidačními činidly a redukcí. Jsou rezistentní také vůči hydrolýze a alkoholýze (BALLSCHMITER a ZELL 1980, SAFE *et al.* 1987, KÁŠ *et al.* 2000). Bylo prokázáno, že tyto látky vzhledem k jejich hydrofobicitě spíše sedimentují a adsorbují se než zůstávají rozpuštěné ve vodě (MIYAMOTO a KLEIN, 1998).

3.1.2. Delor 103

V bývalé ČSSR se polychlorované bifenyly vyráběly v jediném monopolním podniku CHEMKO Strážské od roku 1959 do 15. ledna 1984. Celkově bylo v ČSSR za 25 let vyrobeno 21 481,8 t PCB. Jedním z produktů byla směs kongenerů PCB nazvaná Delor 103 (přesné složení směsi – čísla kongenerů dle Tab.1p - 4, 6, 5, 8, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 25, 26, 28, 31, 32, 33, 37, 40, 42, 44, 45, 47, 48, 49, 52, 53, 56, 60, 66, 70, 74, 76, 77, 91, 99, 101, 105, 110, 113, 118, 149, 153). Je to rafinovaná směs di- až pentachlorbifenyly s převahou trichlorbifenyly. V průmyslu byl užíván jako elektroizolační a hydraulická kapalina (data převzata od CHEMKO Strážské). Výzkum z posledních let ukazuje, že kontaminace půdy a vod touto látkou stále přetrvává a je třeba přijít na vhodný postup k jejímu odstranění (HNAŤUKOVÁ *et al.* 2010).

3.1.3. Biologické dopady PCB

Bylo vypočítáno, že celosvětově bylo vyprodukováno více než 1,5 milionu tun PCB (FAROON *et al.* 2001), z čehož bylo signifikantní množství vypuštěno do přírody, kde se akumulovalo v půdě a sedimentech a odkud se PCB látky dostaly do potravního řetězce (NOGALES *et al.* 1999). Bylo prokázáno, že tyto látky mají kancerogenní účinek (MAYERS *et al.* 1998) a negativně působí na lidský imunitní, reprodukční, nervový a endokrinní systém (FAROON *et al.* 2003).

Dále bylo prokázáno, že hydroxylované metabolity PCB dokáží interagovat s lidskými hormonálními receptory (estrogenními, thyroidními a androgenními) a simulovat funkci přirozených hormonů (KIMURA-KURODA *et al.* 2005, OTAKE *et al.* 2007; JIAO *et al.* 2008). Proto jsou tyto látky řazeny mezi tzv. endokrinní disruptory (ED).

3.1.4. Biodegradace PCB

Likvidace PCB obsahujících nebezpečných odpadů často probíhá spalováním, což vede ke vzniku ještě toxičtějších látek, jako jsou polychlorované dibenzofurany nebo polychlorované dibenzodioxiny. Proto se tyto látky spalují dle přísně stanovených pravidel (HOLOUBEK *et al.* 1996). Z důvodu, že spalování je neekonomický proces, kterým se navíc degraduje i spalovaná půda, se hledají alternativní cesty jak odstranit PCB z přírodního prostředí.

Některé mikroorganismy mají schopnost biologicky odstraňovat tyto chemikálie svým metabolismem a mohly by tedy být využity v bioremediačních aplikacích. Tato metoda by byla velice vhodná z finančního hlediska, navíc se jedná o ekologicky šetrnou metodu vhodnou i pro rozsáhleji kontaminované oblasti. Mezi organismy s největším biodegradacním potenciálem vůči PCB patří bakterie (TOTEVOVÁ *et al.* 1997, PIEPER a SEEGER, 2008) a houby bílé hniloby, jako je *Phanerochaete chrysosporium* a *Trametes versicolor* (KRČMÁŘ a ULRICH, 1998, RUIZ-AGUILAR *et al.* 2002).

3.1.4.1. Bakteriální degradace PCB

Bylo popsáno několik kmenů bakterií, které jsou schopny degradovat PCB (VASILYEVA a STRIJAKOVA 2007, PIEPER a SEEGER 2008). Bakterie využívají PCB jako zdroj uhlíku a energie (což se ovšem týká pouze monochlorovaných bifenyly) a nebo jsou PCB transformovány v kometabolismu, v kterém PCB neslouží jako zdroj energie (TOTEVOVÁ *et al.* 1997).

V anaerobním prostředí u bakterií dochází k redukční dechlorinaci PCB (anaerobní mikroorganismy používají chlor na molekule PCB jako akceptor elektronů), jak bylo prokázáno v práci WU *et al.* (2002) na dvou bakteriích příbuzných kmeni

Dehalococcoides. Obecně bylo prokázáno, že anaerobní bakterie jsou schopny reduktivní dechlorace více chlorovaných bifenyly v polohách meta a para, čímž dochází ke kumulaci ortho substituovaných PCB, a tedy ke snížení jejich toxicity. Produktem této reakce jsou potom nížechlorované bifenyly, které jsou dále snáze degradovatelné pomocí aerobních bakterií (REIN *et al.* 2007).

Aerobní degradace PCB u bakterií začíná atakem látek specifickými Riskeho nehemovými železitými oxygenasami, mezi které patří biphenyl-2,3-dioxygenasa (GIBSON a PARALES 2000). Tento enzym je považován za klíčový enzym PCB degradace (PIEPER a SEEGER 2008). Metabolismus PCB látek pokračuje dále dvěma možnými drahami – tzv. svrchní a spodní, které se liší svými konečnými metabolity (PIEPER a SEEGER 2008). Aerobní oxidací ovšem dochází pouze k ataku méně chlorovaných kongenerů PCB. Celkově lze říci, že degradovatelnost jednotlivých kongenerů PCB je závislá především na substrátové specifitě prvního enzymu v degradační dráze, tedy biphenyl-2,3-dioxygenasy (GIBSON a PARALES 2000). Druh degradující bakterie je poté určující pro tvorbu příslušných intermediátů reakce. Například při degradaci pomocí bakterie *Alkaligenes* dochází ke vzniku chlorbenzoových kyselin a v případě bakterie *Acinetobacter* byly jako intermediáty nalezeny hydroxylované PCB (HO-PCB). Mezi kmeny schopné degradovat širší spektrum kongenerů patří *Pseudomonas* sp. LB400, *Alcaligenes eutrophus* H850, *Acinetobacter* sp. P6 a *Corynebacterium* sp. MB1 (PIEPER a SEEGER 2008).

3.1.4.2. Houbová degradace PCB

Houby bílé hniloby také vykazují velký biodegradační potenciál vůči PCB látkám, který je přisuzován jejich ligninolýtickému systému (KÖLLER *et al.* 2000), jak je tomu i v případě jiných látek degradovaných těmito enzymy (MANJI a ISHIHARA 2004, BALDRIAN *et al.* 2005). Tyto organismy jsou schopny degradovat jak samostatné kongenery (VYAS *et al.* 1994), tak i směsi PCB (YADAV *et al.* 1995, NOVOTNÝ *et al.* 1997).

Práce TAGAKI *et al.* (2007) ukázala, že při degradaci PCB houbou *T. versicolor* jsou exprimovány 3 různé lakasy, jakožto majoritní enzymy účastníci se degradace. Míra degradace jednotlivých kongenerů těmito enzymy byla závislá na chemické struktuře PCB kongeneru – HO-PCB byly metabolisovány až 3x rychleji než nehydroxylované. Také bylo prokázáno, že díky rozdílné rozpustnosti ve vodě, jsou snadněji redukovatelné ortho kongenery (TAGAKI *et al.* 2007). Byla také porovnána míra degradace HO-PCB oproti příbuzným koplanárním PCB (CO-PCB) u této houbové kultury. Větší efektivita a rychlost degradační reakce byla pozorována u HO-PCB (TAGAKI *et al.* 2007).

Schopnost *T. versicolor* degradovat PCB byla prokázána v práci RUIZ-AGUILAR *et al.* (2002). *T. versicolor* degradoval 29-70% všech kongenerů PCB z půdy z okolí Mexico-city v závislosti na jejich koncentraci v kultivačním médiu. Na rozdíl od bakterií se stejným PCB degradačním potenciálem byly houby schopné degradace i při vyšší koncentraci degradovaných látek (RUIZ-AGUILAR *et al.* 2002). Také *in vitro* pokusy s lakasou *T. versicolor* (heterologně exprimovanou organismem *Aspergillus oryzae*) prokázaly, že je tento enzym schopný degradovat HO-PCB (KEUM a LI 2004, FUJIHIRO *et al.* 2009). V práci FUJIHIRO *et al.* (2009) byly vyizolovány dvě skupiny lakas v závislosti na jejich pI (skupina 1 – 5,0-6,0; skupina 2 – 3,0-4,0). Celkově byly HO-PCB oxidovány lépe skupinou 1, která prokázala 85% degradaci kongenerů (průměrná hodnota měření degradace jednotlivých kongenerů). Skupina 2 oxidovala méně chlorované HO-PCB se stejnou úspěšností, ovšem rapidní pokles (na 50%) byl zaznamenán v případě vícechlorovaných látek (FUJIHIRO *et al.* 2009).

Degradace směsi kongenerů Delor 103 byla zatím studována pouze pomocí *P. chrysosporium* (YADAV *et al.* 1995, KRČMÁŘ a ULRICH 1998). Byla prokázána 55% degradace této směsi při *in vivo* pokusu trvajícím 9 dní. V tomto rozmezí se ovšem nepodařilo naměřit adekvátní množství sledovaných enzymů lignin peroxidasy a mangan dependentní peroxidasy, čímž byly vyloučeny jako degradační enzymy v této reakci. Degradace tedy probíhala nejspíše intracelulárními enzymy (KRČMÁŘ a ULRICH 1998).

3.2. Houby bílé hniloby a jejich enzymatický aparát

Pojmenování houbových organismů „houby bílé hniloby (anglicky white-rots)“ vzniklo na základě bílé barvy dřeva degradovaného těmito houbami. Do této skupiny patří houby schopné rozkladu ligninu, především basidiomycety, avšak řadíme sem i askomycety, jako například *Xylariaceae* (EATON a HALE 1993, POINTING 2001). Je to tedy skupina taxonomicky rozdílných vyšších hub, které jsou charakteristické jejich unikátní schopností depolymerizovat a mineralizovat lignin za použití směsi extracelulárních ligninolytických enzymů. Lignin je obtížně hydrolyzovatelný rostlinný polymer, který je degradován v sekundárním metabolismu hub pro zpřístupnění dřevních polysacharidů uzamčených v lignin-sacharidových komplexech, jež poté poskytují zdroj energie, ke kterým organismy jinak nemají přístup (JEFFRIES 1990, POINTING 2001). Pro heterogenní strukturu ligninu je ligninolytický enzymatický aparát velice substrátově nespecifický, což umožňuje těmto houbám degradovat i rozmanité druhy odolných látek znečišťujících životní prostředí (HATAKKA 1994, POINTING 2001).

Mezi tyto enzymy (LME – lignin modifying enzymes) patří dvě peroxidasy, lignin peroxidasa (LiP) a mangan-dependentní peroxidasa (MnP) a fenoloxidasa lakasa (THURSTON 1994, POINTING 2001). Někteří autoři uvádí navíc mangan-independentní peroxidasu jako enzym některých hub bílé hniloby (EGGERT *et al.* 1996, POINTING 2001). LME spolupracují s enzymy, které jsou neschopné degradovat lignin samostatně: glyoxalová oxidasa, superoxid-dismutasa, aryl alkohol oxidasa a celobióso dehydrogenasa, avšak produkují H_2O_2 potřebný pro peroxidasy (LiP, MnP) nebo slouží jako spojení drah při ligninolytické degradaci (LEONOWICZ *et al.* 2001).

3.2.1. *Trametes versicolor* a jeho degradační potenciál

Tato práce je zaměřená na *Trametes versicolor* (synonymum *Coriolus versicolor* f. *antarcticus*), což je houba bílé hniloby, která roste na dřevě listnatých stromů, především dubu. Fylogenetická analýza založená na srovnávání sekvencí mitochondriální a ribosomální DNA (data získaná z NCBI databáze) ukázala, že tato houba patří do čeledi basidiomycetních hub *Polyporaceae sensu lato*. Z hlediska syntézy ligninolytických enzymů patří *T. versicolor* mezi houby, které extracelulárně produkují lakasu, MnP, LiP a arylalkohol-oxidasu a pro degradaci ligninu primárně používají lakasu a MnP (HATAKKA 1994).

Výhodou právě této houby je její vysoká odolnost vůči stresovým podmínkám v tekutých kulturách (FRAGOEIRO a MAGAN 2005) a díky rychlému prodlužování hyf a hlubokému myceliárnímu růstu je schopná rychle kolonizovat a využít substráty, které jsou pro ostatní mikrobiální komunitu špatně dosažitelné. Touto strategií se maximalizují interakce mezi extracelulárními enzymy a okolním prostředím. (MAGAN 2007).

T. versicolor je jednou z nejvíce prostudovaných hub z hlediska biodegradace látek. Je schopna produkovat svůj hlavní ligninolytický enzym lakasu v podmínkách pomalého buněčného růstu s nízkou koncentrací glukosy v prostředí. Tato regulace produkce lakasy je výhodnou například v degradaci barviv, které samy o sobě poskytují nutriční zdroj dusíku a uhlíku (WONG a YU 1999). Práce CLAUS *et al.* (2002) prokázala, že lakasa *T. versicolor* je schopna degradovat široké spektrum barviv zahrnující barviva atrachinonová, heterocyklická, indigobarviva i azobarviva. Nejvyšší dekolorizace (až 90 % dekolorizace) byla pozorována u antrachinonových barviv Acid green 27 a Reactive Blue 19. Stejný výsledek ukázala i práce WONG a YU (1999), kde antrachinonová barviva byla degradována úměrně množství lakasy a degradace ostatních barviv ve vyšší míře probíhala pouze za přítomnosti dalších nízkomolekulárních metabolitů kooperujících s lakasou. Tato hypotéza byla podpořena i v práci, která se zabývala degradací trifenylnetanových barviv, kdy houbová kultura *T. versicolor* dekolorizovala až 99 % barviva Acid Fuchsin (o počáteční koncentraci 0,15 g/l), zatímco purifikovaný enzym při stejné aktivitě lakasy dosáhl úspěšnosti pouze kolem 25 % (CASAS *et al.* 2009). Dekolorizaci barviv také významně podporuje přítomnost mediátorů a to především ABTS (2,2-azinodi-3-

etylbenzotiazolin-6-sulfonát) a HBT (1-hydroxybenzotriazole) (BOURBONNAIS *et al.* 1995, TORRES *et al.* 2003).

Vedle lakasy může být dekolorizace barviv u *T. versicolor* katalyzována i jinými intracelulárními enzymy (BLÁNQUEZ *et al.* 2004). Kromě dekolorizace barviv je houba také schopna u těchto látek snižovat jejich potenciální toxicitu (CASAS *et al.* 2009).

Houba *T. versicolor* dokáže degradovat i další chemické sloučeniny. Bylo prokázáno, že produkce ligninolytických enzymů je významně stimulována v přítomnosti fenolů (MOUGIN *et al.* 2002, KOLLMAN *et al.* 2005). Jedná se především o pesticidy, farmaka a látky hojně využívané v průmyslu. Již na počátku výzkumu degradačního potenciálu lakas bylo prokázáno, že jsou schopné oxidovat *o*-, *p*-difenoly, aminofenoly, polyfenoly, polyaminy a další fenolické látky (KAWAI *et al.* 1988). Komerčně využívaný detergent nonylfenol byl za pomoci *T. versicolor* degradován až na 1,3 % původního množství v médiu po 5-ti týdenní kultivaci (SOARES *et al.* 2005). Navíc práce TSUTSUMI *et al.* (2001) s purifikovanou lakasou *T. versicolor* dokázala, že po 12 hodinách inkubace je odstraněna (z množství 50 mg/l) s látkou i její estrogenní aktivita. Dalšími fenolickými látkami, které byly prokazatelně degradovány houbou *T. versicolor* jsou ibuprofen, kyselina klobifrová a karbamazepin, které patří mezi běžně užívané léky (MARCO-URREA *et al.* 2009). Bylo ovšem zjištěno, že tuto degradaci nemají na svědomí samotné ligninolytické enzymy, ale jejich kooperace se systémem cytochromů P₄₅₀ (MARCO-URREA *et al.* 2009). Purifikovaná lakasa z této houby vykazovala nízký degradační potenciál k utilizaci bromfenolů, ovšem po přidání mediátoru ABTS se degradace zvýšila a to v případě 2,4,6–tribromfenolu nebo 2-bromfenolu až o 80 % (UHNÁKOVÁ *et al.* 2009). *In vivo* pokus poté také ukázal, že lakasa *T. versicolor* samotná není plně odpovědná za degradaci polutantu, ale potřebuje kooperovat s dalším zatím nezjištěným (potenciálně intracelulárním) pomocným mechanismem (UHNÁKOVÁ *et al.* 2009).

Velký potenciál *T. versicolor* k biodegradaci atrazinu, jakožto jednoho z nejběžnějších herbicidů, byl prokázán v práci BASTOS a MAGAN (2009). Pokus byl dělán v nesterilních podmínkách suché vápenité hlíny, čímž byla dokázána schopnost této houby utilizovat xenobiotikum i za podmínek interakce s ostatními organismy a limitace

vodou. Studovaná houba je taktéž schopna degradovat 2,4,6-trinitrotoluen (TNT) s účinností až 95 % během 9 hodin kultivace (CHEONG *et al.* 2006).

Lakasy hub bílé hniloby, mezi které patří *T. versicolor*, jsou také schopné degradovat molekuly polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH). Lakasa *T. versicolor* byla schopná degradovat v průběhu 300 minut naftalen až na 30 % jeho původní koncentrace (BAUTISTA *et al.* 2010). Také dibutylftalát patřící do skupiny esterů kyseliny ftalové (průmyslově vyráběné oxidací a následnou hydrolýzou z naftalenu) byl kompletně degradován po 6-ti denní kultivaci s houbou *T. versicolor* (LEE *et al.* 2004). Souběžně s degradací této chemikálie byla odstraňována i její endokrinní aktivita.

3.2.2. Lakasa (benzodiol: oxygen oxidoreductasa, EC 1.10.3.2.)

3.2.2.1. Obecná charakteristika enzymu

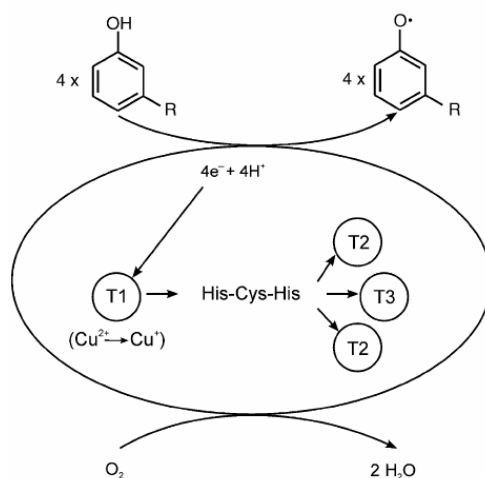
Lakasa je enzym typu měď-obsahující polyfenolické oxidasy (jejich katalytické centrum obsahuje atomy mědi), který byl poprvé objeven v míze japonského stromu *Rhus vernicifera* (YOSHIDA 1883) a následně potvrzen i u hub (BERTRAND 1896,). Tento enzym byl prokázán také v bakteriální říši (CLAUS 2003, HOEGGER *et al.* 2006) a izolován byl i z kvasinky *Cryptococcus neoformans* (WILLIAMSON 1994). U hub je lakasa nejvíce rozšířeným exoenzymem (LEONOWICZ *et al.* 2001, BALDRIAN 2006).

Lakasa hub bílé hniloby patří do skupiny modrých multiměďnatých oxidas, do které patří dále například i rostlinné askorbové oxidázy nebo živočišný ceruloplasmin (FREEMAN *et al.* 1993, HOEGGER *et al.* 2006). Tyto enzymy mají sice podobné molekulární uspořádání aktivních míst a charakteristické vlastnosti, ale pouze lakasa se může přímo účastnit biokatalýzy degradace ligninu (POLYAKOV *et al.* 2009). Jedná se o extracelulární enzym, který byl ovšem v malém množství nalezen i intracelulárně. Po růstu houby *Trametes versicolor* na glukosovém médiu byla izolována extracelulární forma lakasy (98 %), tak i intracelulární enzym (2 %) (SCHLOSSER *et al.* 1997). V některých pracech byla potvrzena souvislost mezi lakasou a buněčnou stěnou, kde byla lakasa lokalizována (ZHU *et al.* 2001, SVOBODOVÁ *et al.* 2008). Typická lakasa má izoelektrický bod okolo pH 4,0 a molekulovou hmotnost 60-80 kDa, z nichž asi 15-45 %

zaujímají glykosylované části, které se k polypeptidovému řetězci vážou především na jeho N-konec (THURSTON 1994, SHLEEV *et al.* 2003). Lakasy jsou silná oxidační činidla s průměrnými hodnotami E_0 v rozmezí 450-480 mV (XU *et al.* 2000). Bylo prokázáno, že některé lakasy se vyskytují také ve formě dimerů či i vícemerních celků (REHMAN 1991).

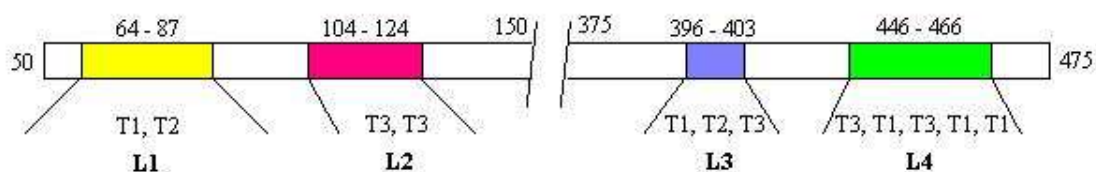
Katalýza u všech druhů lakas je prováděna za pomoci měďnatých center v molekule enzymu. Katalytické centrum enzymu obsahuje typicky čtyři atomy mědi v iontovém stavu Cu^{2+} (THURSTON 1994). První měďnaté jádro (T1) je tvořeno jedním atomem mědi a představuje funkční místo enzymu, které má schopnost absorpce světla o vlnové délce 600 nm, což lakase dává charakteristickou modrou barvu (BENTO *et al.* 2005). T1 jádro funguje jako primární elektronový akceptor z redukujících sloučenin. Druhé centrum enzymu je tříatomové a je složeno z jednoatomového jádra T2 a dvouatomového jádra T3. Tato jádra jsou zodpovědná za čtyř-elektronovou redukci molekulárního kyslíku na vodu (BERTRAND *et al.* 2002). Jak T1 tak i T2 jsou aktivní při jejich pozorování za pomoci elektronové paramagnetické rezonance, ovšem T3 není touto metodou detekovatelné kvůli silným antiferromagnetickým interakcím (BENTO *et al.* 2005).

V katalytickém cyklu (Obr. 2) tedy lakasa redukuje kyslík na vodu ve spojení s oxidací substrátu (LEONOWICZ *et al.* 2001). Oxidace substrátu lakasou je jedno-elektronová reakce, která generuje volný radikál a iniciační produkt, který je typicky silně nestabilní a může podléhat druhé enzymaticky katalyzované oxidaci, jako i neenzymatickým procesům, jako je hydratace nebo disproportionálizace. Může být také polymerován v procesech vytvářejících amorfni nerozpustné melaninu podobné produkty (REINHAMMAR a MALSTROM 1981). Jelikož je jedno-elektronová substrátová oxidace spojena se čtyř-elektronovou redukcí kyslíku, tak není možné, aby byl reakční mechanismus jen přímočarý a je podrobován hlubší analýze. V jistém smyslu musí lakasa operovat jako „baterie“ uchovávající elektrony z jednotlivých oxidačních reakcí za účelem redukce molekulárního kyslíku (THURSTON 1994).



Obr. 2 Katalytický cyklus lakasy (BALDRIAN 2006)

V proteinové struktuře enzymu lakasy se nachází čtyři konzervované úseky v místech, kde se nalézá jeden cysteinový a deset histidinových zbytků zapojených ve vazbě atomů mědi (Obr. 3). Také jsou konzervované či semi-konzervované čtyři části proteinu, které jsou odpovědné za vazbu substrátu k enzymu a nalézají se mezi konzervovanými ligandy mědi (THURSTON 1994, LARRONDO *et al.* 2003). Obdobně jsou konzervovány i části genu kódující tyto části proteinu (KUMAR *et al.* 2003). Dále bylo prokázáno, že existují ještě další částečně zakonzervované sekvence, které mají podobný konformační sklon nebo hydrolytický index. Předpokladem je, že tyto zbytky slouží k udržení tří-dimenzionálního uspořádání enzymu (KUMAR *et al.* 2003).



Obr. 3 Konzervované úseky v proteinové struktuře houbových lakas (KUMAR *et al.* 2003). Uvedená čísla značí pozice aminokyselin.

T1, T2, T3 – pozice aminokyselin (His a Cys) účastnících se vazby jednotlivých měďnatých jader

L1, L2, L3, L4 – 4 konzervované sekvenční regiony obdávající aminokyseliny pro vazbu Cu^{2+} iontů

Přirozeným substrátem lakas je lignin (lignin je houbou kometabolizován, jeho rozklad je součástí sekundárního metabolismu hub a slouží k zpřístupnění jiných živin), což je heterogenní polyfenolický biopolymer sestávající ze tří základních jednotek, které jsou v molekule velmi nepravidelně uspořádány. Proto musí mít lakasa širokou substrátovou specifitu a je díky tomu schopna oxidovat i jiné fenolické látky (ARGYROPOULOS a MANECHEM 1997). Mohou to být například fenoly, polyfenoly a aromatické aminy, stejně jako nefenolické organické substráty. Lakasy odjímají substrátu jeden elektron, což má za následek formování reaktivních radikálů podstupujících další depolymerizaci, repolymerizaci, demethylaci nebo tvorbu chinonů. Dost široké substrátové spektrum lakas může být ještě rozšířeno na další nefenolické sloučeniny přidáním malých molekulárních redoxních mediátorů (JOHANNES a MAJCHERCZYK 2000). Nejstudovanějšími mediátory jsou ABTS a HBT (BOURBONNAIS *et al.* 1995, TORRES *et al.* 2003). V průběhu posledních let byla lakasa zkoumána především jako enzym hub bílé hniloby, který je schopen enzymatické degradace organických xenobiotik (WONG a YU 1999, DURAN a ESPOSITO 2000, LEONOWICZ 2001, CLAUS *et al.* 2002).

Některé druhy hub produkují široké spektrum izoenzymů lakasy. Například *Pleurotus ostreatus* produkuje alespoň 8 různých forem (PALMIERI *et al.* 2003), přičemž u další houby *Coprinopsis cinerea* bylo po sekvenaci nalezeno 17 genů kódujících lakasu (KILARU *et al.* 2006a). Produkce těchto izoenzymů je regulována například přítomností mědi v kultivačním médiu (KILARU *et al.* 2006b). Tím, že některé houby produkují izoenzymy o stejném K_M a k_{cat} bylo prokázáno, že u dikaryotních dřevokazných hub je za produkci izoenzymů zodpovědná z velké části hlavně alelická variabilita a to více než jejich evoluční adaptace na speciální požadavky houby (BALDRIAN 2006). Ektomykorhizní houby vykazují obecně nižší variabilitu v genech pro lakasu než saprofytické houby, což je dle předpokladů způsobeno tím, že většinu jejich uhlíku ve formě jednoduchých cukrů získávají od hostitelské rostliny, a proto je široká diversita lakas méně nezbytná (LUIS *et al.* 2004).

Lakasa ovšem neplní svou roli pouze v ligninolýze a biodegradacích. Enzym má funkci taky ve fázi houbového růstu. Pomáhá chránit mycelium před produkty ostatních hub, které by mohly poškodit hyfu, jejich degradací (BES *et al.* 1987). U houby *Aspergillus nidulans* zodpovídá za zelenou barvu konidií (CLUTTERB 1972).

