

„Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.“

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Barbora Kozická

Studium interakce houby *Pleurotus ostreatus* a bakteriálních kultur na abiotickém nosiči - morfologická, biochemická a proteomická analýza

Study of the interaction between fungus *Pleurotus ostreatus* and bacterial cultures on the abiotic surfaces - morphological, biochemical and proteomic analysis

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Denisa Petráčková, Ph.D.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 13. 8. 2015

.....

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Denise Petráčkové, Ph.D. za odborné vedení a trpělivý a přátelský přístup při tvorbě této práce. Dále děkuji své konzultantce Mgr. Kateřině Svobodové, Ph.D. za cenné rady a připomínky. Mé poděkování patří také celému kolektivu Laboratoře buněčné signalizace za přátelské prostředí a technickou výpomoc, zejména MVDr. Silvii Bezouškové za vykonání 2-D elektroforézy. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Haně Mikeskové za pomoc s fluorescenční mikroskopií.

V neposlední řadě velice děkuji mé rodině a příteli za podporu během celého mého studia.

Tato práce vznikla v letech 2013-2015 v Laboratoři buněčné signalizace a v Laboratoři environmentální biotechnologie v Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky.

ABSTRAKT

Ligninolytické houby jsou významné svými biodegradačními schopnostmi, které lze využít při odstraňování mnoha významných polutantů z životního prostředí, včetně průmyslových barviv. Jako zástupce této skupiny hub byl vybrán *Pleurotus ostreatus* a byla vytvořena modelová situace pro jeho průmyslové využití při dekolorizaci textilního barviva Remazol Brilliant Blue R (RBBR), které je odpadním produktem textilního průmyslu. Houba byla imobilizována na inertním nosiči (kostky polyuretanové pěny) v neprůtokovém „fixed-bed“ bioreaktoru a byla simulována kontaminace houbového filtru bakteriemi, kterou lze předpokládat v praktické aplikaci při čištění odpadních vod. Jako modelová bakterie byla zvolena bakterie *Rhodococcus erythropolis*. Cílem této práce bylo studium vzájemných interakcí houby a bakterie v bioreaktoru při dekolorizaci barviva. Degradční schopnosti houby byly sledovány na základě produkce ligninolytických enzymů, jež se uplatňují v procesu dekolorizace.

Při pozorování růstu směsné kultury houby a bakterie v bioreaktoru bylo zjištěno, že *R. erythropolis* v kokultuře s *P. ostreatus* nerostl, došlo k vymizení bakterií z kultivační tekutiny. Bylo prokázáno, že ani vysoká koncentrace houbového enzymu lakázy v médiu, změna pH média vlivem růstu *P. ostreatus* nebo snížení množství glukózy v médiu vlivem růstu *P. ostreatus* neměly negativní vliv na růst bakterií v bioreaktoru. Živé buňky *R. erythropolis* ($4 \cdot 10^5$ - $1,3 \cdot 10^6$ CFU/ml) byly detekovány asociované s pevným nosičem houbové kultury. Efektivita dekolorizace barviva v bioreaktoru nebyla ovlivněna přítomností bakterie a dosahovala 80 % za 24 hod. Nejvyšší hladina lakázy ($83,3 \pm 14,3$ U/l) byla zjištěna v bioreaktoru s *P. ostreatus* a *R. erythropolis*, kam bylo přidáno RBBR.

Práce se zabývá také morfologickým studiem tvorby směsného biofilmu *P. ostreatus* a *R. erythropolis* na skleněných mikrokuličkách a v tekuté kultuře. Fluorescenční barvení bakterií prokázalo životaschopnost *R. erythropolis* v přítomnosti houbových hyf. Z důvodu vyšší růstové rychlosti bakterie ve srovnání s houbou však nebylo v těchto kultivačních systémech dosaženo vzniku směsného biofilmu.

Součástí práce je také proteomická analýza extracytoplazmatických a buněčných bakteriálních a houbových proteinů získaných z bioreaktoru a z tekutých kultur. 1-D separací proteinů bylo zjištěno, že přítomnost *R. erythropolis* v bioreaktoru měla na expresi houbových proteinů pouze malý či žádný vliv. Ve spektru buněčných proteinů *R. erythropolis* byla pozorována změna exprese proteinu či skupiny proteinů při kultivaci v kultivační tekutině po

P. ostreatus, ve které bakterie špatně rostly. Pomocí 2-D elektroforézy bylo získáno podrobnější proteinové spektrum obou mikroorganismů.

Klíčová slova:

Pleurotus ostreatus, biodegradace, *Rhodococcus erythropolis*, biofilm, proteom, lakáza, fixed-bed bioreaktor, mezidruhové interakce

ABSTRACT

Ligninolytic fungi are well known for their ability to degrade a wide range of xenobiotics contaminating the environment, including synthetic industrial dyes. In this work *Pleurotus ostreatus* was used for decolorization of a synthetic textile dye Remazol Brilliant Blue R (RBBR). To set up a model fungal „fixed-bed“ bioreactor the fungus was immobilized on a polyurethane foam and artificially contaminated with a model bacterium *Rhodococcus erythropolis*. The development of bacterial contamination can be expected during a real application of fungal bio filters in wastewater treatment. The main aim of the work was to study interspecies interactions in the model bioreactors during the dye decolorization. Ligninolytic enzyme activities were followed in the bioreactor cultures as markers of fungal biodegradation ability.

In contrast to the controls, no bacterial growth was observed in the *P. ostreatus* bioreactor culture liquid. The results showed that fungal laccase, pH of the culture liquid, and glucose consumption by the fungus had no effect on the bacterial growth. However, $4 \cdot 10^5$ - $1,3 \cdot 10^6$ CFU/ml of *R. erythropolis* was detected to be associated with the fungal solid support. The presence of these bacteria had no effect on the decolorization performance of the bioreactors. Dye decolorization efficiency of 80 % in 24h was observed. Reactor cultures consisting of *P. ostreatus* and *R. erythropolis* in the presence of RBBR showed the highest laccase activity levels ($83,3 \pm 14,3$ U/l).

Further this work was aimed at morphological analysis of dual-species biofilms formed by *P. ostreatus* and *R. erythropolis* on glass beads and in liquid cultures. Fluorescent microscopy proved a viability of *R. erythropolis* cells in the presence of fungal hyphae. However, no formation of dual-species biofilms was observed under these culture conditions most probably for the difference in growth rates of the two microorganisms.

Extracellular and cellular proteins of *P. ostreatus* and *R. erythropolis* reactor and liquid cultures were analysed using 1-D and 2-D electrophoresis. 1-D protein profiles showed that *R. erythropolis* had only marginal to none effect on fungal protein expression in bioreactor cultures. In case of cellular proteins of *R. erythropolis* changes affecting a group of proteins were observed when the bacterium was cultivated in a culture liquid obtained from the *P. ostreatus* cultures. A better protein profiles of both microorganisms were obtained with 2-D electrophoresis.

Keywords:

Pleurotus ostreatus, biodegradation, *Rhodococcus erythropolis*, biofilm formation, proteome, laccase, fixed-bed bioreactor, interspecific interactions

SEZNAM ZKRATEK

1-D PAGE	jednorozměrná polyakrylamidová gelová elektroforéza
2-D PAGE	dvourozměrná polyakrylamidová gelová elektroforéza
AHL	N-acyl homoserin lakton
ARISA	automatizovaná analýza intergenních ribozomálních spacerů
DGGE	denaturační gradientová gelová elektroforéza
DyP	peroxidáza dekolorizující barviva
ECM	extracelulární matrix
ED	endokrinní disruptory
ECP	extracytoplazmatické proteiny
ERIC-PCR	polymerázová řetězová reakce enterobakteriální repetitivně intergenní konsensus sekvence
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
HGT	horizontální genový přenos
HTP	hem-thiolátová peroxidáza
MEG	médium s maltózovým extraktem a glukózou
MiP	mangan-independentní peroxidáza
MnP	mangan-dependentní peroxidáza
Lac	lakáza
LiP	ligninová peroxidáza
PAU	polyaromatické uhlovodíky
PCB	polychlorované bifenoly
PLFA	analýza fosfolipidů mastných kyselin
PUF	polyuretanová pěna
RBBR	Remazol Brilliant Blue R
SMX	sulfometaxazol

SUP	kultivační tekutina po kultivaci houby <i>P. ostreatus</i>
VP	versatilní peroxidáza

Zkratky použitých chemikálií jsou uvedeny v tabulce v Kap. 4.1.