Napomáhá dále například při tvorbě rhizomorfů u *Armillaria mellea* (WORRELL *et al.* 1986). Účastní se taky vývoje plodnice houby *Agaricus bisporus* nebo *Schizophyllum commune*, kde napomáhá zpevňování této struktury (THURSTON 1994). Může být také využívána jako ochranný enzym účastnící se patogenních procesů (BAR-NUN a MAYER 1990). Lakasy saprofytických a mykorhizních hub jsou také zapojeny v koloběhu půdního organického materiálu, to znamená, že rozkládají půdní odpadní polymery na humusové sloučeniny (IAKOVLEV a STENLID 2000, BURKE a CAIRNEY 2002).

3.2.2.2. Lakasa *T. versicolor*

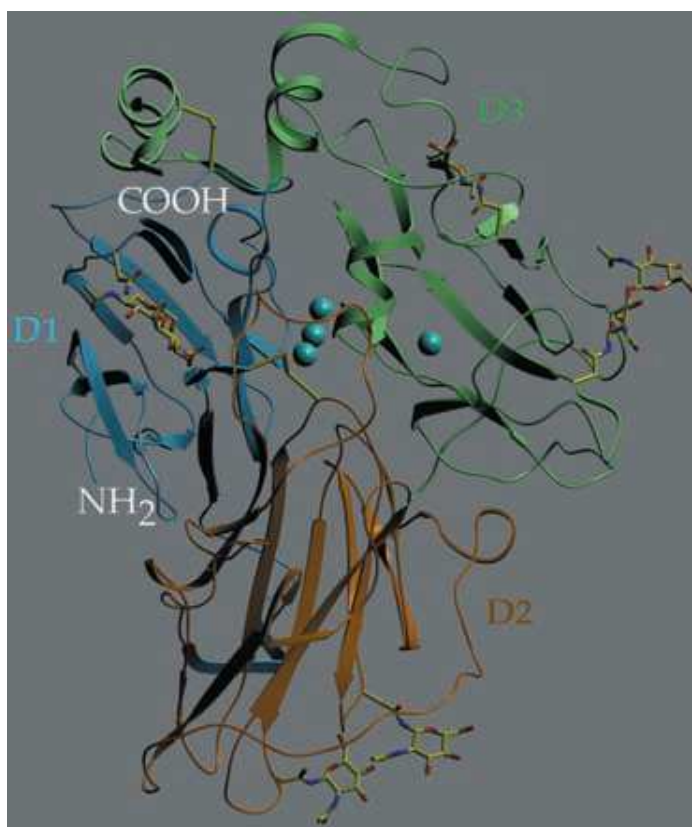
Nejčastěji dosud používané kritérium pro klasifikaci lakas *T. versicolor* je hodnota isoelektrického bodu pI , kdy jsou rozeznávány dvě skupiny lakas na základě jejich chromatografických vlastností (MOLDES *et al.* 2004). S využitím fylogenetické analýzy dosud publikovaných sekvencí lakas *T. versicolor* a svých výsledků NECOCHEA *et al.* (2005) ve své práci navrhla novou nomenklaturu lakas této houby, kdy jsou rozeznávány čtyři hlavní skupiny isoenzymů α , β , δ a γ .

FUJIIHIRO *et al.* (2009) ve své práci zabývající se degradací PCB látek pomocí lakas nedávno popsal, že *T. versicolor* produkoval 2 skupiny lakas, které byly charakteristické přítomností několika izoform enzymu o isoelektrickém bodu v rozmezí 5,0 - 6,0 (skupina 1), respektive 3,0 - 4,0 (skupina 2). Bylo také prokázáno, že lakasy skupiny 1 mají mnohem lepší oxidační vlastnosti než enzymy skupiny 2. Molekulová hmotnost enzymů byla kolem 55 kDa.

Struktura lakasy *T. versicolor*, stejně jako dalších měďnatých oxidas, byla studována již dříve a data získaná pomocí X-ray metod byla nedávno shrnuta v práci ZHUKHLISTOVA *et al.* (2008). PIONTEK *et al.* (2002) pak popsal krystalickou strukturu *T. versicolor* lakasy v její oxidované formě s plným obsahem mědi v molekule (Obr. 4). Jedná se o monomerní strukturu organizovanou do tří domén a o rozměrech přibližně 65 x 55 x 45 Å. Každá ze tří domén má obdobnou architekturu příbuznou malým modrým měďnatým proteinům jako jsou azurin nebo plastocyanin. Domény se skládají ze skládaných beta-listů a helixů. Helixy spojují jednotlivé otáčky beta-listů a domény 2 a 3. Doména tři pak svou strukturou tvoří místo, kde je vázáno T1 měďnaté jádro enzymu.

Tříjaderné měďnaté centrum (T2/T3) je umístěno mezi doménami 1 a 3 s tím, že obě domény obsahují aminokyselinové zbytky funkční v koordinační vazbě měďnatých iontů. Helix na C-konci molekuly je stabilizován disulfidickou vazbou s doménou 1 (Cys 85 – Cys 488). Druhý disulfidický můstek spojuje domény 1 a 2 (Cys 117 – Cys 205). Jak N-konečné, tak C- konečné aminokyseliny v proteinu jsou pak dále stabilizovány sítí vodíkových vazeb v molekule (PIONTEK *et al.* 2002).

Lakasa *T. versicolor* sloužila jako model i ve studii struktury lakasy *Trametes hirsuta* pomocí metody molekulární výměny (POLYAKOV *et al.* 2009), protože má 80% shodných znaků jako cílový enzym *T. hirsuta*.



Obr. 4 Struktura lakasy *T. versicolor*. Jednotlivé domény jsou označeny D1, D2, D3. Atomy Cu jsou vyznačeny jako tyrkysové body uprostřed struktury (PIONTEK *et al.* 2002).

3.2.3. Vliv organických znečištění na houbové biodegradující organismy a na produkci houbových enzymů

V posledních letech byla věnována velká pozornost ovlivnění produkce ligninolytických enzymů za přítomnosti organických polutantů a mediátorů reakce (TERRON *et al.* 2004, XIAO *et al.* 2004). Bylo prokázáno, že v přítomnosti přidaných mediátorů či polutantů houby produkují jiné izoformy studovaných enzymů. Příkladem může být studie ŠUŠLA a SVOBODOVÁ (2008), kde přítomnost Mn^{2+} indukovala v houbě *Irpex lacteus* produkci až 2 nových izoform enzymu MnP. Přítomnost organických barviv v kulturách stimulovala produkci izoform s vyšší hodnotou pI, které byly prokázány i jako lepší dekolorizanty barviv (ŠUŠLA a SVOBODOVÁ 2008). Produkce odlišných izoform enzymu lakasy v přítomnosti polutantu byla prokázána i v případě houby *Pleurotus pulmonarius*, kde kultury indukované kyselinou ferulovou produkovaly, stanovováno dle pI, o 1 izoformu enzymu víc (DE SOUZA *et al.* 2004). Ke stejnému výsledku dospěl TERRON *et al.* (2004), kde byla studovaná houba *T. versicolor* také kultivována s kyselinou ferulovou a dále ještě s kyselinou *p*-kumarovou, guaikolem a *p*-methoxyfenolem. V případě kyselin došlo k indukci transkripce všech tří sledovaných genů pro lakasu, obě další látky indukovaly transkripci pouze dvou z nich. Tento výsledek také dokládá rozdílnou stimulaci organismu, která je závislá na struktuře daného induktoru, přičemž látky podobné skladby vykazovaly stejný indukční efekt oproti strukturně nepodobným chemikáliím (TERRON *et al.* 2004). Ovšem práce GNANAMANI *et al.* (2006) ukázala na kultuře *P. chrysosporium*, že přítomnost polutantů (cykloheximid, guaokol) může mít vliv pouze na zvýšenou produkci enzymu, ovšem ne na jeho izoformové složení.

Ve starší práci se BOURBONNAIS *et al.* (1995) zabýval komplexní studií enzymu lakasy u *T. versicolor* při indukci 2,5-xyloidinem. Po indukci polutantem vzrostla hladina aktivního enzymu na 5x vyšší úroveň. Z této kultury byly poté vyizolovány dvě izoformy lakasy, kdy lakasa I byla exprimována 6x více. Tyto enzymy ovšem samy o sobě neměly schopnost degradovat sulfátovou buničinu, kterou se jim podařilo rozložit až po přidání mediátoru ABTS. Účinějším enzymem v tomto procesu byla lakasa II (BOURBONNAIS *et al.* 1995).

Přidání mediátorů do reakce může mít za následek i změny na transkripční úrovni, kdy dochází k indukci transkripce genů pro daný enzym (SAPARRAT *et al.* 2010). Příkladem je přidání iontů Cu^{2+} nebo kyseliny syringové ke kultuře *Coriolopsis rigida*, které mělo za následek až 23x zvýšenou produkci genu *lac1* u této kultury, zatímco efekt na *lac2* a *lac3* geny byl minimální (SAPARRAT *et al.* 2010). Indukční efekt na transkripci genu pro lakasu *Phlebia tremellosa* (v pokusu použity bakteriální transformanty s plasmidově lokalizovaným inkorporovaným genem pro lakasu *P. tremellosa*) byl pozorován při kultivaci s polutanty benzylbutylfthalátem a dietylfthalátem. V tomto případě došlo až ke 110 % indukci transkripce genu (KUM *et al.* 2009). Lakasová cDNA z této kultury vykazuje 64,8 % identitu s *T. versicolor* (YEO *et al.* 2007).

Práce XIAO *et al.* (2006) studovala vliv aromatických sloučenin (*o*-toluidin, 3,5-dihydroxytoluen) na expresi genů pro lakasu (geny *lacA*, *lacB*, *lacC*) *Trametes sp.* AH28-2. *LacA* byl indukován oběma testovanými látkami, *lacB* byl signifikantně indukován 3,5-dihydroxytoluenem a *lacC* se transkriboval za všech podmínek v prakticky nedetekovatelném množství. Práce ukázala, že tato odlišná exprese genů nejspíše souvisí s jejich rozdílností v promotorech. Studována zde byla také sekvenční podobnost jednotlivých genů pro lakasu, přičemž *lacA* gen vykazuje 90,8 % identitu s *lac1 T. versicolor* a podobně *lacB* vykazuje 85 % strukturní podobnost s *lac3 T. versicolor* (XIAO *et al.* 2006).

Vliv bisfenolu A na produkci ligninolytických enzymů u houby *T. versicolor* studoval TAKAMIYA *et al.* (2008). V přítomnosti polutantu došlo k silné indukci transkripce příslušných genů. Nejvyšší indukce nastala u genu pro enzym LiP, který byl transkribován 10x více než u kontrolní kultury. Gen pro lakasu byl transkribován 2,3x více. U genu pro MnP ovšem došlo k represí transkripce (TAKAMIYA *et al.* 2008). Vysvětlením může být to, že všechny tyto enzymy spadají do stejné genové rodiny a podléhají tak komplexní regulaci, která umožňuje rozdílnou transkripci forem LME (HIRANO *et al.* 2000).

Silný vliv fenolických látek na transkripci genů pro lakasu byl pozorován v práci GOUDOPOULOU *et al.* (2010), kde bylo kvantifikováno a porovnáváno množství transkribovaných izoform genů pro lakasu houby *P. ostreatus* na komplexním médiu a na médiu s odpadem z výroby olivového oleje (OMW), který obsahuje velké množství

fenolických látek (od monomerních až po polymerní). Prvním sledovaným genem byl *pox2*, který byl nejvíce transkribován po 21 dnech kultivace, kdy byl exprimován 12x více v OMW médiu než v kontrolní kultuře. Podobně to bylo u genu *poxa1b*, který byl nejvíce přepisován po 14-ti dnech a to 7x více než v kontrole, *poxa3* byl nejvíce exprimován na začátku kultivace (den 10), kdy testovaná kultura vykazala 19x vyšší transkripci tohoto genu. Posledními sledovanými geny byly geny *sspoxa3a* a *sspoxa3b*, které tvoří podjednotky enzymu POXA3. Oproti ostatním enzymům se tolik neprojevil indukční efekt fenolických látek v médiu a jejich transkripce byla zvýšená pouze mírně. Tyto výsledky ukazují, že transkripce jednotlivých genů je regulována odlišně v průběhu degradace OMW, dle aktuálního složení fenolů ve směsi (GOUDOPOULOU *et al.* 2010).

3.3. Endokrinní disruptory (ED)

3.3.1. ED a jejich mechanismus účinku

ED jsou chemikálie, které narušují hormonální signály u zvířat a člověka a mají ireversibilní nežádoucí efekt na vývoj reprodukčních orgánů a jejich správnou funkci. Účinkují jako hormony v endokrinním systému a narušují fyziologické funkce endogenních hormonů. V závislosti na charakteru látky mohou blokovat receptory hormonů, napodobují funkci přirozených hormonů nebo ovlivňují syntézu hormonů na transkripční nebo translační úrovni (TYLER *et al.* 1998). Mezi tyto látky jsou mimo PCB řazeny například 17 α -ethynilestradiol, nonylfenol, bisfenol A nebo pesticidy (CABANA *et al.* 2007).

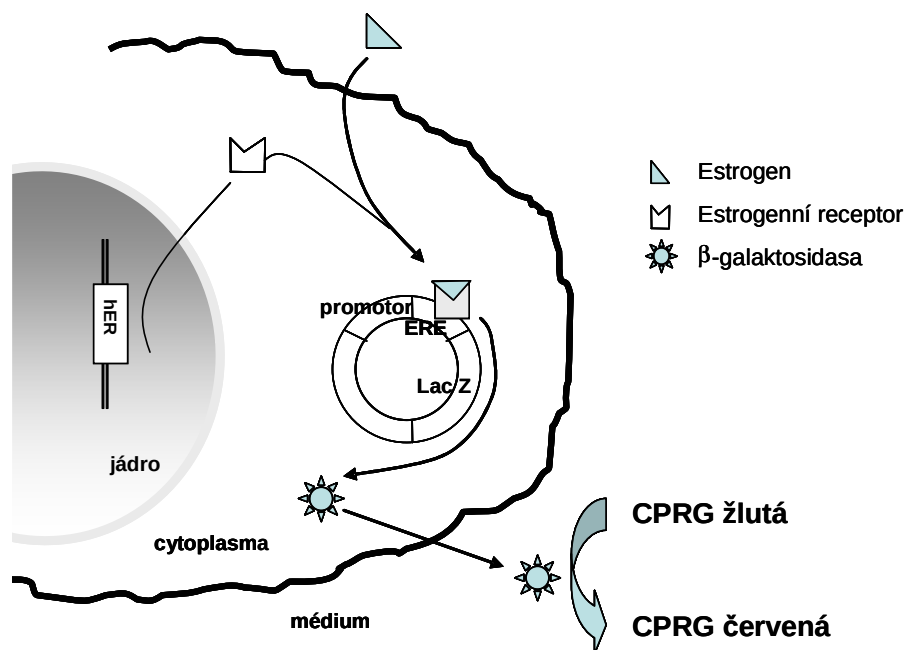
V případě ovlivnění aktivity estrogenního receptoru je účinek ED vysvětlován nedostatečnou specifitou ligand-vazebné části estrogenního receptoru. Estrogenní receptor je jedním z intracelulárních steroidních receptorů, který reguluje transkripci cílových genů po aktivaci vazbou ligandu - estrogenu. Tyto aktivované transkripční modulátory se vážou na specifické sekvence DNA v regulačních oblastech cílových genů. Přirozený ligand 17 β -estradiol se na receptor váže fenolickou hydrofóbní částí své molekuly, avšak dutina

pro vazbu hydrofóbní části molekuly je dvakrát větší než hydrofóbní část 17 β -estradiolu, což umožňuje i jiným větším molekulám, aby se vázaly na receptor a aktivovaly transkripci řízených genů (BRZOZOWSKI *et al.* 1997). Tato schopnost ovlivňovat aktivitu estrogenního receptoru byla nově zjištěna například u chlorovaných pesticidů (LI *et al.* 2008, MCKINLAY *et al.* 2008) nebo herbicidů (GASNIER *et al.* 2009). Obdobný mechanismus účinku byl popsán i u látek s androgenními efekty (TAMURA *et al.* 2008), mezi které patří například také některé pesticidy (XU *et al.* 2008).

3.3.2. *In vitro* testy pro stanovení hormonální aktivity látek

Schopnost ED ovlivňovat transaktivační aktivitu hormonálních receptorů se stala jedním z nástrojů pro vývoj *in vitro* testů pro stanovení (anti)hormonální aktivity chemických látek. V posledních letech byla vytvořena řada genově reportérových systémů pro studium aktivity látek vůči různým lidským i zvířecím hormonálním receptorům (SVOBODOVÁ a CAJTHAML 2010).

První *in vitro* kvasinkový systém pro detekci estrogenních látek (Obr. 5) byl vyvinut v práci ROUTLEDGE a SUMPTER (1996). Do kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* byl vložen gen pro lidský estrogenní receptor a β -galactosidasu, jejíž produkce je řízena estrogenním receptorem. V odpověď na přítomnost estrogenní látky tak kvasinka produkuje β -galaktosidasu, jejíž aktivita je detekována na základě reakce s chromogenním substrátem v mediu. Tento původní test byl dále vylepšen a byla zvýšena jeho citlivost využitím jiných reportérových systémů, jako například luciferásu kódujících konstruktů či GFP reportéru, a utilizací řady různých hormonálních receptorů (SVOBODOVÁ a CAJTHAML 2010).



Obr. 5 Schéma estrogenem indukované exprese β -galaktosidázy. (SVOBODOVÁ a CAJTHAML 2010). Gen pro lidský estrogenní receptor je integrovaný v DNA a kontinuálně přepisovaný. Receptor je schopný vazby na ERE hybridní promotor reportérového genu na plasmidu. Při aktivaci receptoru látkou estrogeního charakteru je souběžně spuštěna exprese β -galaktosidázy, která je následně sekretována do média, kde metabolizuje chromogenní substrát CPRG, čímž se mění hodnoty naměřené absorbance tohoto média.

Tyto testy pak našly uplatnění jak pro hodnocení hormonální aktivity čistých látek, tak environmentálních vzorků, jako například vody po úpravě v čistírnách odpadních vod, říčních či mořských sedimentů. Jsou i nástrojem pro sledování a hodnocení účinnosti biodegradačních procesů. Problémy s využitím těchto testů pro environmentální vzorky byly shrnuty v review SVOBODOVÁ a CAJTHAML (2010).

3.3.3. Biodegradace ED

Obdobně jako v případě PCB látek je degradace ED látek studována především u bakterií a hub. Biodegradace 17 α -ethinylestradiolu (EE2), syntetického derivátu estradiolu, pomocí různých organismů byla shrnuta v práci CAJTHAML *et al.* (2009). Bakteriemi je tato látka degradována lépe za aerobních podmínek, než anaerobně. Diskutována je především role NH₄⁺ oxidujících bakterií. Degradální potenciál bakterií potvrzuje například i práce WANG a LUO (2005), kde bakterie patřící k rodu *Pseudomonas* degradovala dibutylftalát s úspěšností 95 % (koncentrace polutantu 200 mg/l, doba kultivace 32 hodin).

Degradace EE2 ligninolytickými houbami je pak spojována s jejich extracelulárními enzymy, jak ukazuje práce BLÁNQUEZ a GUIEYSSE (2007), kde bylo při *in vitro* pokusu s houbou *T. versicolor* degradováno 95 % původního množství EE2. Důkaz podílu ligninolytických enzymů na mechanismu degradace této látky poskytla také práce AURIOL *et al.* (2007), kde byla k degradaci EE2 použita čistá lakasa *T. versicolor* (15 U/l, koncentrace EE2 100 ng/l), která prokázala 100% degradační efektivitu už po 1 hodině inkubace s EE2 (AURIOL *et al.* 2007).

V práci TSUTSUMI *et al.* (2001) byl studován vliv MnP a lakasy na degradaci bisfenolu A a nonylfenolu, jež vykazují estrogení aktivitu. MnP vyizolovaná z houby *P. chrysosporium* a lakasa houby *T. versicolor* podpořená mediátorem HBT byly schopné degradovat oba polutanty až na nedetekovatelnou úroveň. Byl stanoven také úbytek estrogení aktivity látek, který činil u bisfenolu A 60 % a 80 % po 1 hodinové inkubaci s MnP, respektive lakasa-HBT systémem. Po 3 hodinách inkubace nonylfenolu s enzymy byl úbytek aktivity 40 % a 80 % po ošetření pomocí MnP, lakasa-HBT systému (TSUTSUMI *et al.* 2001).

Potenciál houby *T. versicolor* a dalších hub bílé hniloby pro biodegradaci ED látek a odstraňování jejich endokrinní aktivity je shrnut v review CABANA *et al.* (2007).

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Organismy

Houbová kultura *Trametes versicolor* 167/93 byla získána ze sbírky CCBAS (Mikrobiologický ústav Akademie věd České republiky, ČR). Houba byla udržována na agarových plotnách (1% glukosa, 0,5% malt extrakt, 2% agar) a uchovávána při 4°C.

Pro stanovení hormonální aktivity látek byly používány následující kvasinkové kultury *Sacharomyces cerevisiae*:

- a. *S. cerevisiae* hER α , popsáný v práci ROUTLEDGE a SUMPTER (1996)
- b. *S. cerevisiae* BMAEReluc/ER α , popsáný v práci LESKINEN *et al.* (2005)
- c. *S. cerevisiae* BMAAREluc/AR, popsáný v práci LESKINEN *et al.* (2005)
- d. *S. cerevisiae* BMA64luc, popsáný v práci LESKINEN *et al.* (2005)

Kmen a. byl získán ze sbírky laboratoře molekulární buněčné fyziologie a endokrinologie Technologické university Drážďany (Německo). Kmeny b. - d. byly získány ze sbírky oddělení Biotechnologie, Universita Turku (Finsko). Kvasinky byly dlouhodobě uchovávány v příslušném mediu (a. MMAUT, b.-d. SMD; viz kapitola 4.4.) obsahujícím 15% glycerol při -80 °C.

4.2. Chemikálie

2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid)diammonium salt (~98%) (ABTS)	Sigma - Aldrich (Německo)
2,6-Dimethoxyphenol (purum >97%) (DMP)	Sigma - Aldrich (Německo)
3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid (MOPS)	Sigma - Aldrich (Německo)
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -galactoside (X-gal)	Sigma - Aldrich (Německo)
6x Orange loading dye solution	FINNZYMES (Finsko)
Amonium persulfát (APS)	Sigma - Aldrich (Německo)

Chlorbenzoové kyseliny (ClBA): 2-ClBA, 3-ClBA, 4-ClBA, 2,3-ClBA, 2,4-ClBA, 2,5-ClBA, 2,6-ClBA, 3,4-ClBA, 3,5-ClBA, 2,3,5-ClBA, 2,3,6-ClBA, 2,4,6-ClBA	Sigma - Aldrich (Německo)
Chlorofenol red- β -D-galactopyranosid (CPRG, $\geq 90\%$, pro HPLC)	Sigma - Aldrich (Německo)
Chlorfenoly (ClP): 2-ClP, 3-ClP, 4-ClP, 2,3-ClP, 2,4-ClP, 2,5-ClP, 2,6-ClP, 2,3,5-ClP, 2,4,5-ClP, 2,4,6-ClP, 2,3,4,5-ClP, 2,3,4,6-ClP	Sigma - Aldrich (Německo)
Delor 103	CHEMKO Strážské (Slovensko)
Diethyl dicarbonate (DEPC) $\geq 97\%$	Sigma - Aldrich (Německo)
D-luciferin (synthetic)	Sigma - Aldrich (Německo)
DNase I (koncentrace)	Sigma - Aldrich (Německo)
dNTP Mix (koncentrace)	FINNZYMES (Finsko)
DyNAnzyme II DNA polymerasa (koncentrace)	FINNZYMES (Finsko)
Ethidium bromid (EtBr)	Merk (Německo)
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma - Aldrich (Německo)
Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)	Sigma - Aldrich (Německo)
MLV Rnase H- transkriptáza (koncentrace)	Sigma - Aldrich (Německo)
O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	Fermentas LifeSci.(Německo)
pMOSBlue Blunt Ended Cloning Kit	GE Healthcare UK Limited (Velká Británie)
Random hexamer primer	Sigma - Aldrich (Německo)
Riblock inhibitor	Sigma - Aldrich (Německo)
RNase A (koncentrace)	Sigma - Aldrich (Německo)
Power SYBR Green PCR Master mix	Applied Biosystems (USA)
TEMED	Roth (Německo)
Reactive Orange 16 (obsah barviva $\sim 50\%$) (RO16)	Sigma - Aldrich (Německo)
Remazol Brilliant Blue R (obsah barviva $\sim 55\%$) (RBBR)	Sigma - Aldrich (Německo)
17 β estradiol (E2, 98%)	Sigma - Aldrich (Německo)
Testosteron (99%, pro HPLC)	Sigma - Aldrich (Německo)
Azure B ($\geq 89\%$)	Sigma – Aldrich (Německo)
Copper(II) phthalocyanine- tetrasulfonic acid tetrasodium salt (CuP) (obsah barviva $\sim 50\%$)	Sigma – Aldrich (Německo)

Ostatní použité chemikálie byly ve standardní p.a. čistotě.

4.3. Sterilizace

Pokud není uvedeno jinak, sterilizace probíhala autoklávováním po dobu 25 minut při 121 °C pod přetlakem 0,15 kPa. Sterilizace filtrací byla prováděna pomocí PVDF filtru (velikost pórů 0,2 µm).

4.4. Kultivační média

Všechna média byla v případě potřeby doplněna o agar v koncentraci 20 g/l. pH médií bylo upravováno podle potřeby pomocí 3 M NaOH a 3 M HCl.

4.4.1. Dusíkem limitované médium – MM, dle TIEN a KIRK (1988), pH = 4,5

A. Basal III (hodnoty na 1 l)

KH ₂ PO ₄	20,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5,0 g
CaCl ₂	1,0 g
Stopové prvky	100 ml
dH ₂ O	do 1 l

B. Stopové prvky (hodnoty na 1 l)

MgSO ₄	3,0 g
MnSO ₄	0,5 g
NaCl	1,0 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
CoCl ₂	0,1 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,0 g
CaCl ₂	0,1 g
H ₃ BO ₃	10 mg
NTA	1,5 g
dH ₂ O	do 1 l

C. Medium (hodnoty na 1 l)

Glukosa	10 g
Basal III.	100 ml
2,2-dimethylsukcinát	1,46 g
Thiamin	1,0 g
Vínan amonný	0,1 g
Stopové prvky	60 ml
dH ₂ O	do 1 l

4.4.2. Malt extrakt glukózové médium – MEG (hodnoty na 1l)

Malt extrakt Broth	5 g
Glukosa	10 g
dH ₂ O	do 1l

4.4.3. Minimální kvasinkové médium – MMAUT (hodnoty na 1l)

A. Minimal medium (hodnoty na 1l)

- KH ₂ PO ₄	13,61 g
- (NH ₄) ₂ SO ₄	1,98 g
- KOH	4,2 g
- MgSO ₄	0,2 g
- Fe ₂ (SO ₄) ₃ (40mg/50ml)	1 ml
- Leucin	50 mg
- Histidin	50 mg
- Adenin	50 mg
- Argin·HCl	20 mg
- Methionin	20 mg
- Tyrozin	30 mg
- Isoleucin	30 mg
- Lysin·HCl	30 mg
- Fenylalanin	25 mg
- Glutamová kyselina	100 mg
- Valin	150 mg
- Serin	375 mg
- dH ₂ O	do 1 l

B. Vitamínový roztok, sterilizováno filtrací.

- Thiamin	8 mg
- Pyridoxin	8 mg
- Panthotenová kyselina	8 mg
- Inositol	40 mg
- Biotin (2 mg/100 ml)	20 ml
- dH ₂ O	180 ml

C. Roztok Chlorofenol red-β-D-galactopyranosidu (CPRG) (hodnoty na 1l),
rozpuštěno ve sterilní dH₂O.

- CPRG	10 g
- dH ₂ O	do 1 l

D. Médium MMAUT (hodnoty na 52,275 ml), médium připravováno ze sterilních
roztoků

- Glukosa (200 g/l)	5 ml
- L-asparágová kys.(4 g/l)	1,25 ml
- Vitamínový roztok	0,5 ml sterilizováno filtrací
- L-threonin (24 g/l)	0,4 ml
- CuSO ₄ .5H ₂ O (4,994 g/l)	0,125 ml sterilizováno filtrací
- Minimální médium	45 ml

4.4.4. Syntetické minimální médium - SMD (hodnoty na 1 l), příprava ze sterilních
komponent (roztoky dusíkaté báze a glukosy sterilizovány autoklávováním, zbytek
komponent sterilizován filtrací)

- Dusíkatá báze (6,7 g/l)	910 ml
- Roztok glukosy (400 g/l)	50 ml
- Histidin (2 g/l)	10 ml
- Adenin hemisulfát (5 g/l)	10 ml
- Leucin (10 g/l)	10 ml
- Tryptofan (2 g/l)	10 ml

4.4.5. LB médium - LB, (hodnoty na 1 l), pH = 7

- Trypton	10 g
- Yeast extrakt	5 g
- NaCl	5 g
- NaOH (1 M)	0,4 ml
- dH ₂ O	do 1 l
po autoklávování přidán ampicilin	50ug/ml

pro modro-bílou selekci transformantů bylo do LB media přidáno:

- IPTG	0,0024 g/l
- X gal	0,02 g/l
- agar	20 g/l

4.5. Pufry

4.5.5. Sodno-citrátový pufr - SC, (hodnoty na 1 l), pH = 5

- Citrát trisodný (58,82 g/l)	350 ml
- Kyselina citrónová (38,426 g/l)	650 ml

4.5.6. TAE pufr (pH=8,5):

- Tris	242,0 g
- EDTA	37,2 g
- dH ₂ O	do 1 l

4.5.7. TE pufr (pH=8)

- Tris	12,11 g
- EDTA	3,72 g

4.5.8. DEPC dH₂O (dH₂O byla nejprve smíchána s DEPC, ponechána přes noc při pokojové teplotě a poté zautoklávována.)

- DEPC	1 ml
- dH ₂ O	do 1 l

4.6. Kultivace houbových kultur v tekutém médiu

Prekultury byly připraveny v 250 ml Erlenmayerových baňkách s 20 ml média a zaočkovány dvěma terčíky houby (o průměru 8 mm) ze zásobní kultury rostoucí na agarových plonách. Tyto prekultury byly inkubovány po 7 dní ve 28 °C a byly homogenizovány 1 min. přístrojem Ultra-Turrax T25 (Janke & Kukel, IKA-Labortechnik, Německo) za sterilních podmínek.

Kultivace kultur probíhaly v 250 ml Erlenmayerových baňkách s 20 ml média, do kterých byl přidán 1 ml homogenizovaného inokula (5% v/v). Kultury byly inkubovány stacionárně při 28 °C.

Chemické látky byly do kultur přidávány v následujících koncentracích:

Delor 103	10 mg/l
směs chlorbenzoových kyselin	5 mg/l
směs chlorfenolů	5 mg/l

U chlorfenolů (ClP) a chlorbenzoových kyselin (ClBA) se jednalo o směs těchto látek:

Chlorphenoly: 2- ClP; 3- ClP; 2,3- ClP; 2,4- ClP; 2,5- ClP; 2,6- ClP; 2,4,5- ClP

Chlorbenzoové kyseliny: 2- ClBA; 3- ClBA; 4- ClBA; 2,3- ClBA; 2,4- ClBA; 2,5- ClBA; 2,6- ClBA; 3,4- ClBA; 3,5- ClBA; 2,3,5- ClBA; 2,3,6- ClBA; 2,4,6- ClBA

Chemikálie byly rozpuštěny v DMSO (99,5%, pro GC). Zásobní směs ClP a ClBA obsahovala vždy 2000 mg/l každé složky; výsledná koncentrace každé složky směsi v kulturách byla 5 mg/l. Delor 103 byl do kultur přidáván ze zásobního roztoku o koncentraci 2000 mg/l připraveného v DMSO (99,5%, pro GC).

Doba kultivace a přidání testovaných látek byly závislé na typu pokusu. Použity byly dva typy:

- A. Kultivace 12 dní. Delor 103 přidán první den kultivace; ClBA, ClP přidány třetí den. Kultivace probíhala 12 dní. Vzorky na analýzu enzymatických aktivit (80 μ l / odběr) odebírány 1., 3., 5., 8., 10., a 12. den kultivace.
- B. Kultivace 23 dní. Všechny chemikálie přidávány 12. den růstu. Kultivace probíhala dalších 11 dní. Vzorky na analýzu enzymatických aktivit (80 μ l / odběr) byly odebírány 12., 14., 16., 19., 21. a 23. den kultivace.

Všechny experimenty byly prováděny v tripletech. Souběžně s kulturami s přidanými testovanými látkami byly kultivovány v tripletu i kultury bez přidaných chemikálií (kultury bez chemikálií označovány Bio, kultury s chemikálií označované příslušným názvem – D103, ClBA, ClP). Pro stanovení úbytku Deloru 103 v průběhu kultivace byly jako kontroly použity kultury usmrčené autoklávováním před přidáním Deloru 103, které byly dále kultivovány souběžně s živými kulturami.

4.7. Stanovení enzymatických aktivit

Enzymatické aktivity v tekutých kulturách byly měřeny za použití standardních spektrofotometrických metod. Tyto testy byly prováděny na přístroji ELISA reader SPECTRAmaxPlus384 (Molecular Devices Corporation, USA). Pro zjištění enzymatických aktivit byla použita kultivační tekutina odebraná z kultur. Jedna jednotka enzymatické aktivity (U) je vyjádřena jako množství enzymu, které přemění 1 μ mol enzymatického substrátu za minutu.

Pro výpočet byl použit vzorec:

$$EA = (dA_{1min} * V_{rm}) / (\epsilon * V_{sam})$$

EA enzymatická aktivita (U/l)

dA_{1min} změna absorbance reakční směsi za 1 min

V_{rm} objem reakční směsi (l)

ϵ molární extinkční koeficient enzymového substrátu ($\mu M^{-1} cm^{-1}$)

V_{sam} objem vzorku (l)

Pro vyjádření enzymové aktivity v jednotkách U/g byly vypočtené hodnoty EA nejprve vynásobeny objemem kultur a poté vyděleny suchou hmotností mycélia získaného z kultur.

4.7.1. Lakasa

Lakasová aktivita byla měřena pomocí oxidace ABTS (2,2 – azinodi-3-etylbenzotiazolin-6-sulfonát) při $\lambda=420$ nm (MATSUMURA *et al.*, 1986) s molárním absorpčním koeficientem ABTS $\epsilon_{420} = 36\,000\, M^{-1} cm^{-1}$. Reakce byla spuštěna přidáním ABTS do reakční směsi.

Složení reakční směsi:

- a. 20 μ l vzorku
- b. 20 μ l 50mM ABTS
- c. 160 μ l 120mM acetát sodný (pH = 5,0)

4.7.2. Mn-dependentní peroxidasa

MnP aktivita byla měřena oxidací 2,6-dimethoxyphenolu (DMP) při $\lambda = 468\text{nm}$ (DEJONG *et al.* 1994) s molárním absorpčním koeficientem $\epsilon_{468} = 49\,600\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Složení reakční směsi:

- | | |
|--------|---|
| 1. Lac | a. 20 μl vzorku
b. 10 μl 20mM DMP
c. 170 μl 65,8mM malonát sodný (pH = 4,5) |
| 2. MnP | a. 20 μl vzorku
b. 10 μl 20mM DMP
c. 10 μl 20mM MnSO ₄
d. 8 μl 10mM H ₂ O ₂
e. 152 μl 65,8mM malonát sodný (pH = 4,5) |
| 3. MIP | a. 20 μl vzorku
b. 10 μl 20mM DMP
c. 10 μl 20mM EDTA
d. 8 μl 10mM H ₂ O ₂
e. 152 μl 65,8mM malonát sodný (pH = 4,5) |

Reakce byla zahájena přidáním DMP. Hodnota aktivity mangan–dependentní peroxidasy byla na závěr vypočtena odečtením hodnot měřených z reakčních směsí 2. MnP a 3. MIP.

4.8. β -galaktosidasový test

Používaným kmenem byla kvasinka *S.s cerevisiae* hER α . Celý test byl prováděn dle publikace ROUTLEDGE a SUMPTER (1996).

4.8.1. Příprava kultury

Kultivační medium bylo zaočkováno na optickou denzitu $A_{640\text{nm}} = 0,08$ a inkubováno při 180 rpm ve 28 °C do dosažení $A_{640\text{nm}} = 1,0$. Poté bylo 50 ml MMAUT média inokulováno 2 ml této prekultury. Nakonec byl přidán roztok CPRG v poměru 0,5 ml na 50 ml kultivačního media.

4.8.2. Provedení testu

Do jamek plastové mikrotitrační destičky bylo napipetováno 10 µl testované látky o různé koncentraci (postupným ředěním v 30% DMSO byly připraveny koncentrační řady těchto látek) a 190 µl kvasinkové kultury s CPRG. Jamky byly zvrchu zalepeny páskou a destička byla protřepána (2 min., 650 rpm). Inkubace probíhala na třepačce (65 rpm) při 32 °C po dobu dvou dnů. Poté byla změřena absorbance vzorků na spektrofotometru při dvou vlnových délkách 540 nm (odpovídá absorpčnímu maximu CPRG) a 620 nm (optická densita kvasinek).

Jako blank bylo použito 10 µl DMSO kultivovaného se 190 µl kvasinkové kultury s CPRG. Jako standard byl použit 17β-estradiol. Všechna měření probíhala v tripletech.

4.8.3. Výpočet

Naměřené absorbance vzorků byly zkorigovány podle vzorce:

$$A_{kor} = (A_{540nm} - A_{bl,540nm}) - (A_{620nm} - A_{bl,620nm})$$

A_{kor} korigovaná hodnota absorbance

A_{540nm} změřená absorbance při 540 nm

$A_{bl,540nm}$ změřená absorbance blanku při 540 nm

A_{620nm} změřená absorbance při 620 nm

$A_{bl,620nm}$ změřená absorbance blanku při 620 nm

Hodnota A_{kor} byla vynesena do grafu proti logaritmu koncentrace testované látky. U látek vykazujících estrogení aktivitu měla tato závislost sigmoidální průběh. Pro tyto látky z lineární části křivky byla spočítána hodnota EC_{50} jako koncentrace látky odpovídající poloviční odezvě testu.

4.9. Bioluminiscentní kvasinkový test

Používaným kmenem byl *S. cerevisiae* BMAEReluc/ER α (ER, estrogenní test), *S. cerevisiae* BMAAREluc/AR (AR, androgenní test) a kontrolní kmen *S. cerevisiae* BMA64luc (luc). Celý postup dle práce LESKINEN *et al.* (2005).

4.9.1. Příprava kultury

Kultivační SMD médium o objemu 3 ml bylo naočkováno kvasinkami a poté inkubováno na třepačce (190 rpm) při 30 °C přes noc. Tyto prekultury byly poté doplněny 15 ml čerstvého SMD média a dále kultivovány (cca 2 hodiny) až do dosažení OD_{640nm} = 0,6 - 0,7 (měřeno spektrofotometricky).

4.9.2. Provedení testu

Do luminiscenčních kyvet bylo napipetováno vždy 250 μ l kvasinkové kultury a 25 μ l testované látky (pro kmeny ER a AR), pro kontrolní kmen luc bylo pipetováno 125 μ l kvasinkové kultury a 12,5 μ l testované látky. Zkumavky byly zalepeny parafilmem, zamíchány a inkubovány při 30 °C po dobu 150 min. Před každým měřením bylo do zkumavky připipetováno 250 μ l luciferinu (0,056 g v 0,1 l SC pufru) pro kmeny ER a AR a 125 μ l luciferinu pro kmen luc. Měření probíhalo na luminometru Lumino-M90a (ZD Dolní Újezd, ČR) s použitím integračního času 60 s. Jako blank sloužilo 30% DMSO kultivované s kvasinkovými kulturami stejným způsobem jako testované látky.

Každá látka byla testována s použitím senzorového kmene (ER nebo AR) a paralelně k tomu ještě s kontrolním kmenem luc pro stanovení případné toxicity vzorku vůči kvasinkové kultuře. Všechna měření probíhala v tripletech. Jako standard byl použit testosteron (androgenní test) a 17 β -estradiol (estrogenní test) (obojí čistota $\geq$ 98%, Sigma Aldrich, Německo).

4.9.3. Výpočet

Naměřené hodnoty relativní světelné emise (*RLU*) pro jednotlivé koncentrace látek byly normalizovány podle následujících výpočtů:

$$Fi = RLU_{(ER \text{ s chemikálií})} / RLU_{(ER \text{ blank})}$$

$$CF = RLU_{(luc \text{ blank})} / RLU_{(luc \text{ s chemikálií})}$$

Jestliže platí: $CF = 0,5-2,0$ pak: $Fi_{kor} = Fi \cdot CF$
 $CF > 2,0$ pak je vzorek toxický

Fi indukce světelné emise

Fi_{kor} korigovaná hodnota *Fi*

CF korekční faktor

Hodnota Fi_{kor} byla vynesena do grafu proti logaritmu koncentrace testované látky. U látek vykazujících estrogenní / androgenní aktivitu měla tato závislost sigmoidální průběh. Pro tyto látky byla z lineární části křivky spočítána hodnota EC_{50} jako koncentrace látky odpovídající poloviční odezvě testu.

4.10. Stanovení houbové biomasy

Obsah baněk byl zfiltrován a mycelium promyto destilovanou vodou. Poté bylo mycélium sušeno při teplotě 105 °C po dobu 24 hodin na předváženém filtračním papíře. Množství biomasy bylo stanoveno vážením na analytických vahách.

4.11. Isoelektrická fokusace IEF

Ke studiu *pI* profilu lakasy byly použity supernatanty ze 2., 4., 8., 11. (kultivace A viz kapitola 4.6.1.), 14., 16., 19. a 21. (kultivace B viz kapitola 4.6.1.) dne kultivace *T. versicolor* v tekutém MM médiu. Supernatanty byly koncentrovány přes 10 kDa cut off membránu. IEF byla prováděna na stroji Multiphor II electrophoresis system (Pharmacia, Švédsko) za nativních podmínek. Nativní gel 7,5% (CleanGel IEF, GE Healthcare, Velká Británie) byl připraven za použití amfolitů o *pI* 2,5 - 5,0 a 3,5 - 10,0 (Pharmacia, Švédsko). Měření *pI* v gelu bylo prováděno pomocí dotykové pH elektrody P17 (Sentek, Velká Británie). Gel byl obarven pomocí ABTS (0,549 g/l).

IEF fokusace probíhala při 4°C a napětí 1500 V, limitní hodnota proudu byla 2 mA. Gel byl nejprve pod napětím 1500 V 20 min. pro dotvoření pH gradientu v gelu. Poté byly na gel pomocí nanášecích papírků nanесeny vzorky a gel byl fokusován 40 min. Následně byly nanášecí papírky z gelu odstraněny a fokusace pokračovala dalších 100 min.

4.12. Izolace genomické DNA z houbového mycelia

Houbové mycélium získané z agarové kultury *T. versicolor* bylo lyofilizováno a homogenizováno sterilním párátkem. Izolace gDNA byla provedena chloroformovou metodou dle ZOLAN a PUKKILA (1986). Mycélium (cca 40 mg) bylo rozpuštěno v 600 µl extrakčního pufru a inkubováno 30 min při 60 °C. Následně bylo přidáno 600 µl roztoku chloroformu:izoamylalkoholu (24:1). Směs byla centrifugována 5 min. při 16000 g. Vodná fáze byla přenesena do nové mikrozkušavky s ekvivalentním množstvím izopropanolu a znovu centrifugována 30 s při 16000 g. Po následném odstranění supernatantu a přidání 300 µl TE a 3 µl RNasy A k peletě byla směs inkubována 30 min při 37 °C. Následně bylo přidáno 300 µl roztoku chloroformu:izoamylalkoholu (24:1) a centrifugováno 5 min. při 16000 g. K vodné fázi bylo přidáno 50 µl 7,5 M octanu amonného a 600 µl 96% ethanolu.

Po cetrifugaci (30 s, 16000 g) byl odstraněn supernatant a peleta byla promyta 300 μ l 0,2 M octanu amonného a 600 μ l 96% ethanolu. Po následné centrifugaci (1 min., 16000 g) byl supernatant vysušen (ve vakuové odstředivce) a peleta resuspendována v 50 μ l TE pufru.

Extrakční pufr – složení:

Hexadeciltrimethylammonium bromide	10 g
NaCl	40,88 g
Tris(hydroxymethyl)aminomethan pH 8,0	6,055 g
Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)	2,922 g
2-merkaptoethanol	10 ml
dH ₂ O	do 1 l

4.13. Stanovení koncentrace DNA

Koncentrace DNA byla měřena na spektrofotometru Nanodrop ND – 1000 (Thermo Scientific, USA). Výsledná koncentrace byla udávána v ng/ μ l. Čistota vzorku DNA byla ověřována pomocí stanovení poměru absorbance měřené při 260 nm a 280 nm. Vzorek byl považován za čistý, pokud se výsledný poměr pohyboval v rozmezí 1,8 – 2,0.

4.14. PCR detekce *lac* genu v gDNA

Geny kódující lakasu byly detekovány v gDNA pomocí PCR reakce s degenerovanými primery Cu1F a Cu2R (LUIS *et al.* 2004):

Forward 5'- CAYTGGCAYGGNTTYTTYCA- 3' (Cu1F, primer f)

Reverse 5'- GRCTGTGGTACCAGAANGTNCC – 3' (Cu2R, primer r)

PCR byla prováděna na T Gradient PCR cykleru (Biometra, Německo) za podmínek uvedených v Tab. 1. Výsledek každé PCR byl ověřen na agarosovém gelu (viz kapitola 4.15.1.).

Složení PCR směsi (25µl):	10x PCR pufr	2,5 µl
	dNTP (2,5 mM každý)	0,5 µl
	DyNAzyme polymerasa (2 U/µl)	0,7 µl
	Primer f (50 µM)	0,5 µl
	Primer r (50 µM)	0,5 µl
	DNA (cca 200 ng do reakce)	2,0 µl
	dH ₂ O	18,3 µl

Tab. 1 Podmínky PCR reakce

	Čas	Teplota
Iniciace denaturace	2 min	94°C
Denaturace	30 s	94°C
Nasedání primerů	30 s	54°C
Polymerace	30 s	72°C
Ukončení polymerace	10 min.	72°C
Počet cyklů (krok 2 - 4)	35	

4.15. Agarosová elektroforéza

4.15.1. Agarosová elektroforéza pro DNA vzorky

Na agarosový gel bylo nanášeno 10 µl PCR reakční směsi s 1,5 µl nanášecího pufru (6x Orange loading dye solution). Jako standard byl používán 100 bp DNA ladder (7 µl). Foréza probíhala v TAE pufru.

Podmínky elektroforézy:	proud	max 500 mA
	napětí	85 V
	čas	33 min.
Agarosový gel (40ml):	agarosa	0,8 g
	TAE pufr	do 40 ml
	EtBr	0,25 ug/ml

4.15.2. Agarosová elektroforéza pro RNA vzorky

Na gel bylo nanášeno 3 μ l vzorku RNA se 7 μ l nanášecího pufru. Foréza probíhala v 1x gelovém pufru.

Podmínky elektroforézy:	Proud	max 500 mA
	Napětí	80 V
	Čas	30 min.
Agarosový gel (40ml):	agarosa	0,48 g
	dH ₂ O	28 ml
po uvaření přidáno	MOPS (0,2 M)	4 ml
	Formaldehyd	8 ml
Nanášecí pufr:	Formamid	660 μ l
	Formaldehyd	80 μ l
	Blue Bromphenol (100 g/l)	10 μ l
	EtBr(10 g/l)	10 μ l
	10x gel pufr	100 μ l
10x Gel pufr:	MOPS	41,854 g
	Octan sodný	6,804 g
	EDTA	2,922 g
	DEPC H ₂ O	do 1 l

4.16. Extrakce DNA z gelu

4.16.1. Extrakce DNA z agarosového gelu

Metoda dle BOYLE a LEW (1995). Po separaci DNA na agarosovém gelu byla DNA vyříznuta a tento gel byl inkubován 5 min v 6 M NaI (3x ekvivalentní množství gelu, 1 g ~ 1 ml) při 55 °C. Následně bylo k suspenzi přidáno 10 μ l silikonové suspenze (100 mg/ml SiO₂ v 3 M NaI) a směs byla inkubována 5 min při 55 °C (občasné míchání). Po 5 s centrifugací (10000 g) byl odstraněn supernatant a peleta byla 3x promyta 500 μ l ledového promývacího pufru. Poté byla petela resuspendována v 5 μ l TE pufru, inkubována 5 min. při 55°C a centrifugována (1 min., 12000 g). Nakonec byl supernatant přenesen do nové mikrozkušavky. Tento krok byl proveden 2x. Obsah DNA byl změřen spektrofotometricky.

4.16.2. Extrakce DNA z akrylamidového gelu

Vzorek byl vyříznut z akrylamidového gelu a po přidání 20 μ l TE zamražen při -20 °C. Po rozmrznutí při pokojové teplotě byla směs zamíchána a 3 μ l směsi byly poté použity jako templát pro PCR.

4.17. Izolace celkové RNA z mycélia

Houbové mycélium získané filtrací kultur bylo rozbito v tekutém dusíku na jemný prášek a přeneseno do mikrozkušavky v množství dosahující úrovně 200 μ l. K tomu bylo přidáno 500 μ l denaturační směsi, 50 μ l octanu sodného (272,16 g/l), 500 μ l fenolu a 100 μ l chloroformu:izoamylalkoholu (49:1). Po přidání každé složky byla suspenze jemně zamíchána. Poté následovala 15-ti minutová inkubace na ledu. Po centrifugaci (4°C, 15000 g, 10 min.) byla přenesena vodní fáze do nové mikrozkušavky společně s ekvivalentním množstvím izopropanolu. Roztok byl následně inkubován při -20 °C po 30 minut. Následovala centrifugace (4 °C, 15000 g, 5 min.), odstranění supernatantu, promytí lithium chloridem (169,56 g/l) a další centrifugace (4 °C, 15000 g, 5 min.). Poté byla peleta promyta v 500 ml 75% ethanolu a inkubovaná s ním 15 min. při pokojové teplotě. Na závěr byla peleta plně vysušena a resuspendována ve vodě ošetřené diethyl pyrocarbonatem.

Obsah RNA v roztoku byl měřen spektrofotometricky. Výsledek izolace byl vizualizován na agarosovém gelu (viz kapitola 4.15.2.)

4.18. Reversní transkripce

Vyizolovaná RNA byla po dobu 25 min. při pokojové teplotě ošetřena DNázou I (složení reakční směsi viz níže). Následně byl do směsi přidán Stop solution (2 μ l) a proběhla druhá inkubace 10 min. při 70 °C. Takto ošetřená RNA byla zchlazena na ledu. Úspěšné ošetření RNA bylo potvrzeno pomocí PCR (viz kapitola 4.14.) s 1 μ l RNA jako templátem, kde absence PCR produktu znamenala úspěšné ošetření.

Samotný přepis probíhal pomocí randome hexamer primeru (2 μ l do směsi). RNA byla inkubována s primerem 10 min. při 70 °C. Poté byla ke vzorku přidána reakční směs pro přepis RNA (viz níže) a proběhla inkubace 5 min. při 37 °C. Posledním krokem bylo přidání 2 μ l M-MLV Rnase H(-) reversní transkriptázy a proběhnutí reakčního cyklu: 1 hod. 42 °C, 10 min. 70 °C, zchlazení na ledu. Správnost přepisu byla ověřena pomocí PCR (viz kapitola 4.14.), kde na následné agarosové elektroforéze došlo k detekci amplifikovaného fragmentu.

Reakční směs pro ošetření DNázou

RNA (cca 600 ng)	15 μ l
10x reakční pufr pro DNázu	2 μ l
DNáza I (1 U/ μ l)	2 μ l
Riblock inhibitor (40 U/ μ l)	0,5 μ l

Reakční směs pro přepis RNA

10x pufr pro M-MLV reversní transkriptasu	4 μ l
MgCl ₂ (50 mM)	1 μ l
dNTP (každý 10 mM)	4 μ l
Riblock inhibitor (40 U/ μ l)	1 μ l
DEPC dH ₂ O	4 μ l

4.19. Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)

Vzorky na DGGE byly připraveny dvěma PCR reakcemi. První reakce (PCR 1) proběhla přesně dle předpisu popsaném v kapitole 4.14. V nested PCR bylo použito jako templát 2 µl produktu z PCR 1. PCR probíhala za podmínek uvedených v Tab. 2.

Použité primery:

Reverse 5′ - GRCTGTGGTACCAGAANGTNCC – 3′ (Cu2R, primer r - dle LUIS *et al.* 2004)

Forward 5′ -
CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGGCGGGGGCACGGGGGGCAYTGGCAYGGN
TTYTTYCA – 3′ (Cu1F–GC, primer f - dle LUIS *et al.* 2004, GC kotva dle MAY *et al.* 2001).

Složení PCR směsi (25µl):	10x PCR pufr	2,5 µl
	dNTP (2,5 mM každý)	0,5 µl
	DyNAzyme polymeráza (2 U/ µl)	0,7 µl
	Primer f (50 µM)	0,5 µl
	Primer r (50 µM)	0,5 µl
	PCR směs (PCR 1)	2,0 µl
	dH ₂ O	18,3 µl

Tab. 2 Podmínky PCR reakce

	Čas	Teplota
1. Iniciace denaturace	2 min	94°C
2. Denaturace	30 s	94°C
3. Nasedání primerů	30 s	58°C
4. Polymerace	30 s	72°C
Počet cyklů (krok 2 - 4)	5	
5. Denaturace	30 s	94°C
6. Nasedání primerů	30 s	54°C
7. Polymerace	30 s	72°C
Počet cyklů (krok 5-7)	35	
8. Ukončení polymerace	10 min	72°C

Takto připravené vzorky byly analyzovány na 8% akrylamidovém gelu (poměr arylamidu a bis-akrylamidu 37,5:1) v gradientu 40–70% denaturačního činidla (100% odpovídá 7 M močovíně a 36% formamidu). Jako polymerační činidla byly použity 10% amonium persulfát (APS) a Temed. Na gel bylo nanášeno 20 µl vzorku se 4 µl nanášecího pufru (6x Orange loading dye solution).

Analýza probíhala na aparatuře IngenyPhorU (Ingeny, Německo) 17 h při 80 V a teplotě 60 °C v 0,5% TAE pufru. Gely byly následně barveny 10min pomocí EtBr (300 ml vody + 20µl 1% EtBr), poté 10 min. promývány deionizovanou vodou.

4.20. Kvantitativní PCR

Analýza probíhala na stroji StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA).

Normalizované množství cDNA (ve 2 µl vzorku) bylo použito na kvantifikaci transkriptu lakázy v cDNA. PCR probíhala za podmínek uvedených v Tab. 3. V reakci byly použity degenerované primery Cu1F a Cu2R (LOUIS *et al.* 2004) popsané v kapitole 4.14. Použita byla komerční směs Power SYBR Green PCR mix (Applied Biosystems, USA). Normalizace výsledků proběhla porovnáním s kvantifikací transkriptů konstitutivně exprimovaného referenčního genu pro aktin, který byl amplifikován pomocí primerů popsáných v práci LOUIS *et al.* (2004).