OBSAH

1. ÚVOD.....	15
2. CÍLE PRÁCE	17
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	18
3.1. Charakteristika rodu <i>Pleurotus</i>	18
3.1.1. Biodegradační potenciál hub bílé hniloby	18
3.1.2. Enzymatický aparát hub bílé hniloby a <i>P. ostreatus</i>	20
3.1.3. Bioreaktorové kultury hub bílé hniloby	22
3.1.4. Růst vláknitých hub	24
3.2. Charakteristika bakterií rodu <i>Rhodococcus</i>	26
3.2.1. Biodegradační potenciál bakterií rodu <i>Rhodococcus</i>	27
3.2.2. Průmyslové využití bakterií rodu <i>Rhodococcus</i>	28
3.3. Využití směsných mikrobiálních kultur v biodegradacích.....	29
3.3.1. Degradací potenciál směsných společenstev	29
3.3.2. Vznik a optimalizace směsných kultur	31
3.3.3. Metody studia směsných kultur	35
3.3.4. Mechanismy mezidruhových interakcí ve směsných společenstvech	37
4. MATERIÁL A METODY	41
4.1. Chemikálie	41
4.2. Laboratorní vybavení a přístroje	42
4.3. Sterilizace materiálu.....	44
4.4. Biologický materiál.....	44
4.5. Mikroskopie	44
4.5.1. Binokulární lupa	44
4.5.2. Optická mikroskopie.....	45
4.5.3. Fluorescenční mikroskopie	45
4.6. Metody kultivace.....	45

4.6.1.	Kultivační média.....	45
4.6.2.	Kultivace bakteriálních a houbových kultur na pevném a v tekutém médiu.....	46
4.6.3.	Kultivace <i>P. ostreatus</i> a <i>R. erythropolis</i> na skleněných mikrokuličkách.....	47
4.6.4.	Kultivace <i>P. ostreatus</i> a <i>R. erythropolis</i> ve formě plovoucího biofilmu.....	48
4.6.5.	Kultivace <i>P. ostreatus</i> a <i>R. erythropolis</i> ve „fixed-bed“ bioreaktoru.....	48
4.6.6.	Růst bakterií v kultivační tekutině po kultivaci <i>P. ostreatus</i>	53
4.6.7.	Pozorování vlivu lakázy v médiu na růst bakterií.....	53
4.6.8.	Pozorování vlivu změny pH MEG média na růst bakterií.....	54
4.6.9.	Stanovení úbytku glukózy v tekutém médiu po kultivaci <i>P. ostreatus</i>	54
4.7.	Polyakrylamidová gelová elektroforéza.....	55
4.7.1.	Pufry, roztoky a kity pro přípravu vzorku.....	55
4.7.2.	Izolace proteinů.....	55
4.8.	Stanovení koncentrace proteinů ve vzorku.....	57
4.9.	Jednorozměrná elektroforéza (1-DE).....	58
4.9.1.	Pufry a roztoky pro 1-D elektroforézu.....	58
4.9.2.	Jednorozměrná elektroforéza.....	58
4.9.3.	Dvourozměrná elektroforéza.....	59
4.10.	Detekce bílkovin pomocí Colloidal Coomassie Blue G250.....	59
5.	VÝSLEDKY.....	61
5.1.	Růstové charakteristiky kultivačních partnerů.....	61
5.1.1.	Růst <i>R. erythropolis</i> v tekuté půdě.....	61
5.1.2.	Kokultivace <i>P. ostreatus</i> a <i>R. erythropolis</i> na pevné půdě.....	62
5.2.	Morfologická analýza mikrobiálního společenstva.....	64
5.2.1.	Tvorba směsného biofilmu na skleněných mikrokuličkách.....	64
5.2.2.	Analýza směsné kultury na mikrokuličkách metodou „live/dead“ barvení.....	66
5.2.3.	Tvorba plovoucího směsného biofilmu <i>P. ostreatus</i> a <i>R. erythropolis</i>	67
5.3.	Kokultivace <i>P. ostreatus</i> a <i>R. erythropolis</i> ve „fixed-bed“ bioreaktoru.....	69

5.3.1.	Růst <i>R. erythropolis</i> ve „fixed-bed“ bioreaktoru	69
5.3.2.	Dekolorizace barviva RBBR směsnou kulturou ve „fixed-bed“ bioreaktoru.....	71
5.3.3.	Produkce ligninolytických enzymů ve „fixed-bed“ bioreaktoru	72
5.4.	Růst bakterií v kultivační tekutině <i>P. ostreatus</i>	74
5.5.	Inhibiční vlivy na růst bakterií v kultivační tekutině po <i>P. ostreatus</i>	75
5.5.1.	Vliv lakázy přítomné v kultivační tekutině na růst bakterií.....	75
5.5.2.	Stanovení změny pH kultivační tekutiny po <i>P. ostreatus</i>	77
5.5.3.	Stanovení úbytku glukózy v tekutém médiu během kultivace <i>P. ostreatus</i>	78
5.6.	Proteomická analýza bakteriálních a houbových proteinů.....	79
5.6.1.	Proteinový profil buněčných a EC proteinů houby a bakterie (1-DE)	79
5.6.2.	Buněčný proteom <i>P. ostreatus</i> a <i>R. erythropolis</i>	83
6.	DISKUZE	86
7.	SOUHRN.....	94
8.	SEZNAM LITERATURY.....	96

1. ÚVOD

Pleurotus ostreatus je dřevokazná houba, která je součástí skupiny hub bílé hniloby. Tato skupina hub je známá svým širokým biodegradačním potenciálem, který je umožněn produkcí substrátově nesespecifických ligninolytických enzymů. *P. ostreatus* dokáže degradovat obtížně rozložitelné látky, jako např. polyaromatické uhlovodíky, průmyslová barviva, endokrinní disruptory, polychlorované bifenyly a pesticidy. Při potenciální průmyslové aplikaci *P. ostreatus* v čištění odpadních vod by však mohlo docházet ke kontaminaci houbové kultury bakteriemi z odpadních vod. Je proto důležité věnovat pozornost vlivu bakterií na životaschopnost a biodegradační schopnosti houby. Předkládaná diplomová práce se zabývá interakcemi *P. ostreatus* ve směsné kultuře s modelovou bakterií *Rhodococcus erythropolis*, která je široce rozšířena v půdě i ve vodě a je nepatogenní. Tato bakterie byla zvolena také z důvodu, že disponuje obdobnými biodegradačními schopnostmi jako *P. ostreatus*, což dává možnost spolupráce mezi oběma mikroorganismy při biodegradačních procesech.

Práce zahrnuje morfologické studium tvorby směsného biofilmu *P. ostreatus* a *R. erythropolis* na skleněných mikrokuličkách a v tekuté kultuře s pomocí binokulární lupy a fluorescenční mikroskopie. Pro účely studia dekolorizace a vzájemných interakcí obou mikroorganismů během dekolorizačních reakcí byl použit „fixed-bed“ bioreaktor, v němž je houba imobilizována na pevném nosiči, kterým jsou kostky polyuretanové pěny. V práci jsou studovány biodegradační schopnosti obou mikroorganismů při dekolorizaci antrachinonového textilního barviva Remazol Brilliant Blue R. Během růstu směsné kultury v bioreaktoru je sledována produkce tří ligninolytických enzymů, které se uplatňují při procesu biodegradace RBBR – lakázy, mangan-dependentní peroxidázy a mangan-independentní peroxidázy. Byla provedena také proteomická analýza extracelulárních a buněčných bakteriálních a houbových proteinů.

Tato práce navazuje na dlouholetý výzkum Laboratoře Environmentální Biotechnologie Mikrobiologického ústavu AVČR, v.v.i., který je zaměřen na biodegradační potenciál ligninolytických hub. Je součástí studia degradačních schopností ligninolytických hub za reálných podmínek odpadních vod. Cílem práce je přinést nové morfologické, enzymatické a proteinové poznatky o směsné bakteriální a houbové kultuře a přiblížit tak mechanismy hrající roli ve vzájemných interakcích mikroorganismů během biodegradace organických látek znečišťujících životní prostředí. Tento výzkum by měl přispět k vývoji

biodegradační technologie založené na ligninolytických houbách a aplikovatelné za reálných podmínek průmyslových odpadních vod.

2. CÍLE PRÁCE

1. Výběr vhodného kultivačního systému pro studium interakcí houby *Pleurotus ostreatus* a bakterie *Rhodococcus erythropolis* při společné kultivaci.
2. Identifikace inhibičního agens ovlivňujícího růst bakterií při společné kultivaci s *P. ostreatus*.
3. Biochemická charakterizace kokultury *P. ostreatus* a *R. erythropolis* ve vybraném kultivačním zařízení.
 - a. Biodegradační experimenty s barvivem Remazol Brilliant Blue R - sledování enzymatické aktivity ligninolytických enzymů (lakázy, mangan-dependentní peroxidázy a mangan-independentní peroxidázy) při štěpení barviva.
 - b. Sledování změn ve spektru buněčných bílkovin a extracytoplazmatických bílkovin produkovaných kultivačními partnery.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. Charakteristika rodu *Pleurotus*

V této diplomové práci je studován *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. Rod *Pleurotus* je řazen do třídy *Pleurotaceae*, řádu *Agaricales* a oddělení *Basidiomycota*. Současně je tato houba součástí skupiny tzv. hub bílé hniloby. Tyto dřevokazné bazidiomycety degradují lignin, po jehož rozložení zbyde z dřevní hmoty celulóza. Dřevo tak získává bílou barvu, z čehož vznikl název této skupiny hub (Reddy 1995).

3.1.1. Biodegradační potenciál hub bílé hniloby

Zástupci skupiny hub bílé hniloby jsou nejvíce studovanými houbovými mikroorganismy z hlediska jejich schopnosti biodegradace. Jsou schopné degradovat a mineralizovat široké spektrum obtížně rozložitelných organických látek znečišťujících životní prostředí, což je odlišuje od bakterií schopných biodegradace, které mají více specifické požadavky na substrát (Reddy 1995). Mezi organopolutanty, které houby bílé hniloby degradují, patří např. polychlorované bifenoly (PCB), (Čvančarová *et al.* 2012), polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), (Hammel *et al.* 1992), syntetická barviva (Shin *et al.* 1997), herbicidy (Masaphy *et al.* 1996) a insekticidy (Amitai *et al.* 1998).