Forward 5´- GHCACCAGGGTGTNATGGTCG – 3´ (Act1, primer f)

Reverse 5´- GCCAGATCTTCTCAATGTCRTCCC – 3´ (Act 2, primer r)

Výsledky byly vyhodnoceny pomocí vzorce:

$$A/B = (1+E_{\text{ref}})^{CtA_{\text{ref}}-CtB_{\text{ref}}} / (1+E_{\text{tar}})^{CtA_{\text{tar}}-CtB_{\text{tar}}}$$

A vzorek A (kultury s přidaným Delorem 103)

B vzorek B (kontrolní kultury)

E..... výtěžnost PCR (0-1)

tar..... cílový gen (*lac*)

ref..... referenční gen (*act*)

Složení reakční směsi (20 µl):	Power SYBR Green PCR mix	10 µl
	Primer f (50 µM)	0,4 µl
	Primer r (50 µM)	0,4 µl
	Bovine serum albumine (4 mg/ml)	2 µl
	dH ₂ O	5,08 µl
	cDNA (normalizované množství)	2 µl

Tab. 3 Podmínky PCR reakce:

	Čas	Teplota
1. Iniciační denaturace	10 min	95°C
2. Denaturace	20 s	95°C
3. Nasedání primerů	20 s	55°C
4. Polymerace	40 s	72°C
Počet cyklů (krok 2 - 4)	40	

Po ukončení polymerace následovala analýza disociace produktů PCR (tzv. analýza „melt curve“). Tato analýza probíhala 15 s při 95 °C, poté 1 min. při 85 °C a nakonec bylo kroky po 0,1 °C dosaženo teploty 96 °C, která byla držena po dobu 15 s.

4.21. Transformace DNA do *Escherichia coli*

Přetištěné PCR produkty byly transformovány do kompetitivních buněk *Escherichia coli* za použití pMOSBlue Blunt Ended Cloning Kitu (GE Healthcare, UK). Na agarovou misku s LB médiem obsahujícím amplicilín, IPTG a Xgal bylo rozetřeno 40 µl z 320 x naředěné transformační směsi a inkubováno 24 h při 37°C. Pozitivní transformanty byly vybrány na základě modro-bílé selekce. Následně byla provedena PCR (viz kapitola 4.14.), kde jako templát sloužily buňky transformantů. Produkty PCR přečištěné přes agarosový gel byly odeslány na sekvenaci za pomoci forward primeru Cu1F. Sekvence probíhala v Středisku sekvenování DNA (Mikrobiologický ústav AV ČR, Praha, ČR). Získané sekvence byly porovnány s NCBI databází pomocí Blastn analýzy (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

4.22. Stanovení degradace PCB

4.22.1. Extrakce PCB z kultur *T. versicolor*

Houbové kultury s obsahem Deloru 103 byly po 12-ti dnech kultivace na MM a MEG mediu (kultivace A) a po 23 dnech kultivace na MM mediu (kultivace B) zhomogenizovány pomocí Ultra-Turaxx T25 (Janke a Kunkel, IKA-Labortechnik, Německo) a poté byl homogenizát okyselen přidáním 200 μ l 1 M H_2SO_4 . Extrakce PCB látek probíhala pomocí 20 ml ethylacetátu a to v 5-ti krocích (vždy 10 min. třepání při 150 rpm, 10 min. inkubace v ultrazvukové lázni, vodní fáze byla následně použita pro další krok extrakce). Ethylacetátový extrakt byl zakoncentrován odpařením na vakuové odpařovače RVO200 (110 rpm, 40 °C, 820 P). Takto připravený extrakt byl ještě sušen za pomoci bezvodého Na_2SO_4 . Vzorky byly poté analyzovány pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS).

4.22.2. *In vitro* degradace Deloru 103 pomocí extracelulární tekutiny *T. versicolor*

Pro *in vitro* degradaci Deloru 103 byla použita extracelulární tekutina z 8 a 12 dní staré MM kultury *T. versicolor* (kultivace A) pěstované v / bez přítomnosti 10 mg/l Deloru 103. Extracelulární tekutina byla získána filtrací kultur a zakoncentrována přes 10 kDa cut off celulosovou membránu.

In vitro inkubační směsi obsahovaly v celkovém objemu 2 ml: 60 mM acetát sodný (pH=5), 10 mg/l Deloru 103, 0,5% DMSO a vzorek koncentrované kultivační tekutiny odpovídající 6 mU aktivity lakasy. Inkubace probíhala 2 h., při teplotě 28 °C a 150 rpm. Po inkubaci byly vzorky okyseleny přidáním 10 μ l 1 M H_2SO_4 a extrahovány 5 x 2 ml ethylacetátu (10 min. třepání při 150 rpm, 10 min. inkubace v ultrazvukové lázni, vodní fáze byla následně použita pro další krok extrakce). Ethylacetátové extrakty byly zakoncentrovány odparem pod proudem N_2 , sušeny za pomoci bezvodého Na_2SO_4 a podrobeny kvantitativní analýze.

4.22.3. Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS)

Pro stanovení PCB byla použita metoda GC-MS (Plynový chromatograf 450-GC, Hmotnostní detektor 240-MS; obojí Varian, USA). Látky byly separovány na koloně DB-5MS (délka 30 m, šířka 0,25 mm I.D., stacionární fáze 0,25 μm ; Restek, USA). Byl dávkován 1 μl vzorku pomocí autosampleru CombiPAL (Varian, USA). Nosným plynem bylo Helium (čistota 99.99 %) o konstantním průtoku 1 ml/min.

Teplota injektoru byla 240 °C. Teplotní program začal isotermálně při zavřeném děliči po dobu 1 min. Poté byl dělič otevřen a teplota stoupala z 60 °C lineárně na 120 °C rychlostí 25 °C/min a poté na 240 °C rychlostí 2,5 °C/min, která byla následně udržována 10 minut. Detekce byla spuštěna 5 minut po nástřiku a pokračovala do 60 minuty. Měření byla prováděna frekvencí 1,52 Hz. Byla použita ionizace dopadem elektronů (70 eV). Iontový proud se měřil v rozsahu 140 - 410 m/z pro kvantitativní a kvalitativní stanovení PCB. Jednotlivé kongenery byly identifikovány na základě porovnání hmotnostních spekter a retenčních časů s příslušnými standarty.

4.23. *In vitro* dekolorizace syntetických barviv

Dekolorizační *in vitro* pokus byl proveden pomocí extracelulární tekutiny odebrané 8. a 12. den z kultivace A (viz kapitola 4.6.1.), která byla zakoncentrována pomocí 10 kDa cut off membrány. Pokus byl prováděn v 50 mM acetátu sodném (pH = 5) s počáteční koncentrací daného barviva 50 mg/l. Množství koncentrované kultivační kapaliny přidané do reakce odpovídalo 1 mU aktivity lakasy. Jako mediátor reakce v paralelách byl použit 1-hydroxybenzotriazol (HBT) o koncentraci 10 mM (rozpuštěn v DMSO) a kyselina 4-hydroxybenzoová (HBA) také o koncentraci 10 mM (rozpuštěna v DMSO). Celkový objem reakce byl 0,2 ml.

Dekolorizovány byly 4 druhy barviv:

RO16	– azobarvivo, $\lambda_{\max}$ 494 nm
RBBR	– antrachinonové barvivo, $\lambda_{\max}$ 592 nm
Azure B	– heterocyklické barvivo, $\lambda_{\max}$ 651 nm
CuP	– ftalocyaninové barvivo, $\lambda_{\max}$ 694 nm

Inkubace vzorků a měření probíhalo ve spektrofotometru SPECTRAmaxPLUS³⁸⁴ (Molecular Devices, USA). Měření absorbance probíhalo 10 hodin (s intervalem měření 5 minut) při výše uvedených vlnových délkách a stálé teplotě 28 °C. Vzorky byly před měřením pravidelně míchány. Na konci pokusu (po 10-ti hodinách inkubace) byla stanovena konečná hodnota absorbance reakčních směsí.

4.24. Statistické zpracování

Všechna získaná data byla pro ověření průkaznosti zpracována standardními statistickými metodami (standardní t test s hladinou pravděpodobnosti $\alpha = 0,05$).

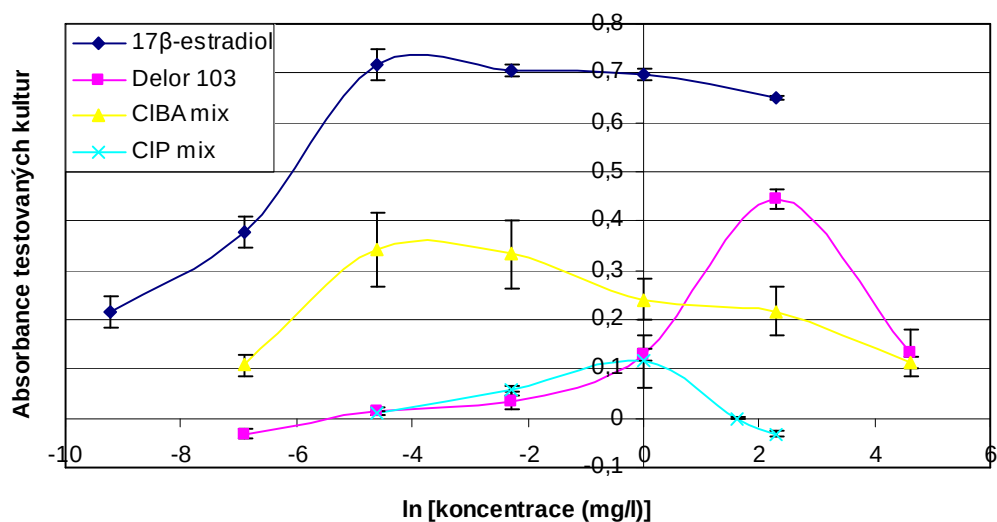
5. VÝSLEDKY

5.1. Měření endokrinní aktivity chemikálií (Delor 103, ClBA mix, ClP mix)

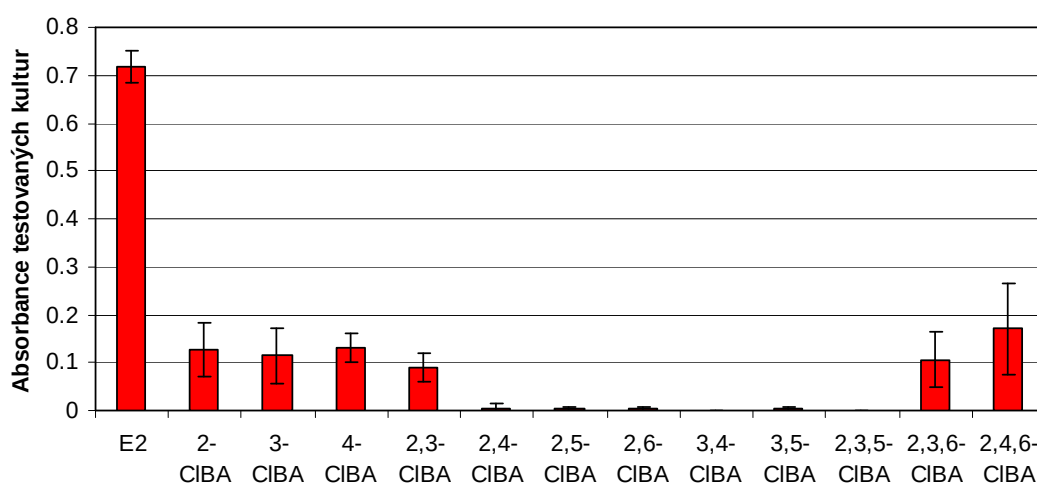
Chemikálie, které byly používány v dalších pokusech této práce, byly nejdříve otestovány kvasinkovými testy na jejich potenciální endokrinní aktivitu. Všechny vzorky pro dané testy byly rozpouštěny v 30% v/v DMSO, aby nedošlo k negativnímu ovlivnění kvasinkových kultur, které bylo pozorováno při konečné koncentraci DMSO v kultuře přesahující 3 % (v/v).

5.1.1. Estrogenní aktivita látek měřená β -galaktosidasovým testem

17 β -estradiol jako standard v β -galaktosidasovém testu vyvolal lineární odpověď testu v rozmezí koncentrací $1 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-3}$ mg/l (Obr. 6). Z regresní závislosti tohoto grafu byla vypočítána příslušná odpověď $EC_{50} = 6,28 \cdot 10^{-5}$ mg/l, což je koncentrace látky odpovídající poloviční odezvě testu. Souhrnné hodnoty EC_{50} pro všechny testované látky jsou shrnuty v Tab. 4. Z Obr. 6 je patrné, že ClBA vykázaly také slabou estrogenní aktivitu. Delor 103 vykázal oproti standardu nižší estrogenní aktivitu s hodnotou $EC_{50} = 1,5 \cdot 10^{-1}$ mg/l. U ClP nebyla estrogenní aktivita pozorována. Byly testovány i jednotlivé složky směsi ClBA, u kterých byla naměřena estrogenní aktivita (Obr. 7). Jednotlivé složky směsi ClP neprokázaly žádnou endokrinní aktivitu měřitelnou tímto testem (data neprezentována).



Obr. 6 Závislost estrogenní aktivity 17β-estradiolu, Deloru 103, CIBA mix, CIP mix na ln koncentrace látky; měřeno β-galaktosidasovým testem.



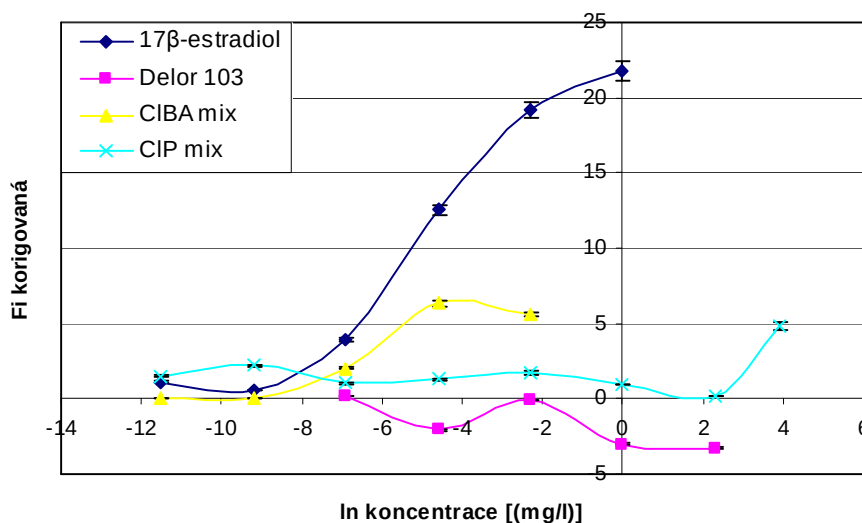
Obr. 7 Odpověď β-galaktosidasového testu na jednotlivé CIBA. E2 v grafu odpovídá látce 17β-estradiol. Všechny látky byly testovány v koncentraci $1 \cdot 10^{-2}$ mg/l.

5.1.2. Estrogenní a androgenní aktivita látek měřená bioluminiscentním testem

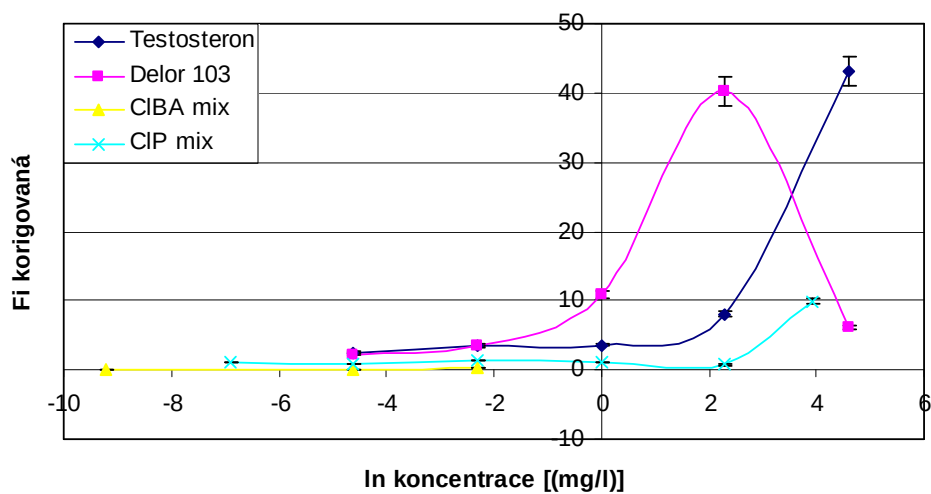
Výsledky bioluminiscentního testu pro estrogenní aktivitu látek ukázaly obdobné výsledky jako test β -galaktosidázový. Kontrolní látkou byl 17β -estradiol. Výsledky jsou shrnuty v Obr. 8, ze kterého vyplývá, že směs ClBA vykazuje slabou estrogenní aktivitu ($EC_{50} = 1,02 \cdot 10^{-4}$ mg/l) oproti dalším testovaným látkám (Delor 103 a CIP), které nevykázaly aktivitu žádnou.

Bioluminiscentní test pro zjištění androgenní aktivity se standartem testosteronem ukázal, že Delor 103 vykazuje androgenní aktivitu ($EC_{50} = 2,29 \cdot 10^{-2}$ mg/l), ostatní látky (ClBA a CIP) nevykázaly aktivitu žádnou (Obr. 9). EC_{50} testosteronu byla v tomto testu $7,75 \cdot 10^{-4}$ mg/l.

Hodnoty EC_{50} naměřené pro testované látky v estrogenním i androgenním testu jsou shrnuty v Tab. 4.



Obr. 8 Závislost estrogenní aktivity 17β -estradiolu, Deloru 103, ClBA mix, CIP mix na ln koncentrace látky; měřeno bioluminiscentním testem.



Obr. 9 Závislost androgenní aktivity testosteronu, Deloru 103, CIBA mix, CIP mix na ln koncentrace látky; měřeno bioluminiscentním testem.

Tab. 4 Hodnoty EC_{50} jednotlivých chemikálií měřené kvasinkovými testy. Hodnoty byly vypočítány z regresních závislostí grafů pro jednotlivá měření.

Chemikálie	β -gal test - hER α	Lumino test - hER α	Lumino test - hAR
	EC_{50} (mg/l)	EC_{50} (mg/l)	EC_{50} (mg/l)
17 β -estradiol	6,28E-05	7,95E-04	n
Delor 103	1,50E-01	nd	2,29E-02
CIBA mix	1,45E-04	1,02E-04	nd
CIP mix	nd	nd	nd

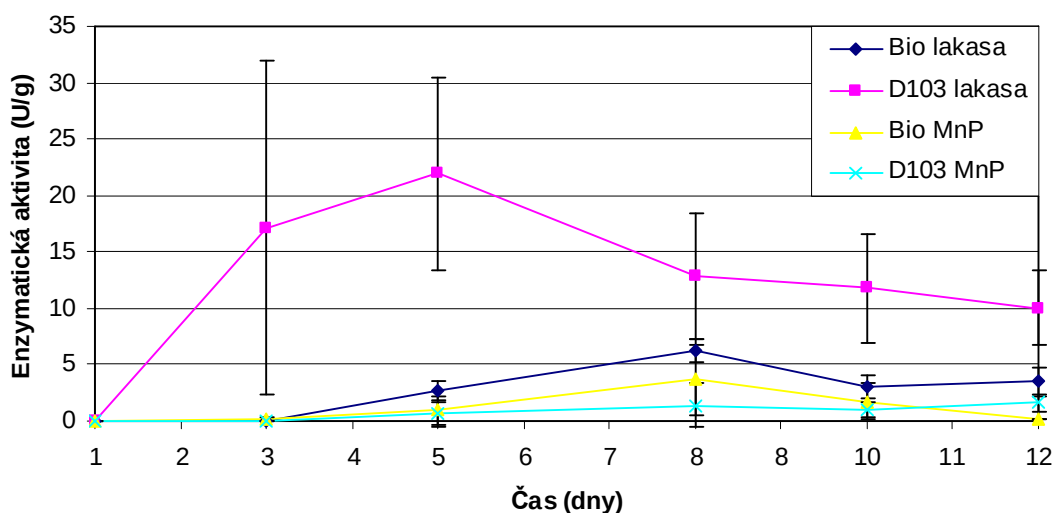
nd... aktivita nedetekována

n... neměřeno

5.2. Průběh enzymatických aktivit v kulturách *T. versicolor*

5.2.1. Kultivace v MEG médiu

V kulturách kultivace A rostlých na MEG médiu bylo stanovováno množství aktivního enzymu lakasy a MnP v supernatantu a zároveň přírůstek biomasy. Enzymová aktivita byla pak vyjádřena v množství enzymu (U) na 1 g suché váhy mycélia v kultuře. Z Obr. 10 vyplývá stimulační efekt Deloru 103 na produkci lakasy v kultuře, kde došlo k osminásobnému nárůstu měřené aktivity enzymu (5. den kultivace) oproti kontrole. V kulturách byla pozorována pouze velmi nízká aktivita MnP. Přítomnost polutantu (Tab. 5) neovlivnila růst kultury.



Obr. 10 Množství aktivního enzymu lakasy a MnP naměřeného v supernatantu kultur rostlých na MEG médiu. Prezentovaná data odpovídají průměru ze tří stanovení a vyznačené chybové úsečky směrodatné odchylce těchto stanovení.

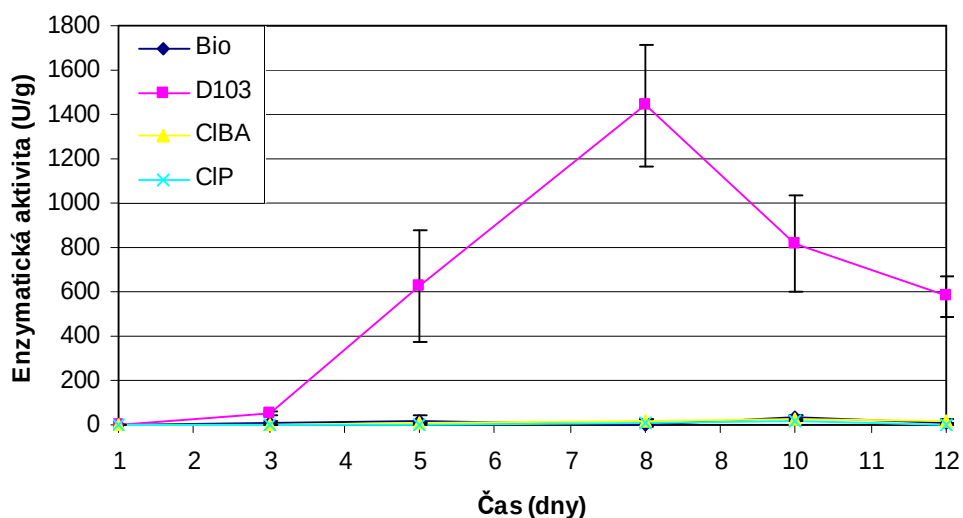
Tab. 5 Množství biomasy vyprodukované kulturami v průběhu kultivace na MEG médiu
Prezentovaná data odpovídají průměru ze tří stanovení. SD=směrodatná odchylka

Den	Biomasa			
	Bio		D103	
	Hmotnost (g)	±SD	Hmotnost (g)	±SD
3	0,0435	0,0017	0,0196	0,0037
5	0,0667	0,0048	0,0613	0,0024
8	0,0714	0,0438	0,1076	0,0089
10	0,1351	0,0033	0,1454	0,0131
12	0,1408	0,0008	0,1463	0,0091

5.2.2. Kultivace v MM médiu

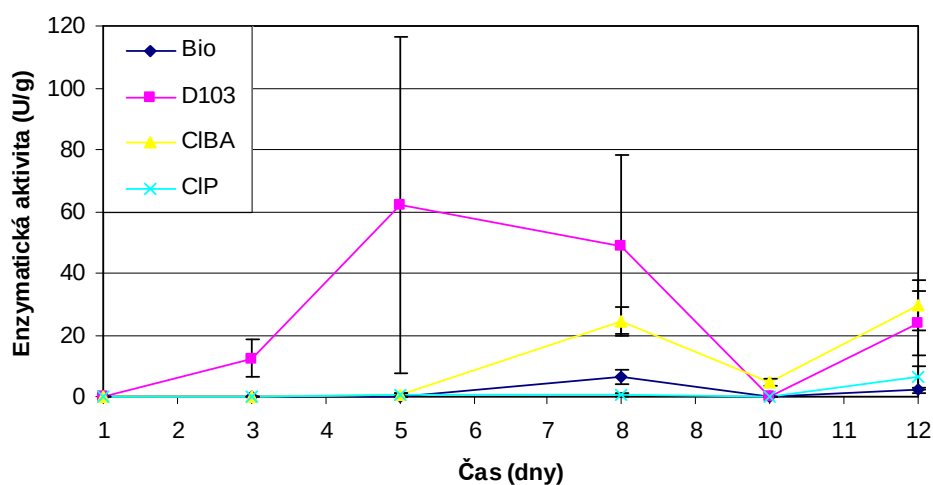
5.2.2.1. Kultivace A

Kultury rostlé na MM médiu byly sledovány z hlediska efektu polutantů na produkci enzymů lakasy a MnP. Byl sledován vliv Deloru 103, chlorbenzoových kyselin (ClBA) a chlorfenolů (ClP). Nejvyšší nárůst hladiny aktivity lakasy byl zaznamenán v kulturách s Delorem 103 (Obr. 11), kde bylo v 8. den kultivace naměřeno 1440 ± 272 U/g aktivního enzymu (oproti kontrolním Bio kulturám s $5,6 \pm 3,5$ U/g). Ostatní látky neměly na produkci lakasy vliv.



Obr. 11 Produkce lakasy v MM médiu v přítomnosti různých polutantů. Prezentovaná data odpovídají průměru ze tří stanovení a vyznačené chybové úsečky směrodatné odchylce těchto stanovení.

Byla pozorována stimulace produkce aktivního enzymu MnP v kulturách D103 a ClBA. Nejvýznaměji navýšily hladinu MnP v kulturách ClBA v 8. den kultivace (Obr. 12), kdy množství naměřeného enzymu bylo $24,4 \pm 4,3$ U/g oproti kontrolní kultuře s $6,3 \pm 2,2$ U/g. ClP nevykázaly žádný efekt na produkci aktivního enzymu. Dle měřené biomasy nebyl prokázán efekt polutantů na produkci biomasy (Tab. 6)



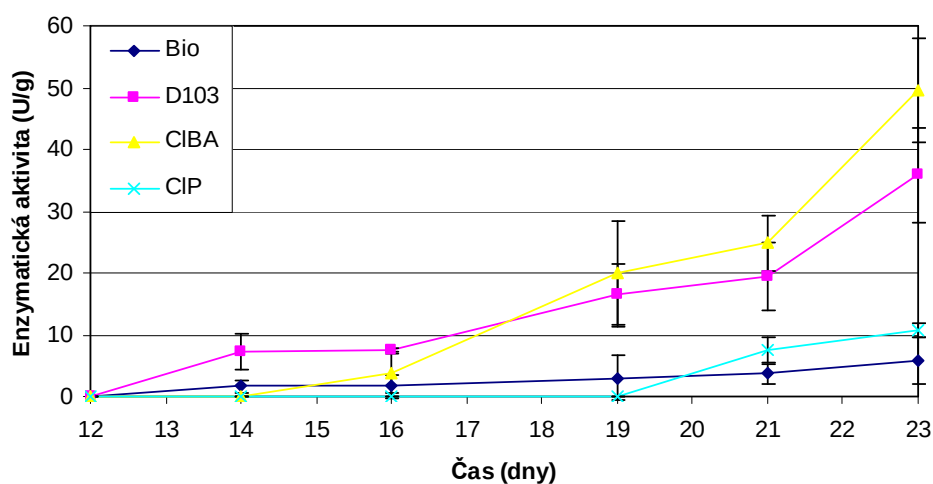
Obr. 12 Produkce MnP v MM médiu v přítomnosti různých polutantů. Prezentovaná data odpovídají průměru ze tří stanovení a vyznačené chybové úsečky směrodatné odchylce těchto stanovení.

Tab. 6 Množství biomasy vyprodukované kulturami v průběhu kultivace na MM médiu. Prezentovaná data odpovídají průměru ze tří stanovení. SD=směrodatná odchylka

Den	Biomasa							
	Bio		D103		ClBA		ClP	
	Hmotnost (g)	±SD	Hmotnost (g)	±SD	Hmotnost (g)	±SD	Hmotnost (g)	±SD
3	0,0083	0,0051	0,0042	0,0018	0,0123	0,0029	0,0093	0,0009
5	0,0033	0,0011	0,0027	0,0007	0,0167	0,0006	0,0101	0,0006
8	0,012	0,0099	0,0054	0,0011	0,022	0,0005	0,0124	0,001
10	0,0073	0,0015	0,0067	0,0017	0,0243	0,0029	0,0142	0,0015
12	0,0107	0,0014	0,0111	0,0011	0,029	0,0023	0,0252	0,0023

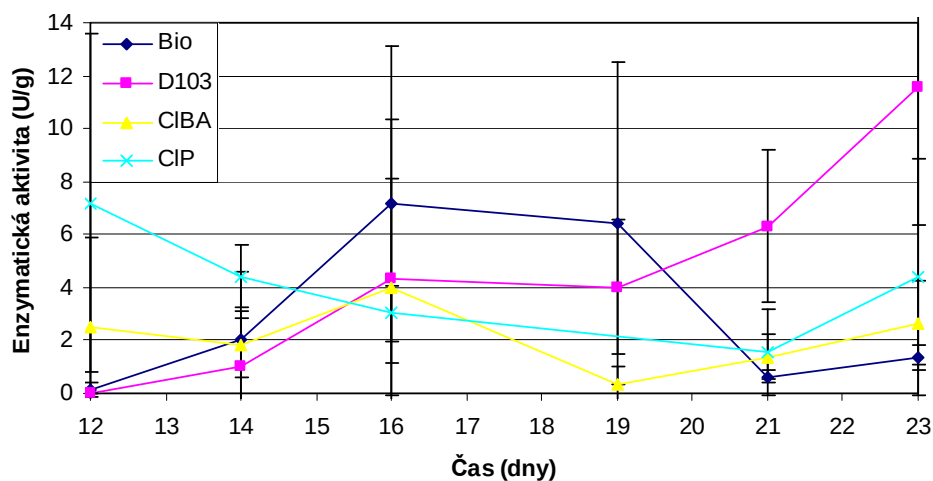
5.2.2.2. Kultivace B

Testován byl vliv polutantů na kultury ve stacionární fázi růstu (viz Obr. 13) rostlé na MM médiu. Sledována byla produkce aktivního enzymu lakasy a MnP a produkce biomasy. Zvýšená produkce aktivní lakasy byla pozorována u D103 (až 6x více oproti kontrole) a ClBA (8,5x více oproti kontrole) kultur. Efekt na produkci aktivní lakasy nebyl pozorován v případě přidání ClP.



Obr. 13 Produkce aktivní lakasy v MM médiu v přítomnosti různých polutantů. Prezentovaná data odpovídají průměru ze tří stanovení a vyznačené chybové úsečky směřodonné odchylce těchto stanovení.

Přidání Deloru 103 ke kulturám vyvolalo slabý indukční efekt na produkci MnP a to především v konečné fázi kultivace. Přidání ostatních polutantů nevyvolalo žádný statisticky průkazný efekt na indukci produkce aktivní MnP (Obr. 14).



Obr. 14 Produkce aktivní MnP v MM médiu v přítomnosti různých polutantů. Prezentovaná data odpovídají průměru ze tří stanovení a vyznačené chybové úsečky směrodatné odchylce těchto stanovení.

Byl pozorován efekt CIP na produkci biomasy u studované kultury. Množství mycelia kleslo o 47%. Ostatní polutanty neměly vliv na produkci biomasy (Tab. 7).

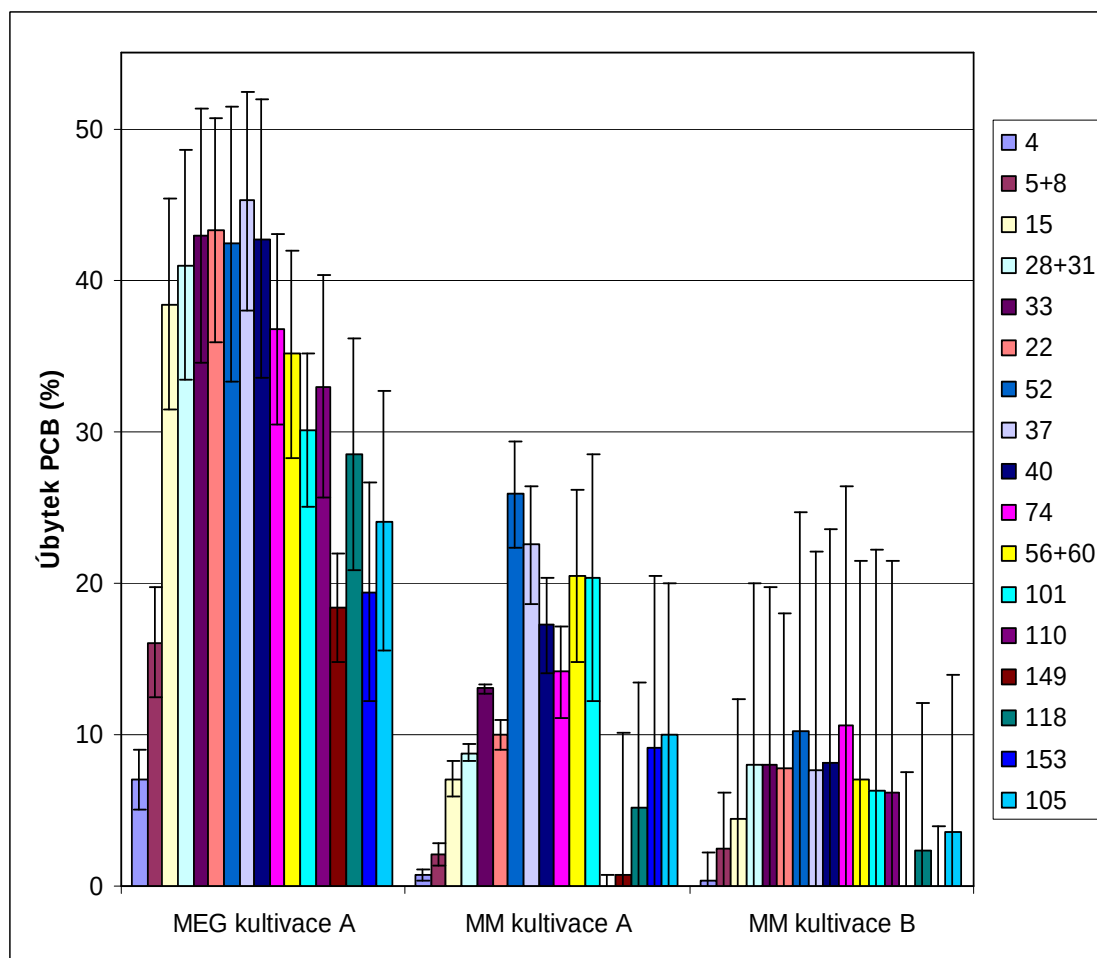
Tab. 7 Množství biomasy vyprodukované kulturami v průběhu kultivace na MM médiu. Prezentovaná data odpovídají průměru ze tří stanovení. SD=směrodatná odchylka

Den	Biomasa							
	Bio		D103		CIBA		CIP	
	Hmotnost (g)	±SD	Hmotnost (g)	±SD	Hmotnost (g)	±SD	Hmotnost (g)	±SD
12	0,0284	0,0006	0,0284	0,0006	0,0284	0,0006	0,0284	0,0006
14	0,0317	0,0043	0,0368	0,0037	0,0297	0,0006	0,0249	0,0011
16	0,0369	0,0004	0,0344	0,0013	0,0284	0,0026	0,0263	0,0054
19	0,0371	0,0004	0,0364	0,0027	0,029	0,0011	0,0229	0,0028
21	0,0377	0,0029	0,0386	0,0058	0,0332	0,004	0,0257	0,0017
23	0,0174	0,0007	0,0211	0,0047	0,0173	0,0027	0,0093	0,0005

5.3. Degradace Deloru 103 v kulturách *in vivo*

Byl studován biodegradační potenciál houby *T. versicolor* během kultivace v MEG a MM médiu s 10 mg/l Deloru 103 (počáteční koncentrace). Jako kontroly byly použity sterilizované kultury a výsledná degradace byla stanovena konečným porovnáním degradujících kultur s těmito kontrolami.

Jak je patrné z grafu (Obr. 15), rozsah degradace vybraných kongenerů Deloru 103 se pro jednotlivé kultivační podmínky lišil. Během kultivace na MEG médiu byl detekován průměrný úbytek PCB $32 \pm 6,7$ %. Nejlépe byly degradovány kongenery s třemi a čtyřmi atomy chloru na molekule. Částečnou degradaci těchto kongenerů ($11 \pm 4,3$ %) prokázala i rostoucí kultura *T. versicolor* v MM médiu (kultivace A), kdežto *T. versicolor* rostlý na MM médiu ve stacionární fázi růstu (kultivace B) neprokázal žádný statisticky prokazatelný biodegradační potenciál.



Obr. 15 *In vivo* degradace kongenerů Deloru 103 kulturou *T. versicolor*. Legenda odpovídá číslům jednotlivých kongenerů PCB (viz Tab. 1p). Prezentovaná data odpovídají průměru ze tří stanovení a vyznačené chybové úsečky směrodatné odchylce těchto stanovení.

5.4. *In vitro* degradace Deloru 103

Pro zjištění degradačního potenciálu extracelulárního enzymu lakasy u *T. versicolor* (kultivace A) byla provedena *in vitro* inkubace 10 mg/l Deloru 103 se zakonzentrovaným supernatantem z 8 a 12 dní starých houbových kultur. Inkubace probíhala po dobu 2 h. při 28 °C. Degradace PCB těmito supernatanty byla porovnávána proti kontrole (lakasová frakce deaktivovaná pomocí 50 mM NaN₃). V případě supernatantu z 8 dní starých kultur nebyla detekována degradace směsi PCB. Obdobně nebyla pozorována degradace PCB supernatantem Bio z 12. dne kultivace. Inkubace se supernatantem odebraným 12. den kultivace *T. versicolor* ukázala, že lakasa z kultury rostlé v médiu s Delorem 103 průměrně degraduje 16 ± 7 % PCB (Tab. 8). Měření lakasové aktivity vzorků po dvou hodinách *in vitro* inkubace ukázalo, že za daných podmínek došlo k úplné deaktivaci enzymové aktivity ve vzorcích, a inkubace vzorků proto byla ukončena.

Tab. 8 *In vitro* degradace Deloru 103 pomocí lakasy *T. versicolor*. Prezentovaná data odpovídají průměru ze tří stanovení; SD= směrodatná odchylka.

PCB kongener	8 dní staré supernatanty				12 dní staré supernatanty			
	Kultura Bio		Kultura D103		Kultura Bio		Kultura D103	
	%	±SD	%	±SD	%	±SD	%	±SD
4	3,42	5,67	0,16	2,23	-3,99	4,05	12,17	1,17
5+8	-1,49	3,43	1,77	0,93	-3,79	5,51	12,62	3,46
15	-0,6	4,71	-5,67	3,6	-1,6	7,9	14,42	3,65
28+31	4,95	3,13	-3,3	4,34	-3,14	6,69	13,2	3,51
33	0,63	9,85	-2,18	4,86	-8,54	7,52	13,31	2,95
22	-5,97	13,53	-0,98	4,78	-3,32	10,69	14,35	1,45
52	-2,35	5,71	-1,41	7,35	-4,26	7,09	16,77	6,05
37	-4,9	9,34	-0,53	7,1	-5,46	3,3	15,06	5,02
40	-2,3	15,08	3,24	11,88	-8,37	3,36	27,14	38,38
74	-6,48	11,35	-1,4	14,96	-7,26	8,35	16,14	8,89
56+60	-7,51	8,65	12,84	4,86	-9,43	14,77	21,69	4,41

Mínusové hodnoty vyjadřují, že hodnoty PCB stanovené ve vzorcích přesáhly hodnoty naměřené v příslušných kontrolách.

5.5. *In vitro* dekolorizace barviv

Dekolorizační potenciál extracelulárních enzymů *T. versicolor* byl studován *in vitro* s použitím zakoncentrovaných supernatantů z kultivace této houby obsahujících lakasu jako jediný detekovaný ligninolytický enzym. Výsledné hodnoty absorbance reakčních směsí po 10-ti hodinách inkubace (Tab. 9a,b) prokázaly, že lepší dekolorizační potenciál mají supernatanty odebrané 8. den kultivace, přičemž účinnější než enzymy D103 kultur jsou ty, které byly odebrány z kultur bez přidaného polutantu. Barviva Azure B a CuP nebyla statisticky prokazatelně dekolorizována žádným z testovaných supernatantů. Nejvyšší dekolorizace byla pozorována u barviva RBBR, kde bylo supernatantem z 8. dne kultivace Bio kultur dekolorizováno až 57 ± 24 % barviva. Přítomnost mediátorů HBA a HBT snižovala schopnost dekolorizace barviva supernatantem. Výjimkou je přítomnost mediátorů při dekolorizaci CuP Bio supernatantem z 12. dne kultivace, kde došlo vlivem jeho přítomnosti ke zvýšení dekolorizace o 12,5 %.

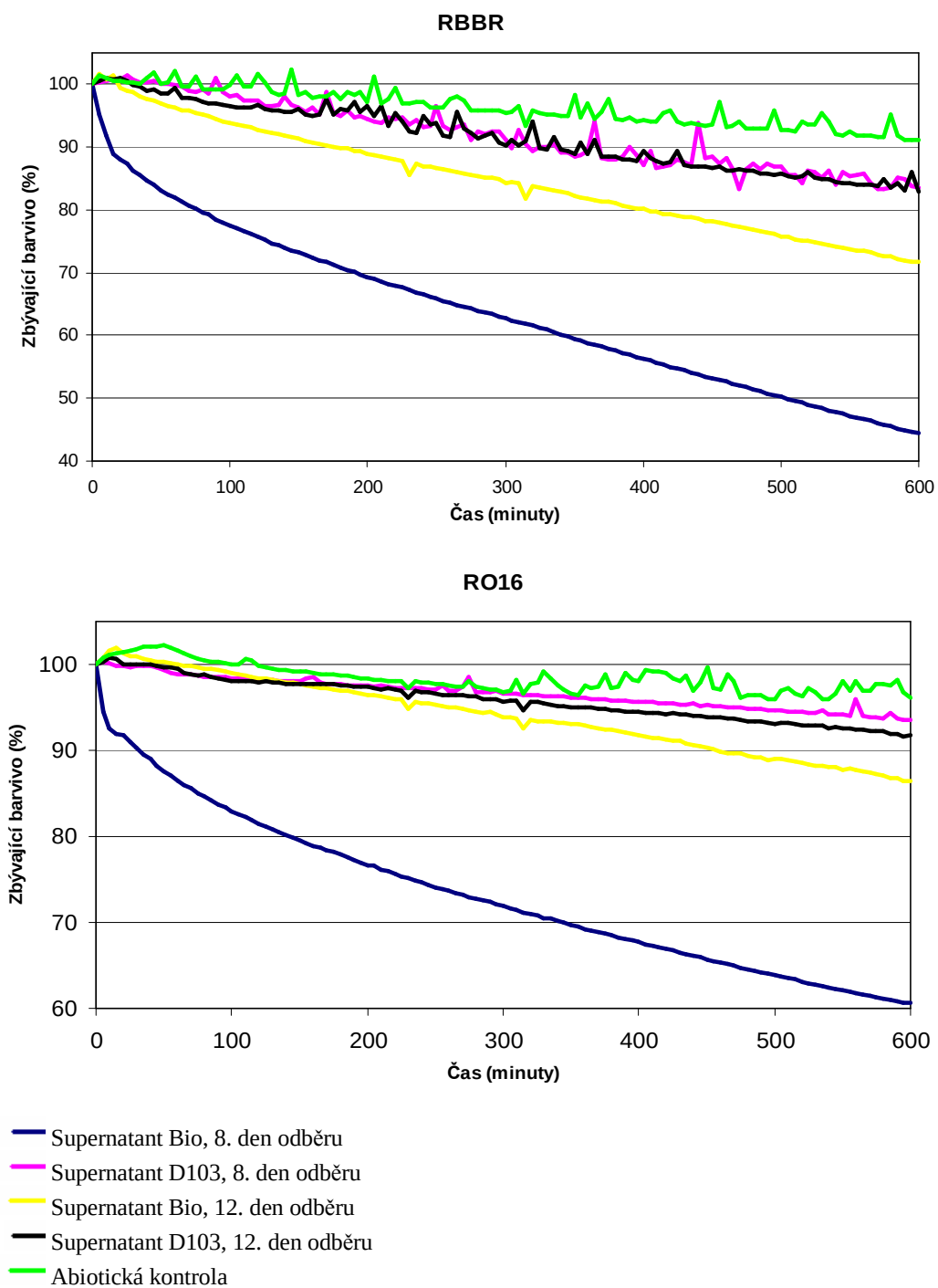
Tab. 9a *In vitro* dekolorizace barviv supernatantem *T. versicolor*. % udávají množství dekolorizovaného barviva v procentech; SD = směrodatná odchylka ze tří stanovení.

Typ použitého supernatantu, mediátor	RBBR				RO16			
	8 dní staré supernatanty		12 dní staré supernatanty		8 dní staré supernatanty		12 dní staré supernatanty	
	%	±SD	%	±SD	%	±SD	%	±SD
Bio	57,21	23,85	23,8	12,45	34,82	4,16	11,25	3
D103	18,13	2,04	10,53	1,22	0	0	3,16	0,84
Bio+HBA	41,4	10,66	19,46	6,97	31,15	4,54	9,21	2,84
Bio+HBT	35,18	8,8	21,01	1,26	35,25	1,91	11,52	1,87
D103+HBA	10,22	1,04	4,43	13,02	0	0	3,15	0,26
D103+HBT	14,41	0,59	6,47	5,35	0,27	2,23	3,85	1,08

Tab. 9b *In vitro* dekolorizace barviv supernatantem *T. versicolor*. % udávají množství dekolorizovaného barviva v procentech; SD= směrodatná odchylka ze tří stanovení.

Typ použitého supernatantu, mediátor	Azure B				CuP			
	8 dní staré supernatanty		12 dní staré supernatanty		8 dní staré supernatanty		12 dní staré supernatanty	
	%	±SD	%	±SD	%	±SD	%	±SD
Bio	0	0	0	0	0	0	5,95	15,77
D103	0	0	5,75	5,6	1,02	4,89	3,43	2,03
Bio+HBA	0	0	0	0	0	0	18,17	1,52
Bio+HBT	0	0	0,33	0,69	0,91	2,43	8,1	0,42
D103+HBA	0	0	0	0	0	0	4,18	2,12
D103+HBT	0	0	0	0	0	0	0	0

Při měření absorbance RBBR a RO16 v průběhu pokusu se ukázalo, že nejlépe barviva dekolorizují supernatanty Bio - odběr 8. den kultivace a to nejrychleji v průběhu prvních 20 minut inkubace. Po této době se rychlost dekolorizace snižuje (Obr. 16a,b). Ostatní supernatanty dekolorizovaly RBBR a RO16 bez výrazné změny v rychlosti reakce. V průběhu inkubace docházelo k téměř lineárnímu úbytku barviva. Vzhledem k absenci dekolorizačního potenciálu u barviva Azure B a CuP nejsou příslušné grafy uvedeny.



Obr. 16 a, b Průběh dekolorizace barviva RBBR a RO16 supernatanty z kultivace houby *T. versicolor*

5.6. Izoelektrická fokusace (IEF) lakasy *T. versicolor*

Ověření přítomnosti různých chromatografických forem enzymu lakasy v supernatantu houbových kultur *T. versicolor* bylo provedeno pomocí izoelektrické fokusace. Na IEF gel byly nanášeny aliquoty jednotlivých supernatantů v množství odpovídajícím 0,67 - 6,68 mU lakasové aktivity. Výsledky fokusace ukázaly (Tab. 10), že přítomnost Deloru 103 v kultivačním médiu stimuluje u houby v exponenciální fázi růstu (kultivace A) produkci více izoform enzymu lakasy, nejvíce při odběru 12. den kultivace, kdy byly na gelu rozděleny 3 izoformy tohoto enzymu. Ve stacionární fázi růstu byla v kulturách po přidání Deloru 103 detekována vždy jen jedna forma lakasy (viz Tab. 10).

Tab. 10 Izoelektrické body (pI) lakasy získané při různých kultivačních podmínkách *T. versicolor*. Je uvedeno množství enzymu, které bylo použito na fokusaci.

Den odběru supernatantu na analýzu	Kultury Bio		Kultury D103	
	Naměřené pI vzorku	Množství naneseného vzorku (U)	Naměřené pI vzorku	Množství naneseného vzorku (U)
Den 8 ^a	---	0,00067	3,65 3,70	0,00329
Den 12 ^a	4	0,00144	3,51 3,54 3,59	0,00668
Den 14 ^b	3,98	0,00496	3,7	0,00345
Den 16 ^b	3,93	0,00154	3,81	0,003
Den 19 ^b	3,70 3,88	0,00261	3,83	0,00379
Den 21 ^b	3,68	0,00135	3,77	0,00346

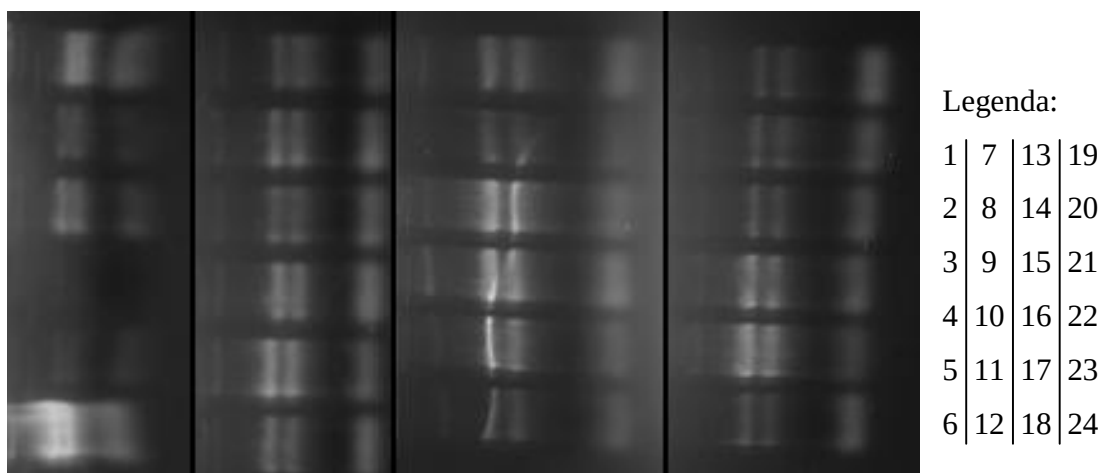
a... Kultivace A

b... Kultivace B

5.7. Exprese genů pro lakasy u houby *T. versicolor*

5.7.1. Izolace RNA

Celková RNA byla izolována z Bio a D103 kultur kultivace B na MM médiu. Mycélium pro izolaci bylo odebíráno z obou typů kultur 16., 18., 20. a 23. den kultivace. Jednotlivé izolace byly dělány v tripletech. Obr. 17 ukazuje, že izolací nebyla RNA výrazně poškozena a Tab. 11 uvádí množství a čistotu vyizolované RNA z mycelia.



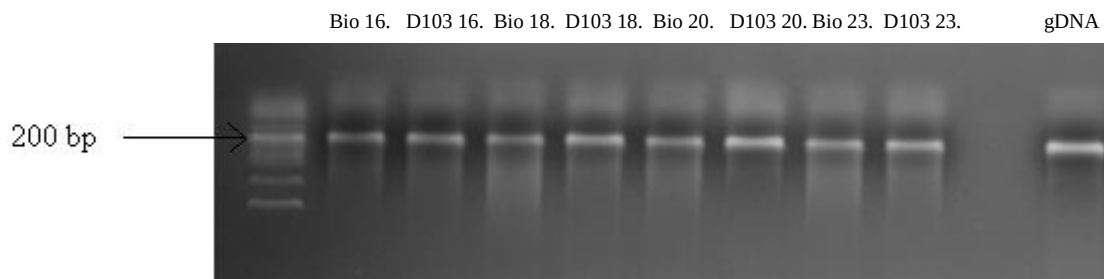
Obr. 17 Vyizolovaná RNA analyzovaná na agarosovém gelu. Pořadí vzorků odpovídá legendě. Čísla vzorků viz Tab. 11.

Tab. 11 Izolace RNA z mycélia *T. versicolor*. Čistota vzorku je dána poměrem absorbance 260 nm / 280 nm. Za čistý je vzorek považován, pokud je daná hodnota v rozmezí 1,8 – 2,0.

Číslo vzorku	Typ a den izolace vzorku	Množství izolované RNA (ng/μl)	Poměr absorbance 260nm/280nm
1	Bio 16.	40,20	2,01
2		139,70	1,94
3		51,20	2,05
4	D103 16.	9,00	1,90
5		32,10	1,85
6		43,20	1,81
7	Bio 18.	125,20	2,04
8		67,60	1,85
9		56,60	1,82
10	D103 18.	399,60	2,05
11		59,80	1,90
12		49,50	1,80
13	Bio 20.	134,00	2,00
14		62,60	2,05
15		117,40	1,97
16	D103 20.	447,50	1,86
17		185,80	1,95
18		95,00	1,87
19	Bio 23.	9,00	1,78
20		36,40	1,86
21		54,10	1,88
22	D103 23.	72,50	1,56
23		18,90	1,64
24		143,20	1,60

5.7.2. Reversní transkripce

Vzorky vyizolované RNA (viz. 5.7.1.) z mycélia *T. versicolor* (vždy 1 směsný vzorek dané paralely) byly ošetřeny DNasou a reversně přepsány do cDNA. Správnost přepisu byla ověřena pomocí PCR. Negativní výsledek kontrolní PCR s použitím primerů Cu1F a Cu2R a RNA jako templátu ukázal, že z RNA byla před přepisem odstraněna kontaminující gDNA. Pomocí stejných primerů pak byly z cDNA amplifikovány fragmenty genů kódujících lakasy o velikosti přibližně 200 bp (Obr. 18).

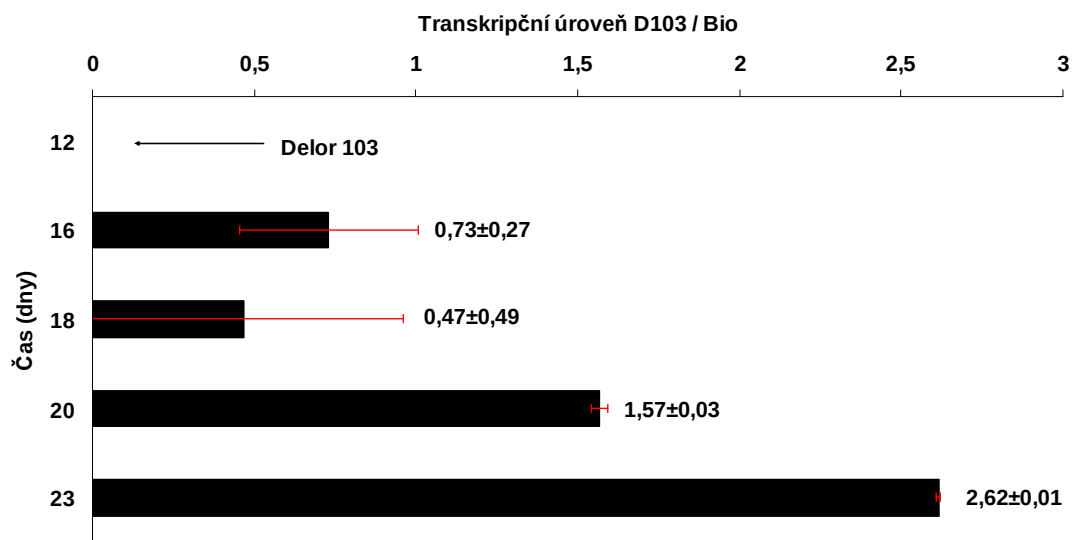


Obr. 18 Amplifikace genů kódujících lakasy z gDNA a cDNA *T. versicolor* pomocí primerů Cu1F a Cu2R. Označení vzorků odpovídá Tab. 11.