P. ostreatus efektivně odbourává PAU. Během jedenáctidenní kultivace odboural 93 % katecholů, 97 % fenanthrenu, 99,6 % pyrenu a 99,8 % benzo[*a*]pyrenu. Po 15 dnech kultivace bylo dosaženo 99,2% mineralizace fluorenu a po 35 dnech kultivace 99,4% mineralizace anthracenu (Bezalel *et al.* 1995).

P. ostreatus ve srovnání s *P. chrysosporium* a *T. versicolor* jediný úspěšně odbourával komerční směs PCB (Delor 103) v půdě. Po 3 měsících kultivace degradoval 40 % Deloru 103, u *P. chrysosporium* a *T. versicolor* úbytek PCB nebyl zaznamenán (Kubátová *et al.* 2001).

Houby bílé hniloby jsou dále schopny odbourávat také endokrinní disruptory (ED). Tyto látky jsou novou skupinou chemikálií znečišťujících životní prostředí a mají negativní efekt zejména na vodní organismy, u kterých mohou narušovat reprodukci (Kwak *et al.* 2001), ale také na člověka. Bylo zjištěno, že tyto chemikálie mohou *in vitro* stimulovat růst buněk rakoviny prsu (Soto *et al.* 1991). ED napodobují hormony nebo interferují s funkcí endogenních hormonů, čímž dochází k narušení fyziologických funkcí organismu (White *et*

al. 1994). Mezi ED patří např. 4-nonylfenoly (Kwack *et al.* 2011), bisfenol A (Krishnan *et al.* 1993), syntetický estrogen 17 α -ethinylestradiol (Rose *et al.* 2002) a antimikrobiální látka triclosan (Wang a Tian 2015). Cajthaml *et al.* (2009) studovali schopnost degradace ED u 8 kmenů ligninolytických hub, mezi nimiž byl i *P. ostreatus*. U všech hub byl prokázán výrazný úbytek testovaných ED, v případě triclosanu většina houbových kultur snížila jeho množství po 14 dnech kultivace na 1-12 % původní hodnoty.

Je známo, že řada hub bílé hniloby, mezi nimi i *P. ostreatus*, degraduje syntetická barviva (Vyas a Molitoris 1995; McMullan *et al.* 2001), která patří mezi látky výrazně znečišťující životní prostředí, především povrchové vody. Barviva jsou vypouštěna do životního prostředí s odpadní vodou např. z barvírenského či textilního průmyslu. Jsou chemicky velmi různorodé. Zahrnují aromatické a heterocyklické látky, které jsou v přírodě často obtížně rozložitelné. Některé mohou být i toxické nebo karcinogenní. V případě dvou azobarviv, Reactive Orange 16 a Congo Red, a dvou antrachinonových barviv, Remazol Brilliant Blue R (RBBR) a Disperse Blue 3, byla pozorována inhibice růstu testovaných mikroorganismů, které zahrnovaly bakterie, řasy a prvoky, a mutagenní efekt barviv (Novotný *et al.* 2006).

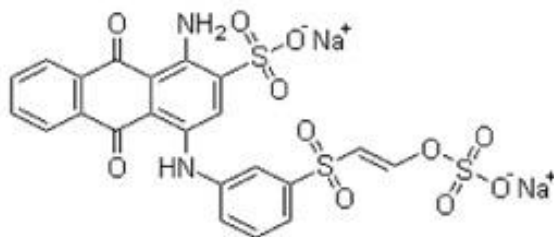
Dekolorizace barviv houbami bílé hniloby byla poprvé popsána Glennem a Goldem (1983), kteří vyvinuli metodu měření ligninolytické aktivity *Phanaerochaete chrysosporium* založenou na dekolozaci řady sulfonovaných polymerních barviv. Schopnost dekolozace barviv byla dále využívána k posouzení biodegradačních schopností různých hub bílé hniloby (Field *et al.* 1993). Mezi další houby bílé hniloby, u nichž byla pozorována dekolozace, patří např. *Phanaerochaete sordida*, která je schopna dekolozovat barvivo Reactive Red 120 (Harazono *et al.* 2003). *Trametes versicolor* degraduje i strukturně odlišná syntetická barviva, jako jsou azobarviva, antrachinononová a indigo barviva (Wong a Yu 1999), *Trametes hirsuta* také triarylmethanová barviva (Abadulla *et al.* 2000).

Pastri-Grigsby *et al.* (1992) ve své práci využívající modelová syntetizovaná barviva prokázali, že zahrnutí struktury podobné ligninu do molekuly barviva usnadní jeho degradaci ligninolytickými enzymy hub bílé hniloby a dalšími mikroorganismy. Byl tak potvrzen vztah mezi chemickou strukturou barviv a jejich biodegradovatelností. Tento poznatek by bylo možné využít při syntéze barviv šetrných k životnímu prostředí.

V této práci bylo při dekolozizačních pokusech použito antrachinonové barvivo RBBR (Obr. 1). Jedná se o průmyslově významné barvivo, které je používáno často jako substrát pro syntézu polymerů. Je to antracenový derivát a představuje důležitou třídu často toxických a rekalcitrančních organopolutantů. Molekula RBBR se strukturně podobá

polycyklickým aromatickým látkám, které jsou substrátem pro ligninolytické peroxidázy (Hammel 1992).

Dekolorizace RBBR byla pozorována u *Pleurotus pulmonarius* v kultivaci na pevné půdě i *in vitro* za použití enzymových extraktů izolovaných z *P. pulmonarius* (Bazanella *et al.* 2013). Pezzella *et al.* (2014) k dekolozaci RBBR použili lakázu izolovanou z *P. ostreatus*, která byla imobilizována na perlitu, porézním křemičitém materiálu. Dekolorizace probíhala ve „fluidized-bed“ reaktoru. Při kontinuální kultivaci bylo odbouráno 56,1 % RBBR po 4,2 hod kultivace.



Obr. 1. – Chemická struktura Remazol Brilliant Blue R

3.1.2. Enzymatický aparát hub bílé hniloby a *P. ostreatus*

Biodegradační kapacita hub bílé hniloby je spojována s produkcí enzymů degradujících lignin, zejména lakázy, mangan-dependentní peroxidázy a ligninové peroxidázy. Vzhledem k velké polymerní molekule ligninu (viz Obr. 2) jsou tyto enzymy většinou produkované extracelulárně. Substrátová specifita ligninolytických enzymů je velmi nízká kvůli nepravidelné struktuře molekuly ligninu. Právě nízká substrátová specifita dodává ligninolytickým enzymům široký biodegradační potenciál. Navíc bylo prokázáno, že ligninolytické enzymy jsou kódovány vždy několika geny, čímž je v houbových kulturách umožněna produkce různých izoenzymů lišících se svými katalytickými vlastnostmi v závislosti na vnějších podmínkách (Martinez 2002).

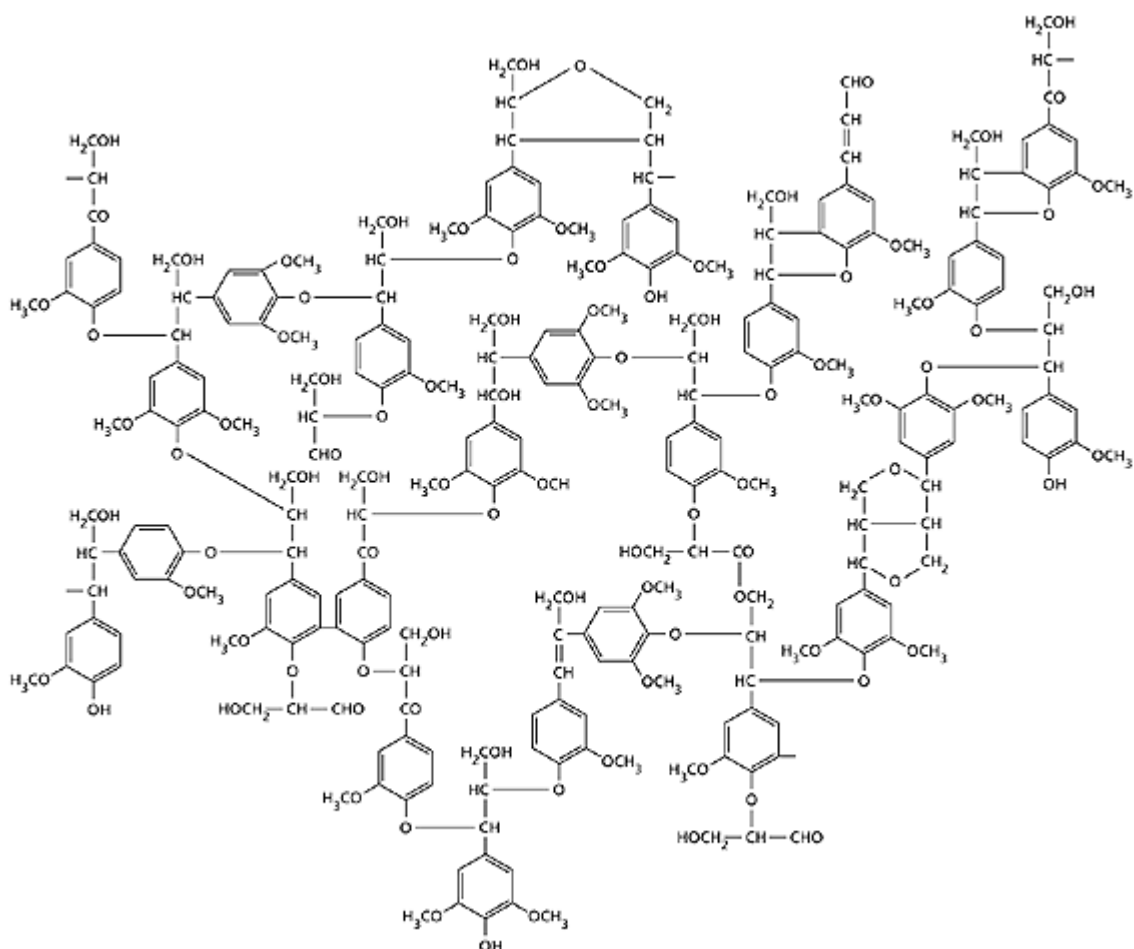
Mezi hlavní ligninolytické enzymy hub bílé hniloby patří lakáza (Lac, E.C. 1.10.3.2) a dvě hemoperoxidázy - ligninová peroxidáza (LiP, E.C. 1.11.1.14) a mangan-dependentní peroxidáza (MnP, E.C. 1.11.1.13). Lac (benzenediol:kyslík oxidoreduktáza) je enzym obsahující měď, který katalyzuje oxidaci fenolových substrátů za současné redukce kyslíku na vodu (Edens *et al.* 1999). LiP katalyzuje oxidaci nefenolových aromatických složek jako je veratrylalkohol, zatímco MnP oxiduje Mn^{2+} na Mn^{3+} a ten následně oxiduje fenolické látky

(Glenn *et al.* 1986). Byla popsána také mangan-independentní peroxidáza (MiP, E.C. 1.11.1.13), (Heinfling *et al.* 1998) a versatilní peroxidáza (VP, E.C. 1.11.1.16), (Ruiz-Duenas *et al.* 2001), kombinující katalytické vlastnosti LiP a MnP.

P. ostreatus produkuje do média lakázu, MnP, MiP (Vyas a Molitoris 1995) a veratrylalkoholoxidázu (Sannia *et al.* 1991). Produkce LiP u něj nebyla zaznamenána (Kimura *et al.* 1990). Vyas a Molitoris (1995) zjistili, že *P. ostreatus* během kultivace na pšeničné slámě produkuje enzym schopný degradovat barvivo RBBR, tento enzym byl nazván RBBR oxygenáza. V katalytickém centru má kov (pravděpodobně hemovou skupinu), pro svou činnost vyžaduje H₂O₂ a jeho aktivita byla inhibována řadou známých inhibitorů oxygenáz (Na₂S₂O₅, NaCN a NaN₃), (Vyas a Molitoris 1995). Aktivita tohoto enzymu není podmíněna přítomností RBBR v médiu.

Později byly u hub bílé hniloby popsány další dvě peroxidázy: hem-thiolátová peroxidáza (HTP, E.C. 1.11.2.1) a tzv. peroxidáza dekolizující barviva (DyP, E.C. 1.11.1.19), (Salvachua *et al.* 2013). U *P. ostreatus* HTP nebyla dosud zaznamenána a je znám pouze jeden případ, kdy byla u *P. ostreatus* nalezena DyP (Faraco *et al.* 2007).

Na biodegradaci se dále nepřímo podílejí enzymy, které nemají schopnost rozkládat lignin, ale produkují H₂O₂ vyžadovaný ligninolytickými peroxidázami nebo jinak propojují lignocelulózové degradační dráhy. Jsou to např. glyoxaloxidáza (E.C. 1.2.3.5), superoxididismutáza (E.C. 1.15.1.1), glukózooxidáza (E.C. 1.1.3.4), arylalkoholoxidáza (E.C. 1.1.3.7) a celobiózodehydrogenáza (E.C. 1.1.99.18), (Leonowicz *et al.* 2001).



Obr. 2. – Schématická struktura ligninu (<http://5e.plantphys.net/image.php?id=130>)

3.1.3. Bioreaktorové kultury hub bílé hniloby

Studium degradace organopolutantů ligninolytickými houbami často probíhá v různých typech bioreaktorů, které umožňují kultivaci ve stabilním prostředí a zvýšení objemu kapaliny k dekontaminaci. Mezi časté možnosti uspořádání bioreaktoru používané zejména ve studiích dekolorizace barviv patří „packed-bed“ a „fluidized-bed“ bioreaktory (Zhang *et al.* 1999; Mielgo *et al.* 2002; Kasinath 2003). Tankový „packed-bed“ bioreaktor byl např. použit v experimentu dekolorizace diazobarviva Reactive Black 5 imobilizovaným myceliem *Bjerkandera adusta* (Mohorcic *et al.* 2004). Dekolorizace Basic Blue 22 z 80 % byla dosažena za použití houby *P. sordida* v rotačním biologickém kontaktoru, který obsahoval plastické disky jako nosič pro růst houbového mycelia (Yang *et al.* 2004).

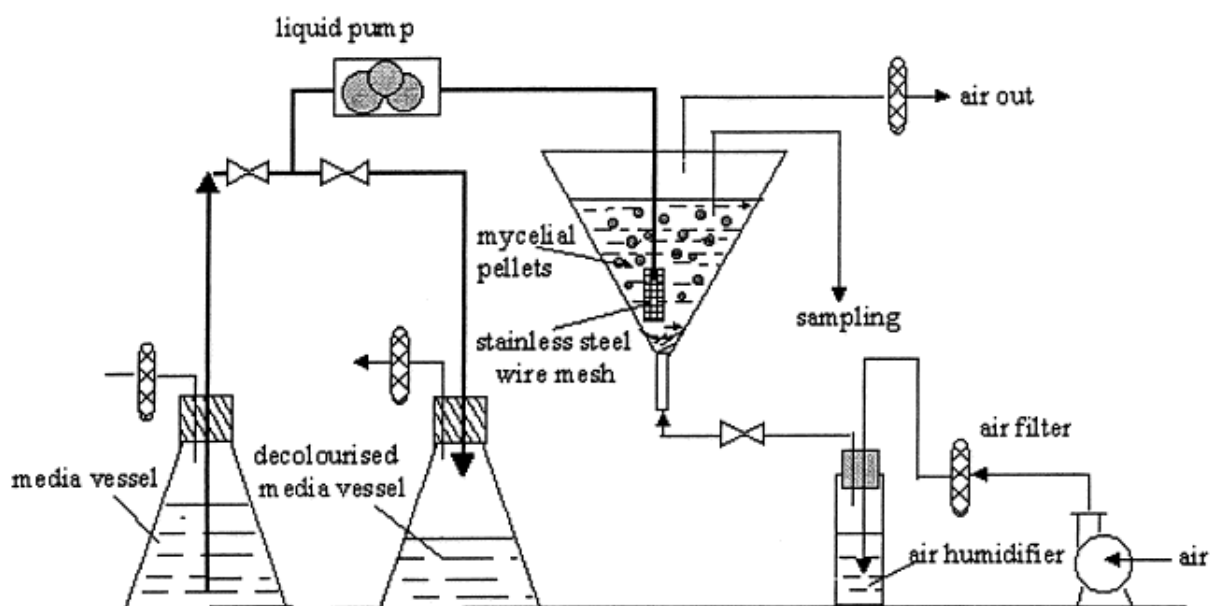
V systému „packed-bed“ bioreaktoru jsou houby bílé hniloby pěstovány na pevném podpůrném substrátu, kterým může být odpad z dřevařského či zemědělského průmyslu, levný umělohmotný materiál nebo válec z drátěného pletiva (Zhang *et al.* 1999; Mielgo *et al.*

2002; Kasinath 2003; Couto *et al.* 2006). Poté jsou použity jako biofiltr k remediaci vod znečištěných textilními barvivy. *T. hirsuta* imobilizovaná na pomerančových slupkách dekolorizovala polymerní antrachinonové barvivo Poly R-478 s 50% účinností (Couto *et al.* 2006), *P. chrysosporium* imobilizovaná na polyuretanové pěně totéž barvivo odbourala až z 80 % (Mielgo *et al.* 2002).

Ve „fluidized-bed“ bioreaktoru (viz schéma na Obr. 3) je houba kultivována ve formě volně plovoucích myceliálních pelet nebo houbových buněk imobilizovaných v alginátových kuličkách. Zhang *et al.* (1999) při studiu dekolorizace Orange II houbovým kmenem F29 (neidentifikovaná bazidiomyceta) v tomto uspořádání prokázali, že imobilizace houbových buněk vedla k vyšší dekolorizační účinnosti, než byla pozorována u plovoucích myceliálních pelet. Imobilizací mycelia bylo dosaženo vyšší účinnosti dekolorizace také při odbourávání barviva K-2PB houbou *P. chrysosporium* provedené Gao *et al.* (2008).