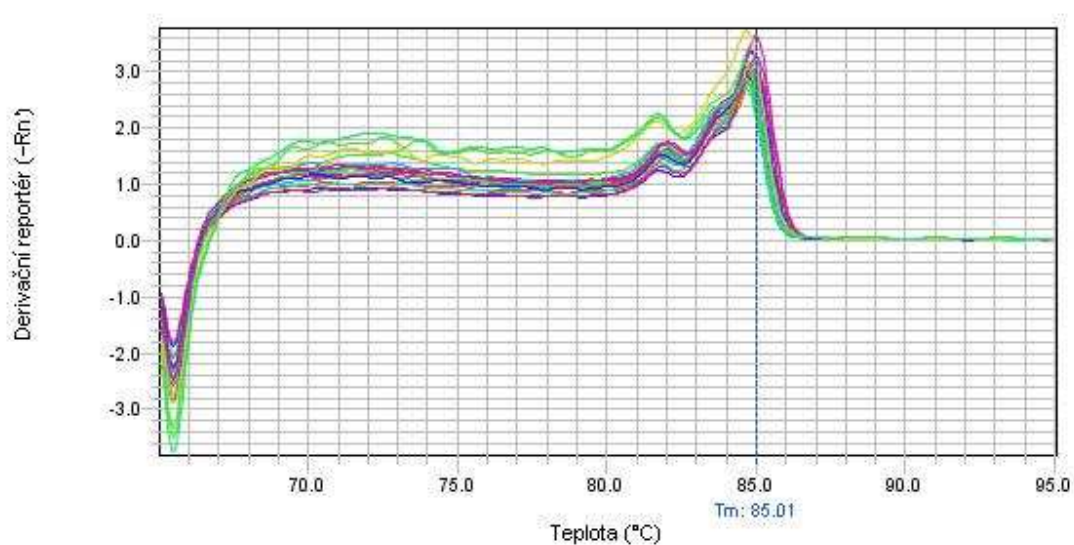
5.7.3. qPCR z cDNA *T. versicolor*

Hladina transkriptů genů pro lakasu byla testována za pomoci real-time qPCR, kdy byla porovnávána úroveň transkripce kontrolních kultur bez přidaného polutantu a kultur rostlých v médiu s Delorem 103 (kultivace B). Na normalizaci dat bylo použito stanovení hladiny transkriptů referenčního genu pro aktin. Na závěr qPCR cyklu byla provedena analýza tání dvoušroubovice, tzv. analýza melting curve (Obr. 20), která potvrdila, že ve všech reakcích byl amplifikován shodný PCR produkt.

Z Obr. 19 vyplývá, že se v počáteční fázi kultivace po přidání polutantu v kulturách snižuje (až 2x v případě 18. dne) transkripce genů pro lakasy. Ovšem 20. den kultivace je možné pozorovat nárůst transkripce, který dosahuje ve 23. den (11 dní po přidání polutantu) $2,62 \pm 0,01$ násobnou transkripci genu pro lakasu v kultuře s Delorem 103. Byla tak potvrzena schopnost Deloru 103 ovlivňovat produkci lakasy na úrovni transkripce genů.



Obr. 19 Porovnání transkripční úrovně genů pro lakasu v kulturách D103 / Bio *T. versicolor*



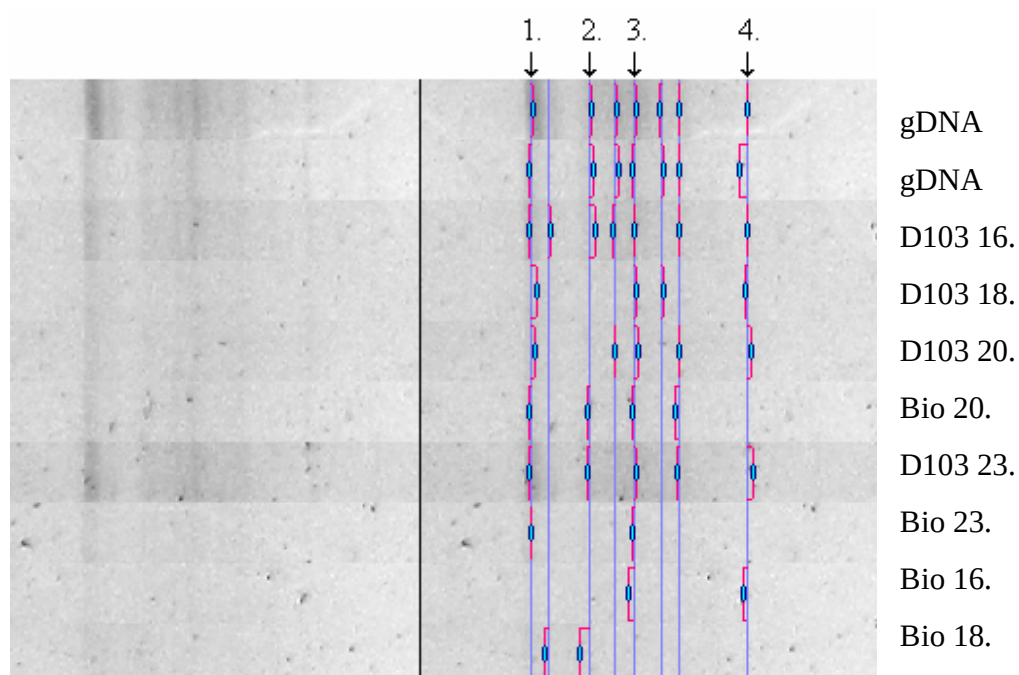
Obr. 20 Analýza tání dvoušroubovice DNA použité v pokusu pro stanovení transkripční úrovně genu pro lakasu *T. versicolor* za přítomnosti polutantu.

5.7.4. DGGE analýza exprese lakasových genů *T. versicolor*

Ze vzorků cDNA získaných z testovaných kultur byly amplifikovány geny pro lakasu, které byly následně analyzovány pomocí DGGE. Na gelu byly analyzovány směsné vzorky ze tří opakování každé PCR reakce (400 ng DNA). Reprodukovatelnost PCR výsledku a analýzy dotvrzuje 100 % podobnost dvou vzorků amplifikovaných paralelně z gDNA *T. versicolor*, které byly připravovány souběžně s přípravou samotných vzorků.

Kvalitativní analýza získaných proužků na gelu byla provedena pomocí programu BioNumerics verze 5.00, Applied Maths. Za proužek byl považován každý peak denzitometrické křivky přesahující svou plochou 5 % plochy pod celou křivkou jednotlivé dráhy gelu. V případě amplifikace gDNA bylo na gelu detekováno 7 rozdílných proužků (Obr. 21, dráha gDNA). U vzorků z D103 kultur počet detekovaných proužků činil 4 - 7, pro kontrolní Bio kultury pak 2 - 5 (Obr. 21). Proužky detekované v profilech Bio kultur byly ve stejných pozicích v gradientu denaturantu jako proužky z profilů D103 kultur, přičemž tyto profily obsahovaly navíc některé proužky nedetekované v profilech kontrolních kultur. Analýza vzájemné podobnosti profilů z Bio a D103 kultur (v Tab. 12 porovnávány vzorky ze stejného časového odběru) pak prokázala, že nejvyšší podobnost vykazují vzorky z 20. dne kultivace se zjištěnou hodnotou podobnosti 66,67 % .

Výsledky DGGE analýzy (Obr. 21) tedy naznačují, že přidání polutantu ke kultuře by mohlo vést i k přepisu v kontrolách netranskribovaných genů pro lakasu, zatímco vznikají současně i transkripty detekované u vzorků z kontrolních Bio kultur.



Obr. 21 DGGE analýza fragmentů genů pro lakasu amplifikovaných ze vzorků cDNA *T. versicolor* (označení vzorků odpovídá číslům vzorků uvedených v Tab. 11). V pravé části obrázku jsou dráhy gelu před analýzou, v levé části jsou pak na drahách vyznačeny proužky detekované pomocí BioNumerics v5.00. Číslem označené proužky byly osekvenovány.

Tab. 12 Podobnost (%) DGGE profilů transkriptů lakasových genů *T. versicolor* (označení vzorků odpovídá Tab. 11 a Obr. 21)

Podobnost vzorků Bio/D103 odebraných stejný den kultivace	
Vzorky	%
Bio 16./D103 16.	44,45
Bio 18./D103 18.	33,33
Bio 20./D103 20.	66,67
Bio 23./D103 23.	57,15

5.7.5. Sekvence PCR produktů vyizolovaných z DGGE gelu

PCR produkty získané z gelu DGGE (viz Obr. 21) byly klonovány do *E. coli* a sekvenovány pro zjištění jejich přesné sekvence. Tyto sekvence byly následně porovnány s NCBI databází a nejpříbuznější sekvence z databáze jsou pak uvedeny v Tab. 13. Ze srovnání jednotlivých drah DGGE gelu vyplývá, že se v Bio a D103 kulturách *T. versicolor* pravděpodobně rozdílně exprimovaly geny *lacA*, *lacB* a *lacC*.

Transkript genu *lacA* (proužek č.1) nebyl detekován v Bio kulturách v prvních dvou odběrech, zatímco v D103 kulturách byl detekován po celou dobu kultivace. Transkript č. 4 byl také detekován v profilu všech D103 kultur, ale chyběl v profilech Bio kultur z 18. - 23. dne kultivace. Transkripty odpovídající pravděpodobně genu *lacC* *Trametes* sp. AH 28-2 byly nalezeny v profilech všech testovaných kultur.

Tab. 13 Sekvence PCR produktů a jejich porovnání s NCBI databází. Značení proužků odpovídá Obr. 21.

Proužek	Sekvence 5'-3'	Výsledek srovnání s NCBI databází (blastn)		
		Přístupové číslo (NCBI)	Popis	Podobnost
1.	TAGAGCCATTGGCGGAGGTCTGCGTTCGTGAACCA GTGCCCAGTCGCGTCTGGGCATTTCCTGTACG ACTTCCAGGTTCCGGATCAGGCCGGTAAGTTATAAC CGTGTGCGTAGCCCGGTGACGCGCTCATGAGGATC TTAGGAACCTTCTGGTACCACAGCCA	AY839936.1	<i>Trametes</i> sp. AH28-2 laccase A (<i>lacA</i>) gen, kompletní kódující sekvence	97%
2.	CACTGGCATGGGTTCTTCCAGAAGGGCACCAACTG GGCGGACGGCCCTGCGTTCGTGAACCAAGTGCCCG ATAGCCACTGGCCATTTCCTCTATGACTTTTCAG GTCCCCGATCAGGCCGGTAAGTTATAACCGTGTGC GTAGCCCGGTGACGCGCTCATGAGGATATTAGGCA CCTTCTGGTACCAACAGTCATCGGATCCCCGGGTA CCGAGCTCGAATTCATGGGCCGTCGTTTACAACGT CGTGAAGTGG	AY839937.1	<i>Trametes</i> sp. AH28-2 laccase C (<i>lacC</i>) gen, částečná kódující sekvence	81%
3.	GGCCCCCTGGCCGCAGGGCCCTGCGTTCGTGAAC CAGTGCCCGATCGCCACGGGGCACTCGTTCCTGTGA CGACTTCCACGTCCCTGATCAGGCCGGTAAGTCAT TTCCGTCTTCGCCCTCCGCATCCTCTT TTGACATGATTACAGGATCCTTACGTTACCGCACCCA ACCCAA	AY839937.1	<i>Trametes</i> sp. AH28-2 laccase C (<i>lacC</i>) gen, částečná kódující sekvence	95%
4.	CGCGCTTCGGCCGCATGCTCGCGCCTTCGTGACCA GTGCCCCATCTTCGTCTGGGAAACTCGTTCCTGTAC GATTTACCGTCCCTGATCAGGCCGGTATGTCATTT CGTCCGCCCGGGTGCGCATCATCTTCTGACGCATA TTCGGGATAGGGACCTTCTGGTACCACAGCCAAGT C	AY846842.1	<i>Trametes</i> sp. AH28-2 laccase B (<i>lacB</i>) gene, kompletní kódující sekvence	90%

6. DISKUSE

Recentní vědecké práce se v poslední době zabíraly prověřováním potenciální endokrinní aktivity látek a vývojem k tomu potřebných testů, které by umožnily hodnocení rizik i u reálných environmentálních vzorků (SVOBODOVÁ a CAJTHAML 2010). *In vitro* testy založené na rekombinantních kvasinkových kmenech jsou schopné předpovědět schopnost látek reagovat s hormonálními receptory a ovlivňovat jimi řízenou genovou expresi. Přestože FOLMAR *et al.* (2002) ve své práci popsal, že *in vitro* testy jsou méně citlivé než *in vivo* vitelogeninový test na rybě *Cyprinodon variegatus*, *in vitro* testy se ukázaly jako rychlá a vhodná metoda k testování environmentálních vzorků (MICHELINI *et al.* 2005).

V první části této práce byl testován Delor 103, jakožto komerční směs PCB, a jeho potenciální metabolity z bakteriální degradace chlorbenzoové kyseliny a chlorfenoly (PIEPER a SEEGER 2008) na svou endokrinní aktivitu. Dle naměřených hodnot z bioluminiscentního testu vykazoval Delor 103 androgenní aktivitu (29x nižší než než standard testosteron). Jeho estrogenní charakter byl velice nízký a v případě bioluminiscentního testu byl pod detekčním limitem pro tento test. Směs chlorbenzoových kyselin vykazala oběma stanovovanými testy estrogenní aktivitu, přičemž při jednotlivém testování složek směsi bylo zjištěno, že estrogenní aktivitu vykazují jednochlorované kyseliny, 2,3-ClBA a dvě trichlorované kyseliny. Ani jedním z testů se nepotvrdila hormonální aktivita chlorfenolů. Výsledky naměřené estrogenní aktivity Deloru 103 ukázaly odlišnou citlivost dvou testů. β -galaktosidázové a bioluminiscentní testy se obecně od sebe liší citlivostí, kdy luminiscentní test patří mezi ty citlivější (viz SVOBODOVÁ a CAJTHAML 2010). Výsledky také napovídají, že během mikrobiální degradace Deloru 103 bude pravděpodobně docházet ke změnám hormonální aktivity látky z androgenního charakteru na estrogenní, budou-li degradací tohoto polutantu vznikat chlorbenzoové kyseliny. Dosud byla popsána především estrogenní, anti-estrogenní a thyroidní aktivita u hydroxylovaných PCB látek (SHIRAISHI *et al.* 2003, LAYTON *et al.* 2002). Výsledky této práce tak rozšiřují znalosti o hormonálním potenciálu PCB látek.

V této práci byl dále studován profil lakasové aktivity u houby *T. versicolor* během kultivace s Delorem 103. Lakasy byly v mnoha pracích popsány jako důležité enzymy účastníci se biodegradace organopolutantů (POINTING 2001). Nejlépe charakterizovanými lakasami jsou právě ty, které produkuje kultura *T. versicolor*. Bylo popsáno, že přítomnost některých chemických sloučenin stimuluje v kultuře zvýšenou produkci tohoto enzymu. Příkladem je DMP (GIANFREDA *et al.* 1999) nebo 2,5-xilidin, jehož přidání ke kulturám *T. versicolor* vedlo až k 5x zvýšené aktivitě lakasy v kultivačním médiu (BOURBONNAIS *et al.* 1995). Přítomnost 10 mg/l Deloru 103 u kultur *T. versicolor* také stimulovala zvýšení produkce aktivního enzymu, přičemž tento výsledek byl výraznější (62x vyšší – porovnání kultur stejné růstové fáze) v MM médiu oproti komplexnímu MEG médiu (viz Obr. 10 a 11). Tyto výsledky odpovídají práci EGGERT *et al.* (1996), kde bylo prokázáno, že *T. versicolor* vyžaduje pro expresi ligninolytických enzymů nízké koncentrace dusíku. V práci NYANHONGO *et al.* (2002) koncentrace glukosy v kultivačním médiu vyšší než 1 g/l působila inhibičně na produkci lakasy u houby *Trametes modesta*. V této práci však i přes přítomnost glukosy v koncentraci 10 g/l bylo pozorováno výrazné navýšení hladiny lakasy v supernatantu kultur *T. versicolor* a to až o 1436 U/g oproti kontrole v osmý den kultivace houby v MM médiu. Naopak při kultivaci *T. versicolor* s TNT bylo výraznější zvýšení enzymatické aktivity pozorováno na komplexním médiu (CHEONG *et al.* 2006). V tomto případě byla zvýšená aktivita enzymu pozorována především v časných stádiích kultivace – po prvních 6-ti hodinách.

Velký rozdíl v ovlivnění hladiny lakasy u kultur rostlých v MM médiu byl pozorován také v závislosti na růstové fázi, ve které se houba při přidání polutantu nacházela. Vyšší stimulace produkce enzymu byla sledovaná u kultur ve fázi růstu, kde maximální množství naměřené lakasy bylo 1440 ± 272 U/g, což bylo 257x více než v kontrolních kulturách (Obr. 11). V případě stacionární kultury byla také patrná stimulace lakasy Delorem 103, ovšem průměrné množství aktivní lakasy v supernatantu kultur dosahovalo pouze šestinásobku oproti kontrole (Obr. 13). V případě stacionární kultury se také prokázal pozitivní vliv chlorbenzoových kyselin, které stimulovaly 8,5x zvýšenou produkci lakasy. V ostatních případech nebyl prokázán žádný signifikantní vliv ClBA a ClP na produkci enzymů u *T. versicolor*. Produkce MnP byla polutanty ovlivněna pouze

velice mírně. Obdobně k výsledkům této práce byla rozdílná produkce enzymu lakasy v závislosti na růstové fázi kultury pozorována i u kultury *Corioloropsis rigida* LPSC No. 232 (SAPARRAT *et al.* 2010). Ve stacionárních kulturách *T. versicolor* byla v přítomnosti ClBA navíc pozorována vedle efektu na produkci LME také pigmentace mycélia (viz Obr. 1p v příloze).

U studovaných kultur byl také testován jejich potenciál k degradaci Deloru 103. Z *in vivo* pokusů vyplývá, že nejlépe degradující kulturou byla rostoucí kultura z MEG média, u které byl naměřen po 12-ti dnech kultivace průměrný úbytek jednotlivých PCB kongenerů $32 \pm 6,7 \%$ (Obr. 15). Rostoucí kultura z MM média byla také schopná alespoň částečně degradovat tuto látku ($11 \pm 4,3 \%$), ovšem v případě stacionární kultury z MM média nebyl pozorován žádný statisticky průkazný úbytek tohoto polutantu během kultivace.

U *T. versicolor* byla již dříve popsána schopnost degradovat strukturně blíže neurčenou směs PCB látek z půdy okolí Mexico city (RUIZ-AGILAR *et al.* 2002). Byla prokázána schopnost *T. versicolor* degradovat koplánární kongenery PCB pomocí extracelulárních enzymů (TAKAMIYA *et al.* 2008). Dále FUJIIHIRO *et al.* (2009) popsal rozdílnou substrátovou specifitu jednotlivých lakasových isoenzymů *T. versicolor* k hydroxylovaným PCB. Naměřená data degradace Deloru 103 kulturami *T. versicolor* v této práci však nekorelují se zjištěným navýšením množství aktivního enzymu lakasy v kultivačním médiu. Nejvyšší lakasová aktivita byla naměřena v rostoucích kulturách z MM média, avšak nejlépe Delor 103 degradovaly kultury rostlé v MEG médiu. V případě stacionární kultury z MM média lze pak diskutovat, nač se v kultuře v přítomnosti Deloru 103 zvyšuje množství aktivního enzymu v médiu, když kultury vykazaly pouze limitovanou schopnost degradace Deloru 103, a zda je opravdu kultura tímto polutantem stimulována a nejedná se pouze o zvýšenou stabilitu enzymu v supernatantu, jak to mu bylo v práci MAI *et al.* (2000), kde přítomnost fenolických látek stabilizovala lakasu *T. versicolor*. Obecně u hub je lakasa enzymem, který se neúčastní pouze biodegradací, ale podílí se i na dalších fyziologických dějích (LEONOWICZ *et al.* 2001). V případě stacionárních kultur *T. versicolor* by lakasa mohla houbě napomáhat s ochranou mycélia proti polutantu, účastnit se tvorby plodnice nebo napomáhat při případné pigmentaci mycélia.

U stacionárních kultur z MM média byla dále studována produkce lakasy na úrovni transkripce lakasu kódujících genů s cílem prokázat vliv Deloru 103 na expresi lakasy. Lakasu produkující houby mohou syntetizovat množství izoenzymů lakasy kódovaných multigenovými rodinami. Některé izoenzymy mohou být exprimovány kontinuálně a jiné jako odpověď na regulační signály (MISSALL *et al.* 2005, CANERO a RONCERO 2008). Již dříve bylo potvrzeno, že po přidání určitých polutantů dochází k indukci transkripce genů pro ligninolytické enzymy. TAKAMIYA *et al.* (2008) ve své práci studoval expresi genů pro ligninolytické enzymy *T. versicolor* v přítomnosti bisfenolu A. Geny pro LiP se transkribovaly 10x více v přítomnosti bisfenolu A oproti kontrolním kulturám. Geny pro lakasu vykázaly 2,3x navýšení transkripce enzymu a u genů pro MnP došlo naopak k represí transkripce. Zvýšená transkripce genů pro lakasu byla pozorována i u kultury *Trametes* sp. I-62 v přítomnosti kyseliny p-kumarové a guiacolu (TERRON *et al.* 2004). S těmito výsledky souhlasí hodnoty naměřené v této práci. Delor 103 v kulturách *T. versicolor* indukoval v pozdější fázi kultivace vyšší transkripci genů pro lakasu a to až 2,62x více oproti kontrolním kulturám. V prvních dnech po přidání Deloru 103 ke kulturám docházelo naopak k mírné represí celkové transkripce lakasových genů, což souhlasí s naměřenými aktivitami lakasy v supernatantech studovaných kultur (Obr. 19) a ukazuje tak souvislost měřených enzymových aktivit se studovanými geny. Opožděný nástup indukce genové transkripce by mohl naznačovat, že transkripce by mohla být v kulturách vedle původní látky Deloru 103 ovlivňována i některým metabolitem vznikajícím degradací Deloru 103. Byť degradace Deloru 103 stacionárními kulturami *T. versicolor* v MM médiu nebyla v této práci signifikantní, pozorovaný nárůst lakasové aktivity by mohl být způsoben vznikajícími ClBA, u nichž byl také zjištěn stimulační efekt na produkci lakasy u *T. versicolor* (Obr. 13).

DGGE analýza lakasových transkriptů vznikajících v *T. versicolor* kulturách a amplifikovaných degenerovanými primery navíc naznačila, že přidáním Deloru 103 mohlo dojít i ke kvalitativnímu ovlivnění transkripce genů pro lakasu. V Delorem 103 ovlivněných kulturách byly nalezeny transkripty (proužky na DGGE gelu) vznikající i v kontrolních kulturách, tak i další transkripty, které v kontrolách nalezeny nebyly. Tyto výsledky nelze srovnat z dostupnou literaturou, protože tato metoda analýzy genů pro lakasu byla v této práci provedena poprvé.

Sekvenace transkriptů z genomické DNA prokázala, že se v kulturách *T. versicolor* v této práci přepisovaly geny vykazující 81- 97 % podobnost s geny *lacA*, *lacB* a *lacC* *Trametes* sp. AH28-2. Expres těchto genů by tedy měla být dále studována odděleně pomocí specifických PCR primerů, aby bylo možné blíže specifikovat míru jejich exprese. Obdobně totiž LORENZO *et al.* (2006) ukázal, že *T. versicolor* produkoval dvě izoformy lakasy v různém vzájemném poměru v odpověď na přítomnost těžkých kovů, což následně ovlivnilo schopnost houby dekolorizovat textilní barvivo Indigo Carmine.

Studium produkce jednotlivých chromatografických forem lakas kulturou *T. versicolor* v závislosti na přítomnosti Deloru 103 prokázalo, že polutant stimuluje v pozdějších fázích kultivace v rostoucí kutuře *T. versicolor* produkci až 3 izoform tohoto enzymu. Tyto izoformy měly *pI* (*pI* = 3,5 – 3,6) nižší než forma nalezená v supernatantu kontrolní kultury (*pI* = 4,0). Ve stacionární kultuře nedošlo v přítomnosti polutantu k produkci více chromatografických forem enzymu, ovšem *pI* produkovaných enzymů bylo vždy jiné než *pI* enzymů zjištěných v supernatantu kontrol (Tab. 10). Je zde tedy patrný vliv Deloru 103 na produkci enzymů o různém *pI*. Mimo ovlivnění transkripce genů pro lakasu, tyto rozdíly v *pI* proteinů by mohly být způsobeny posttranslačními modifikacemi proteinů.

Výsledky této práce jsou ve shodě se studiem produkce MnP u houby *I. lacteus*, kde přítomnost organických barviv měla za následek produkci různých izoform enzymu o vyšším *pI*, které vykazaly lepší schopnost katalyzovat dekolorizaci barviv (ŠUŠLA a SVOBODOVÁ 2008). FUJIHIRO *et al.* (2009) ve své práci zjistil, že kultura *T. versicolor* produkuje během kultivace s PCB látkami 2 skupiny lakas, které jsou charakteristické přítomností několika forem enzymu o *pI* v rozmezí 5,0 - 6,0 (skupina 1), respektive 3,0 - 4,0 (skupina 2). V této práci všechny detekované izoformy enzymu spadají do skupiny 2, která je charakterizována nižším oxidačním potenciálem vůči hydroxylovaným PCB (FUJIHIRO *et al.* 2009). V rámci této skupiny byla v této práci ovšem zjištěna vysoká rozmanitost *pI* forem enzymu v závislosti na přítomnosti polutantu v kultivačním médiu a době jeho přidání ke kulturám.

U supernatantů z kultur *T. versicolor* byl také testován jejich biodegradační potenciál. Z modelových syntetických barviv bylo dosaženo nejúspěšnější dekolorizace v případě antrachinonového barviva RBBR. Tento výsledek je podpořen prací WONG a YU (1999), která ukázala, že antrachinonová barviva jsou v rámci organických barviv pro lakasu *T. versicolor* nejlepším substrátem. Nejúčinněji dekolorizující supernatant byl odebrán z Bio kultur 8. den kultivace. Tento supernatant byl za 10 h. kultivace schopen dekolorizovat $57,21 \pm 21,85$ % RBBR oproti stejně starým supernatantům z D103 kultur s maximální dekolorizací $18,13 \pm 2,04$ %. Supernatanty odebrané 12. den kultivace vykázaly dekolorizační potenciál o polovinu nižší. Dalším barvivem, které byly supernatanty dále schopné dekolorizovat bylo azobarvivo RO16. Toto barvivo bylo ovšem dekolorizováno pouze za pomoci supernatantů z kontrolních Bio kultur a to opět lépe supernatantem z 8. dne kultivace (dekolorizace $34,82 \pm 4,16$ % barviva). U ostatních barviv nebyla pozorována žádná signifikantní dekolorizace. V dekolorizačních pokusech byl dále pozorován žádný nebo mírně inhibiční vliv nízkomolekulárních mediátorů (HBT, HBA) na průběh dekolorizace (Tab. 9a,b), což kontrastuje s výsledky práce TORRES *et al.* (2003), kde přítomnost HBT v inkubační směsi výrazně zvýšila dekolorizační potenciál supernatantu z kultivace *T. versicolor*. Výjimkou byla v této práci dekolorizace CuP supernatantem z 12 dní starých kontrolních kultur, u které došlo ke zvýšení v přítomnosti HBA.