Vedle dekolorizace syntetických barviv jsou vláknité houby v různých reaktorech testovány i na degradaci jiných xenobiotik, jako jsou např. chlorované látky (Yadav *et al.* 2015), jopromidu, antibiotika ofloxacinu (Gros *et al.* 2014) a jiných farmaceutik (Cruz-Morato *et al.* 2013). Reaktory jsou v současnosti také používány ve studiích zaměřených na nadprodukcii průmyslově využitelných enzymů ligninolytických hub (Moilanen *et al.* 2015) nebo houbových polysacharidů s antioxidačními účinky (Cao *et al.* 2014).

Pro biodegradaci účely jsou používány také membránové reaktory s imobilizovanými purifikovanými ligninolytickými enzymy (shrnuto v Lopez *et al.* 2002). Imobilizace enzymu zvyšuje jeho stabilitu vůči teplotním změnám, inhibitorům a průmyslovým aditivům (Abadulla *et al.* 2000).



Obr. 3. – Schéma „fluidized-bed“ bioreaktoru. Převzato od Zhang *et al.* 1999.

media vessel = zásobník média; decolourised media vessel = zásobník odbarveného média; liquid pump = peristaltická pumpa; mycelial pellets = myceliální pelety; stainless steel wire mesh = drátěné pletivo z nerezové oceli; air out = odvod vzduchu; sampling = odběry vzorků; air filter = filtr vzduchu; air humidifier = zvlhčovač vzduchu; air = přívod vzduchu

3.1.4. Růst vláknitých hub

Vláknité houby jsou přizpůsobené k růstu na povrchu, důkazem je jejich apikální hyfální růst a produkce extracelulárních enzymů, kterými získávají molekuly potřebné k růstu (Jones 1994). Jsou rozdílné názory na to, zda vláknité houby tvoří či netvoří biofilm.

Je známo, že bakterie se v přirozeném prostředí zřídka vyskytují jako samotné buňky, rostou převážně ve formě biofilmu. Biofilm je definován jako buňky ireverzibilně přichycené k živému či neživému povrchu a k sobě navzájem a obklopené matrix z extracelulárních polymerů, kterou samy produkují (Donlan a Costerton 2002). Buňky žijící v biofilmu vykazují odlišné fenotypové vlastnosti než volně žijící buňky, jako je vyšší odolnost vůči chemickému, biologickému a fyzikálnímu stresu a vyšší rezistence k antimikrobiálním látkám (Olson *et al.* 2002).

Vláknité houby splňují výše uvedenou definici biofilmu řadou svých růstových charakteristik. Houby rostou ve formě hyfálních svazků či vrstev, buňky jsou asociovány s povrchem a obklopeny extracelulární polymerní matrix, kterou vyprodukovaly (Mowat *et al.* 2008). Ve formě biofilmu se vyznačují zvýšenou odolností k antimikrobiálním látkám,

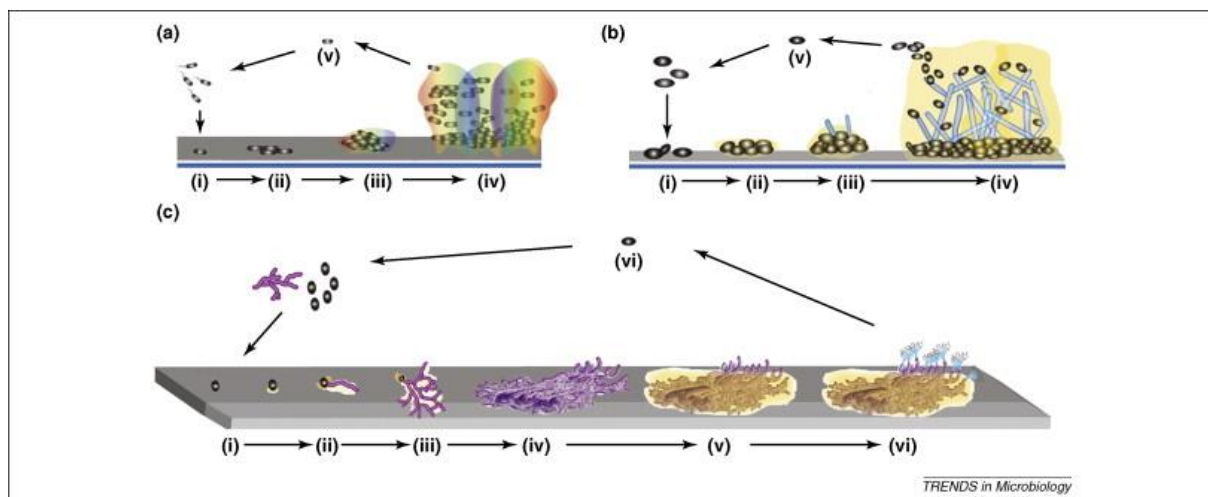
změnami v produkci a sekreci enzymů a metabolitů a fyziologickými změnami (Mowat *et al.* 2007).

Navzdory těmto faktům jsou ve spojitosti s růstem vláknitých hub používány spíše termíny „houbová biomasa“ (Gulis *et al.* 2008), „mnohobuněčná masa“ (Mowat *et al.* 2008) a „myceliální rohože“ (Beauvais *et al.* 2007). Jako argument, proč biomasa vláknitých hub není biofilmem, je předkládán fakt, že houby během svého růstu pronikají do substrátu, což se neslučuje s termínem „biofilm“, jelikož slovo „film“ nevystihuje invazivní růst (Gulis *et al.* 2008).

Na Obr. 4 jsou uvedeny tři modely tvorby biofilmu, Obr. 4a zachycuje model tvorby bakteriálního biofilmu. Cyklus zahrnuje pět fází: adsorpci planktonických buněk k povrchu (na základě fyzikálně-chemických interakcí buněk s povrchem), reverzibilní adhezi (počátek tvorby exopolysacharidů, shlukování buněk), tvorbu mikrokolonií (buňky se množí a shlukují, přisedají další buňky a zvyšuje se produkce extracelulární matrix), maturaci biofilmu (dochází k dosažení maximální možné tloušťky biofilmu, vznikají vodní kanálky) a disperzi (z biofilmu se uvolňují planktonické buňky, které přisedají na nový povrch a začínají cyklus znovu).

Obr. 4b vystihuje tvorbu biofilmu kvasinky *Candida albicans*, který je rozšířen proti bakteriálnímu modelu o pseudohyfální či hyfální růst. Ve třetí fázi po vzniku základních vrstev kvasinkových mikrokolonií dojde k zahájení hyfálního růstu a hyfy vytvoří vrstvu nad mikrokoloniemi. Následuje opět fáze maturace a disperze kvasinkových buněk.

Harding *et al.* (2009) navrhli model vzniku biofilmu vláknitých hub (viz Obr. 4c) na základě studií růstu hub *Aspergillus niger* (Villena *et al.* 2003), *Aspergillus fumigatus* (Mowat *et al.* 2008), *Fusarium solani* a *F. oxysporium* (Imamura *et al.* 2008). V první fázi dochází k adsorpci propagule (spory, hyfálního fragmentu či sporangia) k povrchu. Druhá fáze zahrnuje aktivní přichycení k povrchu skrze sekreci adhezivních substancí. Ve třetí fázi vznikají jednovrstevné mikrokolonie, dochází k prodlužování hyf a jejich větvení, hyfy prozkoumávají substrát a mohou do něj začít invadovat. Ve čtvrté fázi hyfy tvoří kompaktní síť s mnoha vrstvami, prostoupenou vodními kanálky a hyfální svazky jsou pospojované dohromady exopolymerní matrix. V páté fázi dochází k tvorbě plodnic a sporogenních buněk a v šesté fázi dochází k uvolnění spor nebo fragmentů biofilmu.



Obr. 4 – Vznik biofilmu u bakterií (a), kvasinky *Candida albicans* (b) a návrh modelu tvorby biofilmu u vláknitých hub (c). Převzato od Harding *et al.* 2009.

Pesciaroli *et al.* (2013) při studiu růstu biofilmu *P. ostreatus* potvrdili strukturální kritéria pro tvorbu biofilmu u vláknitých hub, která byla navržena ve studii Harding *et al.* (2009). Biofilm tvořil po čtyřech dnech kultivace velmi tenkou vrstvou přisedlé biomasy, která obsahovala mnoho kanálů a pórů. Extracelulární matrix (ECM) byla pozorována ve formě řídké se vyskytující vláken. Po 7 dnech kultivace došlo k úplnému obalení hyf ECM a tloušťka biofilmu výrazně vzrostla. Zvýšení hustoty biofilmu nemělo negativní vliv na jeho vitalitu. Analýza odhalila frekvenci výskytu cylindrických intravakuolárních struktur, které jsou považovány za jednotku objemu biofilmu, v sedmidenním biofilmu stejnou jako ve čtyřdenním biofilmu. Chemickou analýzou biofilmu bylo zjištěno, že ECM je složena převážně ze sacharidů a menší část tvoří proteiny, ostatní složky nebyly identifikovány.

Ve studii byla pozorována také vyšší odolnost biofilmu *P. ostreatus* vůči kadmii ve srovnání s plovoucími kulturami, přičemž biofilm starý 7 dní byl více odolný než biofilm starý 4 dny. Příčinou může být vznik metabolických gradientů mezi biofilmem a povrchem, které jsou výraznější u staršího biofilmu s vyšší tloušťkou. Se zvyšováním tloušťky biofilmu dochází ke snížení difúze živin a kyslíku ke spodním vrstvám biofilmu. Buňky v nižších vrstvách biofilmu rostou pomaleji a vykazují vyšší odolnost k toxickým látkám než rychle rostoucí buňky na povrchu biofilmu (Walters *et al.* 2003).

3.2. Charakteristika bakterií rodu *Rhodococcus*

Rod *Rhodococcus* je široce rozšířen. Byl izolován z půdy, hloubkových vrtů, povrchové vody, mořských sedimentů, dále ze zvířecího trusu nebo ze střeva hmyzu

(Goodfellow 1989). Jsou to aerobní, gram-pozitivní, nesporulující a nepohyblivé bakterie, klasifikované jako nokardioformní aktinomycety obsahující ve svých buněčných stěnách mykolovou kyselinu, stejně jako rody *Mycobacterium*, *Nocardia* a *Corynebacterium* (Goodfellow 1977; Goodfellow 1989). Při růstu tvoří mycelium, které se v pozdní fázi fragmentuje na tyčinkovité či kokovité útvary (nokardioformita), (Lechevalier 1989).

3.2.1. Biodegradační potenciál bakterií rodu *Rhodococcus*

Bakterie rodu *Rhodococcus* jsou považovány za jedny z nejvhodnějších skupin bakteriálních organismů pro biodegradaci obtížně odbouratelných látek, které nemohou být snadno transformovány jinými organismy. Rod *Rhodococcus* je schopen transformovat nebo degradovat širokou škálu chemikálií, která zahrnuje jednoduché uhlovodíky, aromatické uhlovodíky a nitroaromáty až po chlorované polycyklické uhlovodíky jako jsou PCB (shrnutí v Warhurst a Fewson 1994). Mnoho z těchto substrátů jsou komplexní syntetické molekuly se značnou stabilitou a toxicitou.

Rhodococcus se vyznačuje tolerancí vůči organickým rozpouštědlům. Jedním z obranných mechanismů buněk vůči rozpouštědlům je schopnost upravovat složení mastných kyselin v buněčné stěně (de Carvalho *et al.* 2007). V závislosti na přítomnosti určitých substrátů v kultivačním médiu bakterie mění složení lipidů buněčné stěny a tím upravuje fluiditu buněčného obalu (de Carvalho *et al.* 2005). Další reakcí na přítomnost rozpouštědla v prostředí je snaha o zmenšení povrchu vystavenému působení solventu, který primárně poškozuje buněčnou membránu a tím ovlivňuje buněčné dělení. Během kultivace v médiu s obsahem butanolu a etanolu dosahovaly živé buňky *R. erythropolis* až osmkrát menších rozměrů než neživotaschopné buňky (de Carvalho *et al.* 2004). V médiu s butanolem a dimethylformamidem bylo pozorováno shlukování buněk. Naproti tomu v přítomnosti etanolu bylo pozorováno rapidní snížení počtu shluků buněk, etanol pravděpodobně udává povrchu buněk hydrofilní charakter (de Carvalho *et al.* 2004).

Čejková *et al.* (2005) ve své práci ukázali, že odolnost buněk vůči toxickým látkám je zvyšována také schopností bakterií rodu *Rhodococcus* tvořit biofilmy na nosičích vhodných pro biotechnologické účely, kterými mohou být např. částice syntetického zeolitu (Čejková *et al.* 2005).

S biodegradačními schopnosti bakterií rodu *Rhodococcus* je spojena produkce surfaktantů a flokulantů. Dlouhé alifatické řetězce mykolových kyselin v buněčném obalu bakterií *Rhodococcus* fungují jako povrchové surfaktanty a usnadňují adhezi buněk na

hydrofobní fázi ve dvoufázovém systému (Neu 1996). Bakterie produkují flokulanty v reakci na chemický či fyzikální stres (Chang *et al.* 2003), tyto molekuly mají ochrannou funkci a umožňují lepší využití zdrojů uhlíku (Chang *et al.* 2009). Flokulant produkovaný *R. erythropolis* se skládá z polypeptidů a lipidů, převážně z glykolipidů obsahujících mykolát (Kurane *et al.* 1994; Kurane *et al.* 1995).

Rhodococcus je také schopen akumulace iontů těžkých kovů, včetně radioaktivních kovů (Tomioka *et al.* 1994).

Bakterie *Rhodococcus* hrají důležitou roli v přírodní degradaci xenobiotik a v bioremediaci. Mohou se přirozeně nacházet v kontaminovaných oblastech. *Rhodococcus* může perzistovat v půdě i v nepříznivých podmínkách a degradace polutantů není ovlivněna přítomností snadněji asimilovatelných zdrojů uhlíku (Warhurst a Fewson 1994).

3.2.2. Průmyslové využití bakterií rodu *Rhodococcus*

Bakterie rodu *Rhodococcus* jsou využívány k produkci surfaktantů a flokulantů (Kurane a Tomizuka 1992; Finnerty 1994). *Rhodococcus* produkuje surfaktanty v množství, které je dostatečné pro průmyslové využití (Abu-Ruwaida *et al.* 1991). Surfaktanty snižují povrchové napětí mezi fázemi, v průmyslu jsou využívány např. k čištění naftových nádrží, obnově olejů k opětovnému využití nebo ke zvýšení výtěžku těžby ropy z přírodních deposit. Flokulanty jsou široce používány v průmyslových procesech, jako je čištění odpadních vod, fermentace, pivovarnictví, odstraňování těžkých kovů z životního prostředí a odstraňování oleje z vody (shrnuto v Salehizadeh a Shojaosadati 2001). Peng *et al.* (2014) popsali vlastnosti flokulantu, který produkuje *R. erythropolis*. Je schopen fungovat v širokém rozmezí pH (2-12) a dosahuje efektivity flokulace až 98 %. Jeho použitím lze odstranit až 80 % barviva z odpadní vody, v kombinaci se síranem měďnatým až 94 %.

Průmyslově využitelné fenotypové vlastnosti rodu *Rhodococcus* mohou být přeneseny do jiného mikroorganismu metodami genetické manipulace. Byly zkonstruovány klonovací vektory, které umožňují přenos těchto genů do *Escherichia coli* či v rámci rodu *Rhodococcus*. Jedním z nich je plazmid pLAFR5 nesoucí geny *soxABC*, které u *R. erythropolis* IGTS8 podmiňují schopnost oxidovat sirné sloučeniny, např. dibenzothiofen. Geny byly nezávisle na sobě naklonovány a přeneseny do *E. coli*, kde byly úspěšně exprimovány (Denome *et al.* 1994). Tyto geny byly úspěšně přeneseny také do *Rhodococcus fascians* D188-5, který přirozeně není schopen oxidovat dibenzothiofen (Denome *et al.* 1993). Bakterie rodu *Rhodococcus* typicky nesou velké lineární a cirkulární plazmidy, které mohou obsahovat

značný počet katabolických genů. Vysoká frekvence rekombinace popsaná u některých kmenů *Rhodococcus* může přispět k flexibilitě jejich genomu a schopnosti snáze získávat nové geny a s tím i nové enzymatické aktivity (Larkin 2006).

3.3. Využití směsných mikrobiálních kultur v biodegradacích

3.3.1. Degradální potenciál směsných společenstev

Současné biodegradální studie ukázaly, že směsné mikrobiální kultury složené z více druhů organismů mohou mít vyšší degradální potenciál než jednotlivé mikroorganismy v čistých kulturách. Nascimento *et al.* (2011) pozorovali, že směs hub získaná ze sedimentu přírodních nedotčených vodních nádrží byla schopna odbarvit více než 90 % barviva Reactive Red 198 za 7 dní kultivace, aniž by docházelo k adsorpci barviva na biomasu.

Na základě znalostí o degradačních schopnostech hub a bakterií byly studovány možnosti kooperace těchto dvou skupin mikroorganismů při degradaci xenobiotik. Kooperace může být založena na štěpení xenobiotik ligninolytickými houbami za produkce metabolitů, které jsou dále odbourávané bakteriemi. Příkladem je například schopnost hub bílé hniloby štěpit ftalocyaninový kruh průmyslových barviv, čímž vznikne ftalimid (Heinfling-Weidtmann *et al.* 2001; Coneely *et al.* 2002), který je dále degradován aerobními bakteriemi (Reemtsma *et al.* 2001). Ve směsném společenství může degradace probíhat také zcela jinými metabolickými dráhami, než jsou ty, které využívají jednotlivé mikroorganismy. Tuto skutečnost odvodili Kadam *et al.* (2011) na základě identifikovaných metabolitů při degradaci barviva Reactive Navy Blue HE2R z odpadní vody společenstvím houby *Aspergillus ochraceus* a bakterie *Pseudomonas* sp. SUK 1.

Bakteriální a houbové směsné kultury se ukázaly být efektivní při biodegradaci PAU. Bonchan *et al.* (2000) studovali schopnost bakteriální a houbové kokultury odbourávat vysokomolekulární PAU (chrysen, pyren, benzo[*a*]pyren, benz[*a*]anthracen, dibenz[*a,h*]anthracen). Kokultura houby *Penicillium janthinellum* s bakterií *Stenotrophomonas maltophilia* v půdě efektivně degradovala benzo[*a*]pyren. Během pokusu bylo odbouráno 53 % přidaného radioaktivně značeného ¹⁴C benzo[*a*]pyrenu během 100 dní. Ostatní PAU (chrysen, pyren, benz[*a*]anthracen a dibenz[*a,h*]anthracen) byly po 100 dnech kultivace odbourány z 44–80 % výchozí koncentrace (Bonchan *et al.* 2000).