Souhrně lze tedy říci, že obdobně jako v případě produkce MnP u *I. lacteus* ovlivněné syntetickými barvivy (ŠUŠLA a SVOBODOVÁ 2008) vedlo přidání Deloru 103 ke kulturám *T. versicolor* k produkci forem lakas o jiném pI a k negativnímu ovlivnění dekolorizačního potenciálu sekretovaných extracelulárních enzymů. Obdobně v důsledku změn pI profilu produkovaných lakas v průběhu jednotlivých kultivací pak docházelo v průběhu kultivací také ke změnám dekolorizačního potenciálu enzymů. Bylo také prokázáno, že dekolorizace barviv se u hub bílé hniloby neúčastní pouze LME, ale mnohem lepších výsledků je dosahováno při jejich kooperaci s dalšími, intracelulárními enzymy (BLÁNQUEZ *et al.* 2004), což by vedle dekolorizačního potenciálu lakas mohlo ještě dále ovlivnit *in vivo* potenciál *T. versicolor* k dekolorizaci barviv.

Výsledky z pokusu *in vitro* degradace Deloru 103 ukázaly přesně opačný degradační potenciál supernatantů než tomu bylo v případě syntetických barviv. Ukázalo se, že jediným supernatantem schopným degradace tohoto polutantu byl supernatant z 12. dne kultivace D103 kultur (průměrná degradace 16 ± 7 % sledovaných kongenerů). Vzhledem k rozdílnému zastoupení chromatografických forem lakasy v supernatantech, bylo tedy opět prokázáno, že rozdílné izoformy enzymu vykazují rozdílné katalytické schopnosti. Enzymy, které katalyzovaly degradaci Deloru 103, měly *pI* kolem 3,5 - 3,6 a k jejich produkci byla vyžadována přítomnost Deloru 103 v kulturách od počátku kultivace. Oproti tomu nejlépe dekolizujícím supernatantem byl ten, který obsahoval izoenzymy lakasy o *pI* kolem 3,8 – 4,0 a pocházel z kontrolních kultur kultivovaných bez přidání Deloru 103.

Z výsledků této práce tedy vyplývá, že přítomnost Deloru 103 v kultivačním médiu *T. versicolor* silně ovlivňuje fyziologii kultury a stimuluje rozdílnou produkci enzymu lakasy oproti kontrolním kulturám a to v závislosti na množství živin v médiu i růstové fázi houbových kultur. Současně se změnami enzymového vybavení kultur pak dochází ke změnám biodegradačního potenciálu *T. versicolor*. V další práci je třeba ověřit, na jaké úrovni je Delorem 103 ovlivněna rostoucí kultura této houby a výsledky porovnat se získanými poznatky o stacionární kultuře.

7. SOUHRN

Prvním cílem této práce bylo studium hormonální aktivity Deloru 103 a jeho potenciálních metabolitů, chlorfenolů a chlorbenzoových kyselin, pomocí *in vitro* kvasinkových reportérových systémů.

- Delor 103, dle naměřených hodnot, vykazoval androgenní charakter a také slabě estrogení charakter. Směs chlorbenzoových kyselin vykazovala oběma použitými testy estrogení aktivitu. Z jednotlivých složek směsi byla pak estrogení aktivita zjištěna u monochlorovaných kyselin, 2,3-ClBA a dvou trichlorovaných kyselin. Chlorfenoly nevykazaly žádnou hormonální aktivitu a to ani jako směs látek, ani jako jednotlivé složky směsi.
- Výsledky naměřené estrogení aktivity Deloru 103 ukázaly odlišnou citlivost dvou používaných testů (bioluminiscentní a β -galaktosidázový test). Výsledky také napovídají, že během mikrobiální degradace Deloru 103 bude pravděpodobně docházet ke změnám hormonální aktivity látky z androgenního charakteru na estrogení, budou-li degradací tohoto polutantu vznikat chlorbenzoové kyseliny.

Druhým cílem práce bylo popsat vliv Deloru 103 a jeho potenciálních metabolitů na produkci ligninolytických enzymů *T. versicolor* za různých kultivačních podmínek.

- Delor 103 stimuluje v kulturách *T. versicolor* zvýšení lakasové aktivity. Velký vliv na produkci enzymů byl pozorován v závislosti na složení kultivačního média. V dusíkem limitovaném médiu došlo až k 257x zvýšení aktivity lakasy. Tento stimulační efekt byl částečně potlačen v komplexním médiu. Vyšší indukční efekt Deloru 103 na produkci lakasy byl pozorován také v kultuře v exponenciální fázi růstu oproti stacionárním kulturám.
- Z potenciálních metabolitů Deloru 103 ClBA také mírně zvyšují lakasovou aktivitu v houbových kultuách, produkce MnP byla však chemikáliemi ovlivněna pouze v rostoucích kulturách.

Třetím cílem bylo studovat vlastnosti stimulovaných lakas *T. versicolor* (*pI*, *in vitro* degradační potenciál) a profil exprese genů kódujících tento enzym u *T. versicolor*.

- Degradace Deloru 103 byla v *in vivo* kulturách pozorovatelná především v MEG médiu (úbytek PCB $32 \pm 6,7$ %). V MM médiu degradovala Delor 103 kultura v exponenciální fázi růstu ($11 \pm 4,3$ %), u stacionárních kultur nebyla degradace statisticky prokazatelná. Degradace Deloru 103 kulturami nekorelovala s naměřenými aktivitami lakasy v supernatantech kultur, což naznačuje účast i jiných faktorů v degradaci této látky, případně také jinou funkci lakas v stacionárních nedegradujících kulturách.
- Indukce produkce lakasy Delorem 103 na transkripční úrovni byla prokázána ve stacionárních MM kulturách pomocí kvantitativní real-time PCR. Zjištěné transkripční hladiny genů kódujících lakasy korelovaly s naměřenými aktivitami enzymu v studovaných kulturách. DGGE profily transkriptů se lišily mezi kontrolními a Delorem 103 ovlivněnými kulturami, což by mohlo naznačovat, že se v kulturách po přidání Deloru 103 tvoří i jiné transkripty než v kontrolách.
- Delorem 103 indukované lakasy vykazaly vyšší rozmanitost *pI* forem oproti enzymům kontrol. Lakasy indukované Delorem 103 mají izoelektrický bod mezi 3,0 - 4,0. Delor 103 nejlépe degradovaly izoformy o *pI* mezi 3,5 – 3,6. Ostatní zjištěné izoformy enzymu nevykázaly degradační potenciál za daných podmínek. Dekolorizace barviv byla lépe katalyzována formami lakasy s vyšším *pI* (3,8 - 4,0).
- Přidání Deloru 103 ke kulturám *T. versicolor* vedlo tedy k produkci forem lakas o jiném *pI* a k negativnímu ovlivnění dekolorizačního potenciálu sekretovaných extracelulárních enzymů. Obdobně v důsledku změn *pI* profilu produkovaných lakas v průběhu jednotlivých kultivací pak docházelo v průběhu kultivací také ke změnám dekolorizačního potenciálu enzymů. K syntéze lakas schopných degradovat Delor 103 bylo zapotřebí přidání Deloru 103 ke kulturám na počátku jejich růstu.

8. SEZNAM LITERATURY

1. Abramowicz, D.A. (1990): Aerobic and anaerobic biodegradation of PCBs. A review. *Critical Reviews in Biotechnology* 10: 241–250.
2. Argyropoulos, D.S. and Menachem, S.B. (1997): Lignin. In K.-E. Eriksson (ed.). *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology* 57: 127- 158.
3. Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Tyagi, R.D., Adams, C.D. (2007): Laccase-catalyzed conversion of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater. *Water Research* 41: 3281-3288.
4. Baldrian, P. (2006): Fungal laccases - occurrence and properties. *Fems Microbiology Reviews* 30: 215-242.
5. Baldrian, P., Valášková, V., Merhautová, V., Gabriel, J. (2005): Degradation of lignocellulose by *Pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc. *Research in Microbiology* 156: 670-676.
6. Ballschmiter, K., Zell, M. (1980): Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography. *Fresenius Zeitschrift fur Analytische Chemie* 302: 20-31.
7. Ballschmiter, K., Bacher, R., Mennel, A., Fischer, R., Riehle, U., Swerev, M. (1992): The determination of chlorinated biphenyls, chlorinated dibenzodioxins, and chlorinated dibenzofurans by GC-MS. *HRC-Journal of High Resolution Chromatography* 15: 260-270.
8. Bar-Nun, N., Mayer, A.M. (1990): Cucurbitacins protect cucumber tissue against infection by *Botritis cynerea*. *Phytochemistry* 29: 787-791.
9. Bastos, A.C., Magan, N. (2009): *Trametes versicolor*: Potential for atrazine bioremediation in calcareous clay soil, under low water availability conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63: 389-394.
10. Bautista, L.F., Morales, G., Sanz, R. (2010): Immobilisation strategies for laccase from *Trametes versicolor* on mesostructured silica materials and the application to the degradation of naphthalene. *Bioresource Technology* 101: 8541-8548.
11. Bento, I., Martins, L.O., Lopes, G.G., Carrondo, M.A., Lindley, P.F. (2005): Dioxygen reduction by multi-copper oxidases; a structural perspective. *Dalton Transactions* 21: 3507-3513.
12. Bertrand, G. (1896): Sur la presence simultanee de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences* 123: 463-465.

13. Bertrand, T., Jolival, C., Caminade, E., Joly, N., Mougin, C., Briozzo, P. (2005): Purification and preliminary crystallographic study of *Trametes versicolor* laccase in its native form. *Acta Crystallographica section D-Biological Crystallography* 58: 319-321.
14. Bes, B., Pettersson, B., Lennholm, H., Iversen, T., Eriksson, K.E. (1987): Synthesis, structure, and enzymatic degradation of an extracellular glucan produced in nitrogen-starved culture of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 9: 310-318.
15. Blázquez, P., Casas, N., Font, X., Gabarrell, X., Sarra, M., Caminal, G., Vicent, T. (2004): Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*. *Water Research* 38: 2166-2172.
16. Blázquez, P., Guieysse, B. (2007): Biodegradation of estrogenic compounds by white rot fungi. *Journal of Biotechnology* 131: S244-S245.
17. Bourbonnais, R., Paice, M.G., Reid, I.D., Lanthier, P., Yaguchi, M. (1995): Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1876-1880.
18. Boyle, J.S., Lew, A.M. (1995): An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends in Genetics* 1: 8.
19. Brzozowski, A.M., Pike, A.C.W., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G.L., Gustafsson, J.A., Carlquist, M. (1997): Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389: 753-758.
20. Burke, R.M. a Cairney, J.W.G. (2002): Laccases and other polyphenol oxidases in ecto- and ericoid mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 12: 105-116.
21. Cabana, H., Jones, J.P., Agathos, S.N. (2007): Elimination of endocrine disrupting chemicals using white rot fungi and their lignin modifying enzymes: A review. *Engineering in Life Sciences* 7: 429-456.
22. Cajthaml, T., Křesinová, Z., Svobodová, K., Moeder, M. (2009): Biodegradation of endocrine-disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi. *Chemosphere* 75: 745-750.
23. Canero D. C., Roncero, M.I.G. (2008): Functional analyses of laccase genes from *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 98: 509-518.
24. Casas, N., Parella, T., Vicent, T., Caminal, G., Sarrà, M. (2009): Metabolites from the biodegradation of triphenylmethane dyes by *Trametes versicolor* or laccase. *Chemosphere* 75: 1344-1349.

25. Cheong, S., Yeo, S., Song, H.G., Choi, H.T. (2006): Determination of laccase gene expression during degradation of 2,4,6-trinitrotoluene and its catabolic intermediates in *Trametes versicolor*. *Microbiological Research* 161: 316-320.
26. Claus, H. (2003): Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archives of Microbiology* 179: 145-150.
27. Claus, H., Faber, G., Konig, H. (2002): Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59: 672-678.
28. Clutterb, A.J. (1972): Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology* 70: 423-435.
29. De Souza, C.G.M., Tychanowicz, G.K., De Souza, D.F., Peralta, R.M. (2004): Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds. *Journal of Basic Microbiology* 44: 129-136.
30. De, S., Pramanik, S.K., Williams, A.L., Dutta, S.K. (2004): Toxicity of polychlorobiphenyls and its bioremediation. *International Journal of Human Genetics* 4: 281-190.
31. deJong, E., Cazemier, A.E., Field, J.A., Debont, J.A.M. (1994): Physiological-Role of Chlorinated Aryl Alcohols Biosynthesized De-Novo by the White-Rot Fungus *Bjerkandera* Sp. Strain Bos55. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 271-277.
32. Duran, N., Esposito, E. (2000): Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: A review. *Applied Catalysis B-Environmental* 28: 83-99.
33. Eaton, R. A., Hale, M. C. D. (1993): Wood, decay, pests and prevention. Chapman and Hall, London.
34. Eggert, C., Temp, U., Eriksson, K.E.L. (1996): Laccase-producing white-rot fungus lacking lignin peroxidase and manganese peroxidase - Role of laccase in lignin biodegradation. *Enzymes for pulp and paper processing - ACS Symposium series* 655: 130-150.
35. Faroon, O., Keith, L., Smith-Simon, C., De Rosa, C. (2003): Polychlorinated Biphenyls. Human Health Aspects. Concise International Chemical Assessment Document 55. Geneva, World Health Organization.
36. Faroon, O.M., Keith, S., Jones, D., De Rosa, C. (2001): Carcinogenic effects of polychlorinated biphenyls. *Toxicology and Industrial Health* 17: 41-62.
37. Folmar L. C., Hemmer M. J., Denslow N. D., Kroll K., Chen J., Cheek A., Richman H., Meredith H., Grau E. G. (2002) A comparison of the estrogenic potencies of estradiol, ethynylestradiol, diethylstilbestrol, nonylphenol and methoxychlor *in vivo* and *in vitro*. *Aquatic Toxicology* 60: 101-110.

38. Fragoeiro, S., Magan, N. (2005): Enzymatic activity, osmotic stress and degradation of pesticide mixtures in soil extract liquid broth inoculated with *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. *Environmental Microbiology* 7: 348-355.
39. Freeman, J.C., Nayar, P.G., Begley, T.P., Villafranca, J.J. (1993): Stoichiometry and spectroscopic identity of copper centers in phenoxazinone synthase - a new addition to the blue copper oxidase family. *Biochemistry* 32: 4826-4830.
40. Fujihiro, S., Higuchi, R., Hisamatsu, S., Sonoki, S. (2009): Metabolism of hydroxylated PCB congeners by cloned laccase isoforms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82: 853-860.
41. Gasnier, C., Dumont, C., Benachour, N., Clair, E., Chagnon, M.C., Seralini, G.E. (2009): Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology* 262: 184-191.
42. Gianfreada L., Xu F. and Bollag J. M. (1999) Laccase: A useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal* 3: 1-2.
43. Gibson, D.T., Parales, R.E. (2000): Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 11: 236-243.
44. Gnanamani, A., Jayaprakashvel, M., Arulmani, M., Sadulla, S. (2006): Effect of inducers and culturing processes on laccase synthesis in *Phanerochaete chrysosporium* NCIM 1197 and the constitutive expression of laccase isozymes. *Enzyme and Microbial Technology* 38: 1017-1021.
45. Goudopoulou, A., Krimitzas, A., Typas, M.A. (2010): Differential gene expression of ligninolytic enzymes in *Pleurotus ostreatus* grown on olive oil mill wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology* 88: 541-551.
46. Hatakka, A. (1994): Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi - production and role in lignin degradation. *Fems Microbiology Reviews* 13: 125-135.
47. Hirano, T., Honda, Y., Watanabe, T., Kuwahara, M. (2000): Degradation of bisphenol a by the lignin-degrading enzyme, manganese peroxidase, produced by the white-rot basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 64: 1958-1962.
48. Hnat'uková, P., Burešová, H., Kochánková, L., Baumeltová, J. (2010): Distribution of PCBs in sediments of the Červený potok, stream contaminated by technical PCB mixtures Delor, Czech Republic. *Journal of Hydrology and Hydromechanics* 58: 15-22.
49. Hoegger, P.J., Kilaru, S., James, T.Y., Thacker, J.R., Kues, U. (2006): Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *Febs Journal* 273: 2308-2326.

50. Holoubek, I., Petrik, J., Kohoutek, J., Velek, K., Ansorgová, A. (1996): Polychlorované bifenily (PCBs) a další typy halogenovaných polutantů v prostředí. V knize *Polutanty v ekosystému II*, sborník referátů ze semináře. Čížek Z (ed.). BIJO TC, Praha, str. 9–38.
51. Iakovlev, A., Stenlid, J. (2000): Spatiotemporal patterns of laccase activity in interacting mycelia of wood-decaying basidiomycete fungi. *Microbial Ecology* 39: 236-245.
52. Jeffries, T.W. (1990): Regulation of Peroxidase Production in White-Rot Fungi. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 199: 36-CELL.
53. Jiao, B., Yeung, E.K.C., Chan, C.B., Cheng, C.H.K. (2008): Establishment of a Transgenic Yeast Screening System for Estrogenicity and Identification of the Anti-Estrogenic Activity of Malachite Green. *Journal of Cellular Biochemistry* 105: 1399-1409.
54. Johannes, C., Majcherczyk, A. (2000): Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 524-528.
55. Káš, J. (2000): *Biotechnologie životního prostředí*. Praha: [s.n.] s. 142, ISBN 80-7080-376-2
56. Kawai, S., Umezawa, T., Higuchi, T. (1988): Degradation Mechanisms of Phenolic Beta-1 Lignin Substructure Model Compounds by Laccase of *Coriolus versicolor*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 262: 99-110.
57. Keum, Y.S., Li, Q.X. (2004): Fungal laccases-catalysed degradation of hydroxy polychlorinated biphenyls. *Chemosphere* 56: 23-30.
58. Kilaru, S., Hoegger, P.J., Kues, U. (2006a): The laccase multi-gene family in *Coprinopsis cinerea* has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies. *Current Genetics* 50: 45-60.
59. Kilaru, S., Hoegger, P.J., Majcherczyk, A., Burns, C., Shishido, K., Bailey, A., Foster, G.D., Kues, U. (2006b): Expression of laccase gene *lcc1* in *Coprinopsis cinerea* under control of various basidiomycetous promoters. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71: 200-210.
60. Kimura-Kuroda, J., Nagata, I., Kuroda, Y. (2005): Hydroxylated metabolites of polychlorinated biphenyls inhibit thyroid-hormone-dependent extension of cerebellar Purkinje cell dendrites. *Brain Research. Developmental Brain Research* 154: 259–263.
61. Köller, G., Moder, M., Czihal, K. (2000): Peroxidative degradation of selected PCB: a mechanistic study. *Chemosphere* 41: 1827-1834.
62. Kollmann, A., Boyer, F.D., Ducrot, P.H., Kerhoas, L., Jolivat, C., Touton, I., Einhorn, J., Mougin, C. (2005): Oligomeric compounds formed from 2,5-xylylidine (2,5-dimethylaniline) are potent enhancers of laccase production in *Trametes versicolor* ATCC 32745. *Applied Microbiology and Biotechnology* 68: 251-258.

63. Krčmář, P., Ulrych, R. (1998): Degradation of Polychlorinated Biphenyl Mixtures by the Lignin-Degrading Fungus *Phanerochete chrysosporium*. *Folia Microbiologica* 43: 79-84.
64. Kum, H., Kim, M.K., Choi, H.T. (2009): Degradation of endocrine disrupting chemicals by genetic transformants in *Irpex lacteus* with an inducible laccase gene of *Phlebia tremellosa*. *Biodegradation* 5: 673-678.
65. Kumar, S.V.S., Phale, P.S., Durani, S., Wangikar, P.P. (2003): Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnology and Bioengineering* 83: 386-394.
66. Larrondo, L.F., Avila, M., Salas, L., Cullen, D., Vicuna, R. (2003): Heterologous expression of laccase cDNA from *Ceriporiopsis subvermispora* yields copper-activated apoprotein and complex isoform patterns. *Microbiology-Sgm* 149: 1177-1182.
67. Layton A. C., Sanseverino J., Gregory B. W., Easter J. P., Sayler G. S., Schultz T. W. (2002): *In vitro* estrogen receptor binding of PCBs: Measured activity and detection of hydroxylated metabolites in a recombinant yeast assay. *Toxicology and Applied Pharmacology* 180: 157-163.
68. Lee, S.M., Koo, B.W., Lee, S.S., Kim, M.K., Choi, D.H., Hong, E.J., Jeung, E.B., Choi, I.G. (2004): Biodegradation of dibutylphthalate by white rot fungi and evaluation on its estrogenic activity. *Enzyme and Microbial Technology* 35: 417-423.
69. Leonowicz, A., Cho, N.S., Luterek, J., Wilkolazka, A., Wojtas-Wasilewska, M., Matuszewska, A., Hofrichter, M., Wesenberg, D., Rogalski, J. (2001): Fungal laccase: properties and activity on lignin. *Journal of Basic Microbiology* 41: 185-227.
70. Leskinen, P., Michelini, E., Picard, D., Karp, M., Virta, M. (2005): Bioluminescent yeast assays for detecting estrogenic and androgenic activity in different matrices. *Chemosphere* 61: 259-266.
71. Li, J., Li, N., Ma, M., Giesy, J.P., Wang, Z.J. (2008): *In vitro* profiling of the endocrine disrupting potency of organochlorine pesticides. *Toxicology Letters* 183: 65-71.
72. Lorenzo M., Moldes D., Sanroman M. A. (2006) Effect of heavy metals on the production of several laccase isoenzymes by *Trametes versicolor* and on their ability to decolourise dyes. *Chemosphere* 63, 912-917.
73. Luis, P., Walther, G., Kellner, H., Martin, F., Buscot, F. (2004): Diversity of laccase genes from basidiomycetes in a forest soil. *Soil Biology & Biochemistry* 36: 1025-1036.
74. Magan, N. (2007): Fungi in extreme environments. In: C.P. Kubicek and I.S. Druzhinina, Editors, *Environmental and Microbial Relationships* (second ed.), The MYCOTA vol. IV, Springer Verlag, Berlin (Chapter 6).

75. Mai, C., Schormann, W., Milstein, O., Huttermann, A. (2000): Enhanced stability of laccase in the presence of phenolic compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54: 510-514.
76. Manji, S., Ishihara, A. (2004): Screening of tetrachlorodibenzo-p-dioxin-degrading fungi capable of producing extracellular peroxidases under various conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63: 438-444.
77. Marco-Urrea, E., Perez-Trujillo, M., Vicent, T., Caminal, G. (2009): Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. *Chemosphere* 74: 765-772.
78. Matsumura, E., Yamamoto, E., Numata, A., Kawano, T., Shin, T., Murao, S. (1986): Structure of the laccase-catalyzed oxidation products of hydroxy-benzoic acids in the presence of ABTS (2,2'-azino-di-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)). *Agricultural and Biological Chemistry* 50: 1355-1357.
79. May, L.A., Smiley, B., Schmidt, M.G. (2001): Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage. *Canadian Journal of Microbiology* 47: 829-841.
80. Mayes, B.A., McConnell, E.E., Neal, B.H., Brunner, M.J., Hamilton, S.B., Sullivan, T.M., Peters, A.C., Ryan, M.J., Toft, J.D., Singer, A.W., Brown, J.F., Menton, R.G., Moore, J.A. (1998): Comparative carcinogenicity in Sprague-Dawley rats of the polychlorinated biphenyl mixtures aroclors 1016, 1242, 1254, and 1260. *Toxicological Sciences* 41: 62-76.
81. McKinlay, R., Plant, J.A., Bell, J.N.B., Voulvoulis, N. (2008): Endocrine disrupting pesticides: implications for risk assessment. *Environment International* 34: 168-183.
82. Michelini E., Leskinen P., Virta M., Karp M., Roda A. (2005): A new recombinant cell-based bioluminescent assay for sensitive androgen-like compound detection. *Biosensors & Bioelectronics* 20: 2261-2267.
83. Missall, T.A., Moran, T.M., Corbett, J.A., Lodge, J.K. (2005): Distinct stress responses of two functional laccases in *Cryptococcus neoformans* are revealed in the absence of the thio-specific antioxidant Tsa 1. *Eucaryotic Cell* 6: 202-208.
84. Miyamoto, J., Klein, W. (1998): Environmental exposure, species differences and risk assessment. *Pure and Applied Chemistry* 70: 1829-1845.
85. Moldes, D., Lorenzo, M., Sanroman, M.A. (2004): Different proportions of laccase isoenzymes produced by submerged cultures of *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic wastes. *Biotechnology Letters* 26: 327-330.
86. Mougín, C., Jolival, C., Malosse, C., Chaplain, V. (2002): Interference of soil contaminants with laccase activity during the transformation of complex mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid media. *Polycyclic Aromatic Compounds* 22: 673-688.

87. Necochea, R., Valderrama, B., Diaz-Sandoval, S., Folch-Mallol, J.L., Vazquez-Duhalt, R., Iturriaga, G. (2005): Phylogenetic and biochemical characterisation of a recombinant laccase from *Trametes versicolor*. *Fems Microbiology Letters* 244: 235-241.
88. Nogales, B., Moore, E.R.B., Abraham, W.R., Timmis, K.N. (1999): Identification of the metabolically active members of a bacterial community in a polychlorinated biphenyl polluted moorland soil. *Environmental Microbiology* 1: 199-212.
89. Novotný, Č., Vyas, B.R.M., Erbanová, P., Kubátová, A., Šašek, V. (1997): Removal of PCBs by various white rot fungi in liquid cultures. *Folia Microbiologica* 42: 136-140.
90. Nyanhongo, G.S., Gomes, J., Gubitz, G., Zvauya, R., Read, J.S., Steiner, W. (2002): Production of laccase by a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Bioresource Technology* 84, 259-263.
91. Ohsaki, Y., Matsueda, T., Kurokawa, Y. (1997): Distribution of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and non-ortho coplanar polychlorinated biphenyls in river and offshore sediments. *Environmental pollution* 96: 79-88.
92. Otake, T., Yoshinaga, J., Enomoto, T., Matsuda, M., Wakimoto, T., Ikegami, M. (2007): Thyroid hormone status of newborns in relation to in utero exposure to PCBs and hydroxylated PCB metabolites. *Environmental Research* 105: 240-246.
93. Palmieri, G., Cennamo, G., Faraco, V., Amoresano, A., Sannia, G., Giardina, P. (2003): Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 33: 220-230.
94. Pieper, D.H., Seeger, M. (2008): Bacterial metabolism of polychlorinated biphenyls. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 15: 121-138.
95. Piontek, K., Antorini, M., Choinowski, T. (2002): Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-angstrom resolution containing a full complement of coppers. *Journal of Biological Chemistry* 277: 37663-37669.
96. Pointing, S.B. (2001): Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57: 20-33.
97. Polyakov, K.M., Fedorova, T.V., Stepanova, E.V., Cherkashin, E.A., Kurzeev, S.A., Strokopytov, B.V., Lamzin, V.S., Koroleva, O.V. (2009): Structure of native laccase from *Trametes hirsuta* at 1.8 angstrom resolution. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 65: 611-617.