Pozitivních výsledků bylo také dosaženo při čištění odpadních vod z textilního průmyslu. Novotný *et al.* (2011) pozorovali dekolorizaci směsi průmyslových barviv směsnou

kulturou *Irpex lacteus* a aktivovaného kalu. Zatímco *I. lacteus* je schopen odbarvit až 90 % barviva nezávisle na jeho struktuře za méně než týden, aktivovaný kal vykazuje velmi nízkou schopnost dekolorizace. Při směsné kultivaci *I. lacteus* s aktivovaným kalem bylo dosaženo odbourání 94–99 % barviva po 5 dnech.

Při studiu schopnosti dekolorizace barviva K-2PB houbou *P. chrysosporium* za nesterilních podmínek bylo naopak zjištěno, že přítomnost bakterií neměla na efektivitu biodegradace barviva houbou žádný vliv (Gao *et al.* 2008).

Také směsná bakteriální společenstva jsou často uváděna jako účinnější v biodegradaci xenobiotik ve srovnání s jednotlivými kmeny. Například u směsné bakteriální kultury tvořené *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa* a rodem *Flavobacterium* byla zjištěna vyšší schopnost degradace PAU anthracenu a pyrenu než u jednotlivých izolátů (Trzesicka-Mlynarz a Ward 1995).

Bakteriální směsná společenstva jsou s úspěchem využívána také pro dekolorizaci syntetických barviv. Při pokusu, kdy byla sledována dekolorizace barviva Red HE3B směsnou kulturovou složenou z *Providencia* sp. a *P. aeruginosa* došlo ke 100% degradaci barviva již po 1 hodině (Phugare *et al.* 2011). V práci bylo navrženo, že výhoda směsné kultury proti jednotlivým kmenům spočívala v možnosti kombinovat enzymatické aktivity obou bakterií.

Na druhou stranu byly provedeny studie, kdy byla zaznamenána efektivnější dekolorizace čistými bakteriálními kulturami než bakteriální směsí. Larcher a Yargeau (2011) vytvořili bakteriální konsorcia z bakterií *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *R. equi*, *R. erythropolis*, *R. rhodochrous* a *R. zopfii*. Na základě růstových inhibičních testů byly tyto bakteriální kmeny rozděleny do dvou skupin tak, aby ve skupině byly kmeny, které se vzájemně neinhibují. Tyto skupiny byly použity pro studium biodegradace sulfometaxazolu (SMX). U obou kultur byla efektivita degradace SMX v porovnání s čistými kulturami nižší. Obě skupiny vykazovaly 5% úbytek SMX po 300 hod kultivace, zatímco *R. equi* odboural 5 % SMX již po 24 hod. Je zřejmé, že při práci se směsnými společenstvy je nutné věnovat pozornost optimalizaci jejich složení.

Andersson *et al.* (2000) ve své studii vlivu hub na koncentraci PAU v půdě pozorovali antagonismus růstu hub a půdních bakterií. Do půdy kontaminované PAU byly přidány houby *P. ostreatus*, *P. chrysosporium* a *Hypholoma fasciculare*. U všech tří hub byla ve sterilní půdě pozorována schopnost degradovat PAU, zatímco v přítomnosti půdních bakterií degradace PAU neprobíhala. Dvě ze tří hub v přítomnosti bakterií nerostly, pouze *H. fasciculare* byla schopna růst v nesterilní kultivační půdě.

3.3.2. Vznik a optimalizace směsných kultur

3.3.2.1. Umělá mikrobiální konsorcia

Příprava směsných kultur může probíhat několika způsoby. Jedním z nich je vytvoření umělého mikrobiálního konsorcia, které vznikne smícháním jednotlivých kmenů mikroorganismů. Takový postup použili Phugare *et al.* (2011), kteří nejprve provedli kultivaci čistých bakteriálních kmenů *P. aeruginosa* BCH a rodu *Providencia* SDS odděleně a poté je smíchali dohromady v bakteriální konsorcium nazvané SDS.

Ve studii Ho *et al.* (2010) byla k přípravě bakteriálního konsorcia úspěšně použita metoda „toxicity-to-extinction“, kterou bylo získáno minimální funkční konsorcium, jež efektivně degradovalo meta-, para- a orto-kresoly. Byla pozorována degradace kresolů, které byly přidány v koncentraci 0-1 000 mg/l do aktivovaného kalu. Se zvyšováním počáteční koncentrace kresolů bylo pozorováno snížení mikrobiální diverzity. Ke studiu bakteriální diverzity v aktivovaném kalu byla použita denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE), kterou byly studovány amplifikované fragmenty genů 16S rRNA získaných ze vzorků aktivovaného kalu.

Dynamika mikrobiálních populací může být ovlivněna také přidáním surfaktantů do média, které mohou zvýšit dostupnost PAU (naftalen, fenanthren, anthracen) pro degradiující bakterie. Ve studii González *et al.* (2011) byl studován vliv biologicky odbouratelného surfaktantu Tween-80 a biologicky neodbouratelného surfaktantu Tergitolu NP-10 na degradační kapacitu bakteriálního konsorcia C2PL05, tvořeného *Pseudomonas* sp., *Sphingomonas* sp., *Sphingobium* sp. a *Agromonas* sp. Bez přidání surfaktantu do média nedocházelo k odbourávání PAU. Po přidání Tergitolu NP-10 byly PAU odbourány za 40 dní, po přidání Tween-80 po 15 dnech. Dále výsledky ukázaly, že pokud byl Tween-80 jediným zdrojem uhlíku v médiu, konsorcium ho úspěšně degradovalo. Pokud byl v médiu jediným zdrojem uhlíku Tergitol NP-10, buňky nerostly. Je zřejmé, že výběr surfaktantu za účelem zvýšení biologické dostupnosti PAU je pro *in situ* bioremediaci důležitý, protože toxicita může přetrvávat, pokud surfaktanty nejsou biologicky odbouratelné.

Pro optimalizaci mikrobiálního konsorcia byla vyzkoušena řada metod. Jednou z nejjednodušších metod je sestavení mikrobiálního konsorcia na základě růstových vlastností, tj. kombinace kmenů bakterií či hub, které rostou na daném substrátu podobnou rychlostí. Ověření funkčnosti mikrobiálního konsorcia pomocí růstových inhibičních testů

nemusí být vždy dostačující metodou pro optimalizaci směsných kultur, jak bylo ukázáno ve studii Larcher a Yargeau (2011), zmíněné v Kap. 3.3.1.

Naproti tomu Kausar *et al.* (2010) dosáhli pozitivního výsledku při tvorbě konsorcia z lignocelulolytických hub, které byly izolovány z rýžové slámy. Konsorcium bylo sestaveno na základě růstových charakteristik a vzájemné kompatibility kmenů. Byly vybrány houby *A. niger* a *Trichoderma viride*. Konsorcium degradovalo celulózu, hemicelulózu a lignin efektivněji než jednotlivé kmeny.

Podobně také Alkhatib *et al.* (2011) ve své studii biodegradace ropy sestavili mikrobiální konsorcium na základě růstových vlastností. Ke studiu biodegradace využili bakteriální kmeny izolované z půdy kontaminované ropou. Dvanáct z nich, které nejlépe rostly v minimálním médiu s ropou jako jediným zdrojem uhlíku, bylo použito pro tvorbu čtyř bakteriálních konsorcií. Konsorcia byla sestavena tak, aby byly kombinovány kmeny s podobnou růstovou rychlostí. Nejlépe rostlo konsorcium složené z bakterií s nejvyšší růstovou rychlostí, které bylo poté použito pro studium biodegradace, po 4 dnech bylo odbouráno 98,8 % ropy. Kmeny tvořící toto konsorcium byly identifikovány jako *Klebsiella pneumoniae* a *Enterobacteriaceae*.

Jako vhodná metoda pro vznik mikrobiálního konsorcia se ukázala být postupná subkultivace v přítomnosti rýžové slámy, kterou použili Wang *et al.* (2011) pro vytvoření bakteriálního konsorcia WCS-6. Komunita tvořená minimálně čtrnácti aerobními a anaerobními bakteriemi, které byly získány ze vzorků kompostu, efektivně degradovala celulóзовý materiál (rýžovou slámu, bavlnu a filtrační papír).

Nejpoužívanější metody pro optimalizaci mikrobiálních konsorcií jsou v současné době založené na statistickém návrhu experimentů, jako je např. „Response Surface Methodology“. Ayed *et al.* (2010b) využili k optimalizaci bakteriálního konsorcia analyzační program, který experimentálně navrhl poměry bakteriálních kmenů. V pokusu byla sestavena bakteriální konsorcia tvořená bakteriálními kmeny *Sphingomonas paucimobilis*, *B. cereus* ATCC14579 a *B. cereus* ATCC11778 v poměrech od 0 % do 100 %. Nejvyšší hodnoty dekolorizace dosahovalo bakteriální konsorcium s převahou *B. cereus* ATCC11778 a *B. cereus* ATCC14579, po 48 hod kultivace bylo odbouráno 92 % barviva.