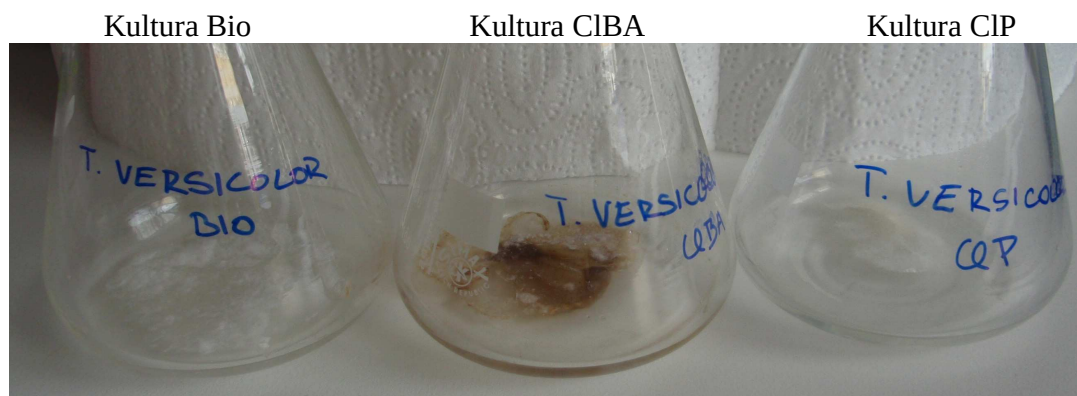
98. Providenti, M.A., Lee, H., Trevors, J.T. (1993): Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds. *Journal of Industrial Microbiology* 12: 379–395.
99. Rehman, A.U. (1991): Properties of the extracellular laccase (polyphenol oxidase) of *Armillaria mellea*. PhD thesis, University of London, UIC.
100. Rein, A., Fernqvist, M.M., Mayer, P., Trapp, S., Bittens, M., Karlson, U.G. (2007): Degradation of PCB congeners by bacterial strains. *Applied Microbiology & Biotechnology* 77: 469-481.
101. Reinhammar, A.U., Malstrom, B.G. (1981): Copper proteins (metal ions in biology). *Blue Copper-containing Oxidases*, T.G. Spiro, ed. pp. 109–149, New York: John Wiley.
102. Routledge, E.J., Sumpter, J.P. (1996): Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15: 241-248.
103. Ruiz-Aguilar, G.M.L., Fernandez-Sanchez, J.M., Rodriguez-Vazquez, R., Poggi-Varaldo, H. (2002): Degradation by white-rot fungi of high concentrations of PCB extracted from a contaminated soil. *Advances in Environmental Research* 6: 559-568.
104. Safe, S., Safe, L., Mullin, M. (1987): *Polychlorinated Biphenyls: Mammalian and Environmental Toxicology*. 1st Edn Springer-Verlag, Germany, p. 2.
105. Saparrat, M., Balatti, P.A., Martinez, M.J., Jurado, M. (2010): Differential regulation of laccase gene expression in *Coriopsis rigida* LPSC No. 232. *Fungal Biology* 114: 999-1006.
106. Schlosser, D., Grey, R., Fritsche, W. (1997): Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor*. Distribution of extra- and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood. *Applied Microbiology and Biotechnology* 47: 412-418.
107. Shiraishi, F., Okumura, T., Nomachi, M., Serizawa, S., Nishikawa, J., Edmonds, J.S., Shiraishi, H., Morita, M. (2003): Estrogenic and thyroid hormone activity of a series of hydroxy-polychlorinated biphenyls. *Chemosphere* 52, 33-42.
108. Shleev, S.V., Khan, I.G., Gazaryan, I.G., Morozova, I.V., Yaropolov, A.I. (2003): Novel laccase redox mediators - Spectral, electrochemical, and kinetic properties. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 111: 167-183.
109. Soares, A., Jonasson, K., Terrazas, E., Guieysse, B., Mattiasson, B. (2005): The ability of white-rot fungi to degrade the endocrine-disrupting compound nonylphenol. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66: 719-725.
110. Šušla, M., Svobodová, K., (2008): Effect of various dyes on the production of manganese-dependent peroxidase isoenzymes by immobilized *Irpex lacteus*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 24: 225-230.

111. Svobodová, K., Cajthaml, T. (2010): New *in vitro* reporter gene bioassays for screening of hormonal active compounds in the environment. *Applied Microbiology and Biotechnology* 88: 839-847.
112. Svobodová, K., Majcherczyk, A., Novotný, Č., Kuees, U. (2008): Implication of mycelium-associated laccase from *Irpex lacteus* in the decolorization of synthetic dyes. *Bioresource Technology* 99: 463-471.
113. Takagi, S., Shirota, C., Sakaguchi, K., Suzuki, J., Sue, T., Nagasaka, H., Hisamatsu, S., Sonoki, S. (2007) : Exoenzymes of *Trametes versicolor* can metabolize coplanar PCB congeners and hydroxy PCB. *Chemosphere* 67: 54-57.
114. Takamiya, M., Magan, N., Wamer, P.J. (2008): Impact assessment of bisphenol A on lignin-modifying enzymes by basidiomycete *Trametes versicolor*. *Journal of Hazardous Materials* 154: 33-37.
115. Tamura, H., Hosoda, A., Akamatsu, M. (2008): Endocrine disruptors that disrupt the transcription mediated by androgen receptor. *Journal of Pesticide Science* 33: 33-39.
116. Terrón, M.C., Gonzalez, T., Carbajo, J.M., Yague, S., Rana-Cuenca, A., Tellez, A., Dobson, A.D.W., Gonzalez, A.E. (2004): Structural close-related aromatic compounds have different effects on laccase activity and on *lcc* gene expression in the ligninolytic fungus *Trametes* sp. I-62. *Fungal Genetics and Biology* 41: 954-962.
117. Thurston, C.F. (1994): The structure and function of fungal laccases. *Microbiology-Uk* 140: 19-26.
118. Tien, M., Kirk, T.K. (1988): Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in Enzymology* 161: 238-248.
119. Torres, E., Bustos-Jaimes, I., Le Borgne, S. (2003): Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Applied Catalysis B-Environmental* 46: 1-15.
120. Totevová, S., Prouza, M., Brenner, V., Demmerová, K. (1997): Bakteriální degradace PCB. *Chemické Listy* 91: 858-866.
121. Tsutsumi, Y., Haneda, T., Nishida, T. (2001): Removal of estrogenic activities of bisphenol A and nonylphenol by oxidative enzymes from lignin-degrading basidiomycetes. *Chemosphere* 42: 271-276.
122. Tyler, C.R., Jobling, S., Sumpter, J.P. (1998): Endocrine disruption in wildlife: A critical review of the evidence. *Critical Reviews in Toxicology* 28: 319-361.
123. Uhnáková, B., Petříčková, A., Biedermann, D., Homolka, L., Vejvoda, V., Bednář, P., Papoušková, B., Šulc, M., Martínková, L. (2009): Biodegradation of brominated aromatics by cultures and laccase od *Trametes versicolor*. *Chemosphere* 76: 826-832.
124. Vasilyeva, G.K. a Strijakova, E.R. (2007): Bioremediation of soils and sediments contaminated by polychlorinated biphenyls. *Microbiology* 76: 639-653.

125. Vyas, B.R.M., Sasek, V., Matucha, M., Bubner, M. (1994): Degradation of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl by selected white-rot fungi. *Chemosphere* 28: 1127-1134.
126. Wang, L., Luo, Q.F. (2005): Biodegradation characteristics of environmental endocrine disruptor di-n-butyl phthalate. *Biomedical and Environmental Sciences* 18: 187-191.
127. Williamson, P.R. (1994): Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans* - identification as a laccase. *Journal of Bacteriology* 176: 656-664.
128. Wong, Y. X., Yu., J. (1999): Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Water Research* 33: 3512-3520.
129. Worrell, J.J., Chet, I., Hüttermann, A. (1986): Association of rhizomorph formation with laccase activity in *Armillaria* sp. *Journal of General Microbiology* 132: 2527-2533.
130. Wu, Q., Watts, J.E., Sowers, K.R., May, H.D. (2002): Identification of a bacterium that specifically catalyzes the reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls with doubly flanked chlorines. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 807-812.
131. Xiao, Y.Z., Chen, Q., Hang, J., Shi, Y.Y., Xiao, Y.Z., Wu, J., Hong, Y.Z., Wang, Y.P. (2004): Selective induction, purification and characterization of a laccase isozyme from the basidiomycete *Trametes* sp. AH28-2. *Mycologia* 96: 26-35.
132. Xiao, Y.Z., Hong, Y.Z., Li, J.F., Hang, J., Tong, P.G., Fang, W., Zhou, C.Z. (2006): Cloning of novel laccase isozyme genes from *Trametes* sp. AH28-2 and analyses of their differential expression. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71: 493-501.
133. Xu, F., Kulys, J.J., Duke, K., Li, K.C., Krikstopaitis, K., Deussen, H.J.W., Abbate, E., Galinyte, V., Schneider, P. (2000): Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of N-hydroxy compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2052-2056.
134. Xu, L.C., Liu, L., Ren, X.M., Zhang, M.R., Cong, N., Xu, A.Q., Shao, J.H. (2008): Evaluation of androgen receptor transcriptional activities of some pesticides *in vitro*. *Toxicology* 243: 59-65.
135. Yadav, J.S., Quensen, J.F., Tiedje, J.M., Reddy, C.A. (1995): Degradation of polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclor-1242, Aroclor-1254, and Aroclor-1260) by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* as evidenced by congener-specific analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 2560-2565.
136. Yeo, S., Park, N., Song, H.G., Choi, H.T. (2007): Generation of a transformant showing higher manganese peroxidase (Mnp) activity by overexpression of Mnp gene in *Trametes versicolor*. *Journal of Microbiology* 45: 213-218.

137. Yoshida, H., (1883): Chemistry of Lacquer (Urushi). Journal of the Chemical Society 43: 472-486.
138. Zhu, X.D., Gibbons, J., Garcia-Rivera, J., Casadevall, A., Williamson, P.R. (2001): Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. Infection and Immunity 69: 5589-5596.
139. Zhukhlistova, N.E., Zhukova, Y.N., Lyashenko, A.V., Zaitsev, V.N., Mikhailov, A.M. (2008): Three-dimensional organization of three-domain copper oxidases: A review. Crystallography Reports 53: 92-109.
140. Zolan, M.E., Pukkila, P.J. (1986): Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. Molecular and Cellular Biology 6: 195-200.

9. PŘÍLOHY



Obr. 1p Kultury *T. versicolor* kultivované v MM médiu s ClBA a ClP (kultivace B)

Tab. 1p Přehled kongenerů PCB

(<http://www.epa.gov/osw/hazard/tsd/pcbs/pubs/congenertable.pdf>)

CASRN

Číslo kongenerů odpovídají databázi Chemical Abstracts Service (CAS) Registry Number.

Číslo kongeneru

Číslování v tabulce odpovídá číslování publikovanému v článku BALLSCHMITER *et al.* 1992.

IUPAC název

Jména kongenerů odpovídají databázi International Union of Pure and Applied Chemistry.

CASRN	Číslo kongeneru	IUPAC název
2051-60-7	1	2-Chlorobifenyl
2051-61-8	2	3-Chlorobifenyl
2051-62-9	3	4-Chlorobifenyl
13029-08-8	4	2,2'-DiChlorobifenyl
16605-91-7	5	2,3-DiChlorobifenyl
25569-80-6	6	2,3'-DiChlorobifenyl
33284-50-3	7	2,4-DiChlorobifenyl
34883-43-7	8	2,4'-DiChlorobifenyl

34883-39-1	9	2,5-DiChlorobiphenyl
33146-45-1	10	2,6-DiChlorobiphenyl
2050-67-1	11	3,3'-DiChlorobiphenyl
2974-92-7	12	3,4-DiChlorobiphenyl
2974-90-5	13	3,4'-DiChlorobiphenyl
34883-41-5	14	3,5-DiChlorobiphenyl
2050-68-2	15	4,4'-DiChlorobiphenyl
38444-78-9	16	2,2',3-TriChlorobiphenyl
37680-66-3	17	2,2',4-TriChlorobiphenyl
37680-65-2	18	2,2',5-TriChlorobiphenyl
38444-73-4	19	2,2',6-TriChlorobiphenyl
38444-84-7	20	2,3,3'-TriChlorobiphenyl
55702-46-0	21	2,3,4-TriChlorobiphenyl
38444-85-8	22	2,3,4'-TriChlorobiphenyl
55720-44-0	23	2,3,5-TriChlorobiphenyl
55702-45-9	24	2,3,6-TriChlorobiphenyl
55712-37-3	25	2,3',4-TriChlorobiphenyl
38444-81-4	26	2,3',5-TriChlorobiphenyl
38444-76-7	27	2,3',6-TriChlorobiphenyl
7012-37-5	28	2,4,4'-TriChlorobiphenyl
15862-07-4	29	2,4,5-TriChlorobiphenyl
35693-92-6	30	2,4,6-TriChlorobiphenyl
16606-02-3	31	2,4',5-TriChlorobiphenyl
38444-77-8	32	2,4',6-TriChlorobiphenyl
38444-86-9	33	2,3',4'-TriChlorobiphenyl
37680-68-5	34	2,3',5'-TriChlorobiphenyl
37680-69-6	35	3,3',4-TriChlorobiphenyl
38444-87-0	36	3,3',5-TriChlorobiphenyl
38444-90-5	37	3,4,4'-TriChlorobiphenyl
53555-66-1	38	3,4,5-TriChlorobiphenyl
38444-88-1	39	3,4',5-TriChlorobiphenyl
38444-93-8	40	2,2',3,3'-TetraChlorobiphenyl
52663-59-9	41	2,2',3,4-TetraChlorobiphenyl
36559-22-5	42	2,2',3,4'-TetraChlorobiphenyl
70362-46-8	43	2,2',3,5-TetraChlorobiphenyl
41464-39-5	44	2,2',3,5'-TetraChlorobiphenyl
70362-45-7	45	2,2',3,6-TetraChlorobiphenyl
41464-47-5	46	2,2',3,6'-TetraChlorobiphenyl
2437-79-8	47	2,2',4,4'-TetraChlorobiphenyl

70362-47-9	48	2,2',4,5-TetraChlorobifenyl
41464-40-8	49	2,2',4,5'-TetraChlorobifenyl
62796-65-0	50	2,2',4,6-TetraChlorobifenyl
68194-04-7	51	2,2',4,6'-TetraChlorobifenyl
35693-99-3	52	2,2',5,5'-TetraChlorobifenyl
41464-41-9	53	2,2',5,6'-TetraChlorobifenyl
15968-05-5	54	2,2',6,6'-TetraChlorobifenyl
74338-24-2	55	2,3,3',4-TetraChlorobifenyl
41464-43-1	56	2,3,3',4'-TetraChlorobifenyl
70424-67-8	57	2,3,3',5-TetraChlorobifenyl
41464-49-7	58	2,3,3',5'-TetraChlorobifenyl
74472-33-6	59	2,3,3',6-TetraChlorobifenyl
33025-41-1	60	2,3,4,4'-TetraChlorobifenyl
33284-53-6	61	2,3,4,5-TetraChlorobifenyl
54230-22-7	62	2,3,4,6-TetraChlorobifenyl
74472-34-7	63	2,3,4',5-TetraChlorobifenyl
52663-58-8	64	2,3,4',6-TetraChlorobifenyl
33284-54-7	65	2,3,5,6-TetraChlorobifenyl
32598-10-0	66	2,3',4,4'-TetraChlorobifenyl
73575-53-8	67	2,3',4,5-TetraChlorobifenyl
73575-52-7	68	2,3',4,5'-TetraChlorobifenyl
60233-24-1	69	2,3',4,6-TetraChlorobifenyl
32598-11-1	70	2,3',4',5-TetraChlorobifenyl
41464-46-4	71	2,3',4',6-TetraChlorobifenyl
41464-42-0	72	2,3',5,5'-TetraChlorobifenyl
74338-23-1	73	2,3',5',6-TetraChlorobifenyl
32690-93-0	74	2,4,4',5-TetraChlorobifenyl
32598-12-2	75	2,4,4',6-TetraChlorobifenyl
70362-48-0	76	2,3',4',5'-TetraChlorobifenyl
32598-13-3	77	3,3',4,4'-TetraChlorobifenyl
70362-49-1	78	3,3',4,5-TetraChlorobifenyl
41464-48-6	79	3,3',4,5'-TetraChlorobifenyl
33284-52-5	80	3,3',5,5'-TetraChlorobifenyl
70362-50-4	81	3,4,4',5-TetraChlorobifenyl
52663-62-4	82	2,2',3,3',4-PentaChlorobifenyl
60145-20-2	83	2,2',3,3',5-PentaChlorobifenyl
52663-60-2	84	2,2',3,3',6-PentaChlorobifenyl
65510-45-4	85	2,2',3,4,4'-PentaChlorobifenyl
55312-69-1	86	2,2',3,4,5-PentaChlorobifenyl

38380-02-8	87	2,2',3,4,5'-PentaChlorobiphenyl
55215-17-3	88	2,2',3,4,6-PentaChlorobiphenyl
73575-57-2	89	2,2',3,4,6'-PentaChlorobiphenyl
68194-07-0	90	2,2',3,4',5-PentaChlorobiphenyl
68194-05-8	91	2,2',3,4',6-PentaChlorobiphenyl
52663-61-3	92	2,2',3,5,5'-PentaChlorobiphenyl
73575-56-1	93	2,2',3,5,6-PentaChlorobiphenyl
73575-55-0	94	2,2',3,5,6'-PentaChlorobiphenyl
38379-99-6	95	2,2',3,5',6-PentaChlorobiphenyl
73575-54-9	96	2,2',3,6,6'-PentaChlorobiphenyl
41464-51-1	97	2,2',3,4',5'-PentaChlorobiphenyl
60233-25-2	98	2,2',3,4',6'-PentaChlorobiphenyl
38380-01-7	99	2,2',4,4',5-PentaChlorobiphenyl
39485-83-1	100	2,2',4,4',6-PentaChlorobiphenyl
37680-73-2	101	2,2',4,5,5'-PentaChlorobiphenyl
68194-06-9	102	2,2',4,5,6'-PentaChlorobiphenyl
60145-21-3	103	2,2',4,5',6-PentaChlorobiphenyl
56558-16-8	104	2,2',4,6,6'-PentaChlorobiphenyl
32598-14-4	105	2,3,3',4,4'-PentaChlorobiphenyl
70424-69-0	106	2,3,3',4,5-PentaChlorobiphenyl
70424-68-9	107	2,3,3',4',5-PentaChlorobiphenyl
70362-41-3	108	2,3,3',4,5'-PentaChlorobiphenyl
74472-35-8	109	2,3,3',4,6-PentaChlorobiphenyl
38380-03-9	110	2,3,3',4',6-PentaChlorobiphenyl
39635-32-0	111	2,3,3',5,5'-PentaChlorobiphenyl
74472-36-9	112	2,3,3',5,6-PentaChlorobiphenyl
68194-10-5	113	2,3,3',5',6-PentaChlorobiphenyl
74472-37-0	114	2,3,4,4',5-PentaChlorobiphenyl
74472-38-1	115	2,3,4,4',6-PentaChlorobiphenyl
18259-05-7	116	2,3,4,5,6-PentaChlorobiphenyl
68194-11-6	117	2,3,4',5,6-PentaChlorobiphenyl
31508-00-6	118	2,3',4,4',5-PentaChlorobiphenyl
56558-17-9	119	2,3',4,4',6-PentaChlorobiphenyl
68194-12-7	120	2,3',4,5,5'-PentaChlorobiphenyl
56558-18-0	121	2,3',4,5',6-PentaChlorobiphenyl
76842-07-4	122	2,3,3',4',5'-PentaChlorobiphenyl
65510-44-3	123	2,3',4,4',5'-PentaChlorobiphenyl
70424-70-3	124	2,3',4',5,5'-PentaChlorobiphenyl
74472-39-2	125	2,3',4',5',6-PentaChlorobiphenyl

57465-28-8	126	3,3',4,4',5-PentaChlorobiphenyl
39635-33-1	127	3,3',4,5,5'-PentaChlorobiphenyl
38380-07-3	128	2,2',3,3',4,4'-HexaChlorobiphenyl
55215-18-4	129	2,2',3,3',4,5-HexaChlorobiphenyl
52663-66-8	130	2,2',3,3',4,5'-HexaChlorobiphenyl
61798-70-7	131	2,2',3,3',4,6-HexaChlorobiphenyl
38380-05-1	132	2,2',3,3',4,6'-HexaChlorobiphenyl
35694-04-3	133	2,2',3,3',5,5'-HexaChlorobiphenyl
52704-70-8	134	2,2',3,3',5,6-HexaChlorobiphenyl
52744-13-5	135	2,2',3,3',5,6'-HexaChlorobiphenyl
38411-22-2	136	2,2',3,3',6,6'-HexaChlorobiphenyl
35694-06-5	137	2,2',3,4,4',5-HexaChlorobiphenyl
35065-28-2	138	2,2',3,4,4',5'-HexaChlorobiphenyl
56030-56-9	139	2,2',3,4,4',6-HexaChlorobiphenyl
59291-64-4	140	2,2',3,4,4',6'-HexaChlorobiphenyl
52712-04-6	141	2,2',3,4,5,5'-HexaChlorobiphenyl
41411-61-4	142	2,2',3,4,5,6-HexaChlorobiphenyl
68194-15-0	143	2,2',3,4,5,6'-HexaChlorobiphenyl
68194-14-9	144	2,2',3,4,5',6-HexaChlorobiphenyl
74472-40-5	145	2,2',3,4,6,6'-HexaChlorobiphenyl
51908-16-8	146	2,2',3,4',5,5'-HexaChlorobiphenyl
68194-13-8	147	2,2',3,4',5,6-HexaChlorobiphenyl
74472-41-6	148	2,2',3,4',5,6'-HexaChlorobiphenyl
38380-04-0	149	2,2',3,4',5',6-HexaChlorobiphenyl
68194-08-1	150	2,2',3,4',6,6'-HexaChlorobiphenyl
52663-63-5	151	2,2',3,5,5',6-HexaChlorobiphenyl
68194-09-2	152	2,2',3,5,6,6'-HexaChlorobiphenyl
35065-27-1	153	2,2',4,4',5,5'-HexaChlorobiphenyl
60145-22-4	154	2,2',4,4',5,6'-HexaChlorobiphenyl
33979-03-2	155	2,2',4,4',6,6'-HexaChlorobiphenyl
38380-08-4	156	2,3,3',4,4',5-HexaChlorobiphenyl
69782-90-7	157	2,3,3',4,4',5'-HexaChlorobiphenyl
74472-42-7	158	2,3,3',4,4',6-HexaChlorobiphenyl
39635-35-3	159	2,3,3',4,5,5'-HexaChlorobiphenyl
41411-62-5	160	2,3,3',4,5,6-HexaChlorobiphenyl
74472-43-8	161	2,3,3',4,5',6-HexaChlorobiphenyl
39635-34-2	162	2,3,3',4',5,5'-HexaChlorobiphenyl
74472-44-9	163	2,3,3',4',5,6-HexaChlorobiphenyl
74472-45-0	164	2,3,3',4',5',6-HexaChlorobiphenyl

74472-46-1	165	2,3,3',5,5',6-HexaChlorobiphenyl
41411-63-6	166	2,3,4,4',5,6-HexaChlorobiphenyl
52663-72-6	167	2,3',4,4',5,5'-HexaChlorobiphenyl
59291-65-5	168	2,3',4,4',5',6-HexaChlorobiphenyl
32774-16-6	169	3,3',4,4',5,5'-HexaChlorobiphenyl
35065-30-6	170	2,2',3,3',4,4',5-HeptaChlorobiphenyl
52663-71-5	171	2,2',3,3',4,4',6-HeptaChlorobiphenyl
52663-74-8	172	2,2',3,3',4,5,5'-HeptaChlorobiphenyl
68194-16-1	173	2,2',3,3',4,5,6-HeptaChlorobiphenyl
38411-25-5	174	2,2',3,3',4,5,6'-HeptaChlorobiphenyl
40186-70-7	175	2,2',3,3',4,5',6-HeptaChlorobiphenyl
52663-65-7	176	2,2',3,3',4,6,6'-HeptaChlorobiphenyl
52663-70-4	177	2,2',3,3',4,5',6'-HeptaChlorobiphenyl
52663-67-9	178	2,2',3,3',5,5',6-HeptaChlorobiphenyl
52663-64-6	179	2,2',3,3',5,6,6'-HeptaChlorobiphenyl
35065-29-3	180	2,2',3,4,4',5,5'-HeptaChlorobiphenyl
74472-47-2	181	2,2',3,4,4',5,6-HeptaChlorobiphenyl
60145-23-5	182	2,2',3,4,4',5,6'-HeptaChlorobiphenyl
52663-69-1	183	2,2',3,4,4',5',6-HeptaChlorobiphenyl
74472-48-3	184	2,2',3,4,4',6,6'-HeptaChlorobiphenyl
52712-05-7	185	2,2',3,4,5,5',6-HeptaChlorobiphenyl
74472-49-4	186	2,2',3,4,5,6,6'-HeptaChlorobiphenyl
52663-68-0	187	2,2',3,4',5,5',6-HeptaChlorobiphenyl
74487-85-7	188	2,2',3,4',5,6,6'-HeptaChlorobiphenyl
39635-31-9	189	2,3,3',4,4',5,5'-HeptaChlorobiphenyl
41411-64-7	190	2,3,3',4,4',5,6-HeptaChlorobiphenyl
74472-50-7	191	2,3,3',4,4',5',6-HeptaChlorobiphenyl
74472-51-8	192	2,3,3',4,5,5',6-HeptaChlorobiphenyl
69782-91-8	193	2,3,3',4',5,5',6-HeptaChlorobiphenyl
35694-08-7	194	2,2',3,3',4,4',5,5'-OktaChlorobiphenyl
52663-78-2	195	2,2',3,3',4,4',5,6-OktaChlorobiphenyl
42740-50-1	196	2,2',3,3',4,4',5,6'-OktaChlorobiphenyl
33091-17-7	197	2,2',3,3',4,4',6,6'-OktaChlorobiphenyl
68194-17-2	198	2,2',3,3',4,5,5',6-OktaChlorobiphenyl
52663-75-9	199	2,2',3,3',4,5,5',6'-OktaChlorobiphenyl
52663-73-7	200	2,2',3,3',4,5,6,6'-OktaChlorobiphenyl
40186-71-8	201	2,2',3,3',4,5',6,6'-OktaChlorobiphenyl
2136-99-4	202	2,2',3,3',5,5',6,6'-OktaChlorobiphenyl
52663-76-0	203	2,2',3,4,4',5,5',6-OktaChlorobiphenyl

74472-52-9	204	2,2',3,4,4',5,6,6'-OktaChlorobifenyl
74472-53-0	205	2,3,3',4,4',5,5',6'-OktaChlorobifenyl
40186-72-9	206	2,2',3,3',4,4',5,5',6'-NonaChlorobifenyl
52663-79-3	207	2,2',3,3',4,4',5,6,6'-NonaChlorobifenyl
52663-77-1	208	2,2',3,3',4,5,5',6,6'-NonaChlorobifenyl
2051-24-3	209	DekaChlorobifenyl

9.1. Přehled proccedingů z konferencí a posterových sdělení týkajících se této práce

1. Plačková, M., Svobodová, K. (2010): Sledování vlivu organického znečištění na produkci degradačních enzymů u ligninolytické houby *Trametes versicolor*. Proceeding z konference Sanační technologie XIII, 25.5. – 27.5. 2010 Třeboň, ČR. Sborník konference str. 224.
2. Plačková, M., Svobodová, K. (2011): Ligninolytic enzyme production by *Trametes versicolor* during PCB degradation. Posterové sdělení na konferenci Ecology of Soil Microorganisms, 27.4. – 1.5. 2011, Praha, ČR. Abstrakt book str. 351.
3. Svobodová, K., Plačková, M. (2011): The effect of organic pollutants on enzyme activities in *Trametes versicolor*. Proceeding z konference 5th European Bioremediation Conference, 4.7. – 7. 7. 2011, Chania, Řecko.

9.2. Přehled publikací v IF časopisech

1. Svobodová, K., Plačková, M., Novotná, V., Cajthaml T. (2009): Estrogenic and androgenic activity of PCBs, their chlorinated metabolites and other endocrine disruptors estimated with two *in vitro* yeast assays. Science of the Total Environment 407 (22): 5921-5925.
2. Plačková, M., Cajthaml, T., Svobodová, K. (2011): Laccase activity profiling and gene expression in PCBs degrading cultures of *Trametes versicolor*. Science of the Total Environment – odesláno do redakce.