Stejný postup při přípravě bakteriálního konsorcia použili Ayed *et al.* (2010a) také v další studii, kdy byla sledována dekolorizace metylové červeni bakteriemi *Sphingomonas paucimobilis*, *Bacillus* sp. a *Staphylococcus epidermidis*. Konsorcium z těchto tří bakterií se ukázalo být v degradaci metylové červeni efektivní nad rámec předpokládaných hodnot.

Jin *et al.* (2012) využili počítačový program k výpočtu optimálního poměru směsi bakterií *Arthrobacter* sp. NB1, *Serratia* sp. NB2 a *Stenotrophomonas* sp. Všechny tři kmeny bakterií byly schopny degradovat nitrobenzen, ve směsi byla účinnost degradace dvakrát vyšší než pro jednotlivé kmeny. Jako optimální poměr bakterií ve směsi se ukázal poměr 4:4:5 v pořadí uvedeném výše.

Uměle připravená bakteriální konsorcia ale jen stěží vystihují chování mikroorganismů v jejich přirozeném prostředí, proto jsou pro studium biodegradace často využívána také mikrobiální konsorcia získaná přímo z půdy kontaminované daným xenobiotikem.

3.3.2.2. Přirozená mikrobiální konsorcia

Jednou z možností, jak získat přirozené mikrobiální konsorcium, jsou obohacovací kultivační techniky. Tuto metodu použili Patel *et al.* (2012) při získání stabilního bakteriálního konsorcia DV-AL z půdních sedimentů, které efektivně degradovalo naftalen. Ze sedimentů na pobřeží byly odebrány vzorky, které byly přidány do média s naftalenu jako jediným zdrojem uhlíku. Po týdnu byla kultura přeočkována do čerstvého média s vyšším obsahem naftalenu a tento postup byl ještě několikrát opakován. Takto získané mikrobiální konsorcium během 24 hodin kultivace odbouralo 1000 ppm naftalenu. Analýza 16S rRNA genů tohoto konsorcia ukázala, že je tvořeno čtyřmi bakteriálními kmeny, a to *Achromobacter* sp. BAB239, *Pseudomonas* sp. DV-AL2, *Enterobacter* sp. BAB240 a *Pseudomonas* sp. BAB241. Konsorcium bylo schopno také využívat další aromatické a alifatické uhlovodíky jako jediný zdroj uhlíku. Degradace naftalenu nebyla narušena přítomností dalších polutantů, jako jsou těžké kovy a ropné uhlovodíky, což mu dává potenciál pro využití v bioremediačních procesech.

Obohacovací kultivační techniky použili také Sasikala *et al.* (2012) pro získání bakteriálního konsorcia ze zemědělské půdy, které bylo využito k degradaci pesticidu chlorpyrifos. Ze vzorku půdy byly získány čtyři z bakteriálních kmenů, které degradovaly chlorpyrifos s největší efektivitou, a z nich bylo připraveno konsorcium. Pomocí analýzy 16S rDNA bylo zjištěno, že se jedná o *P. putida*, *Klebsiella* sp., *P. stutzeri* a *P. aeruginosa*. Po 30 dnech kultivace konsorcium odbouralo přes 70 % chlorpyrifosu v médiu. Bakteriální konsorcia tedy mohou být s úspěchem využívána k degradacím zbytků pesticidů v zemědělské půdě.

3.3.2.3. Vliv kontaminace na funkčnost mikrobiálního konsorcia

V prostředí, kterému by byly vystaveny houby při pŕmyslové aplikaci při ŕištění odpadních vod, lze předpokládat kontaminaci houbového filtru jinými mikroorganismy a tím pádem vznik směsné kultury. Byly provedeny studie, kdy bylo zjišťováno, zda tato kontaminace ovlivní u hub schopnost biodegradace.

Li *et al.* (2015) sledovali degradaci farmaceuticky aktivních látek karbamazepinu a naproxenu houbou *P. chrysosporium* za nesterilních podmínek. Houba byla kultivována ve dvou typech bioreaktoru, ve kterých byla imobilizována na dřevěných pilinách nebo tvořila volně plovoucí myceliální pelety. Degradace obou látek byla v imobilizovaném systému účinnější. Byl pozorován negativní vliv bakteriální kontaminace na schopnost houby degradovat xenobiotika.

Gros *et al.* (2014) sledovali degradaci rentgenové kontrastní látky jopromidu a antibiotika ofloxacinu houbou *T. versicolor* za sterilních a nesterilních podmínek. Kultivace probíhala ve „fluidized-bed“ bioreaktoru. Ve sterilních podmínkách bylo po 8 dnech kultivace odstraněno 87 % jopromidu, v nesterilních podmínkách bylo odbouráno 65,4 % jopromidu. Efektivita degradace ofloxacinu byla bakteriální kontaminací neolivněna, v obou případech dosahovala přibližně 99 %.

Stejně tak i Hai *et al.* (2013) pozorovali snížení efektivity dekolorizace azobarviva Acid Orange 7 houbou *Coriolus versicolour* vlivem bakteriální kontaminace. Ve studii byly použity dva bioreaktory. V jednom byla houba kultivována ve formě volně plovoucích myceliálních pelet a v druhém byla kombinace plovoucích myceliálních pelet a biomasy rostoucí na podkladu. Oba typy kultivace dosahovaly vysoké efektivity dekolorizace. Během 1 dne bylo odbouráno kolem 95-99 % barviva. V bioreaktoru s myceliálními peletami byla po 26 dnech kultivace zaznamenána bakteriální kontaminace, která způsobila výrazné snížení dekolorizační schopnosti pelet a jejich desintegraci. V druhém typu bioreaktoru nebyla pozorována významná bakteriální kontaminace, ani snížení míry dekolorizace. Imobilizované mycelium bylo tedy odolnější vůči bakteriální kontaminaci a vhodnější pro praktickou aplikaci než volně plovoucí myceliální pelety.

Negativní vliv bakteriální kontaminace pozorovali ve své studii také Olivieri *et al.* (2012), kteří sledovali degradaci fenolů z odpadní vody z výroby olivového oleje houbou *P. ostreatus*. Endogenní mikroorganismy přítomné v odpadní vodě kompetovaly s *P. ostreatus* o kyslík a odbourávání fenolů v odpadní vodě neprobíhalo. Pokud byla odpadní voda 2 dny před očkovaním houby provzdušněna, fenoly byly úspěšně degradovány.

Naproti tomu Cruz-Morato *et al.* (2013) nezjistili ve své studii žádný vliv bakteriální kontaminace na schopnost houby odbourávat xenobiotika. Ve studii byla sledována degradace farmaceuticky aktivních látek za nesterilních podmínek houbou *T. versicolor*. Houba byla kultivována ve „fluidized-bed“ bioreaktoru v odpadní vodě, v níž bylo detekováno celkem deset farmaceuticky aktivních látek, které patří mezi analgetika, beta-blokátory, antibiotika a psychiatrická léčiva. Zhruba 50 % z nich bylo po 8 dnech kultivace odbouráno zcela, 25 % z nich bylo odbouráno částečně. Ve sterilních podmínkách byla efektivita degradace stejná jako za nesterilních podmínek.

Halecký *et al.* (2013) popsali situaci při studiu dlouhodobé degradace směsi fenolů, kdy byla bakteriální kultura v bioreaktoru kontaminována čtyřmi houbovými druhy.

V uvedeném přehledu zmíněné práce nestudují konkrétní mechanismy, jak se kompetující organismy vzájemně ovlivňují a z jakého důvodu dochází ke snížení degradačního potenciálu houby. S výjimkou práce Olivieri *et al.* (2012) se zabývají pouze účinností degradace.

3.3.3. Metody studia směsných kultur

V současné době mezi nejpoužívanější metody studia směsných kultur patří molekulární metody, které nejsou závislé na kultivaci mikroorganismů a umožňují tak detekovat i nekultivovatelné mikroorganismy. Jsou tedy mnohem výhodnější než klasické kultivační metody. Molekulární techniky založené na analýze půdní DNA usnadňují studium mikrobiální ekologie a diverzity a umožňují detekci a analýzu genů podílejících se na biodegradaci. Mezi tyto metody patří techniky jako je PCR, DNA sekvenace a analýza genů kódujících 16S rRNA a 18S rRNA a proteinové techniky.

Významnou metodou je DGGE, která je široce používána k charakterizaci půdních bakteriálních a houbových společenstev. Touto metodou je možné detekovat kmeny, které jsou zastoupeny ve společenstvu pouhým 1 % (Muyzer *et al.* 1993). Přestože DGGE nabízí řadu výhod, neumožňuje získat funkční kmeny pro bližší analýzu a praktickou aplikaci. V takovém případě je potom nutná klasická izolace mikroorganismů.

Metodu analýzy genů a transkriptů 16S a 18S sRNA pomocí DGGE použili Demanou *et al.* (2006) ve své studii, která se zabývá vlivem fungicidu mefenoxamu a mědi na strukturní a funkční diverzitu bakteriálních a houbových společenstev.

Metody PCR a DGGE byly také použity ve studii Chen *et al.* (2014a) k charakterizaci společenstva bakterií a hub v půdě znečištěné pesticidem chlorpyrifos. Byly získány izoláty

schopné degradovat chlorpyrifos, které byly podrobně charakterizovány za použití enterobakteriální repetitivně intergenní konsensus-PCR (ERIC-PCR). Tyto ERIC-sekvence se vyskytují u gram-negativních bakterií a jsou to repetitivní elementy, které jsou rozmístěny podél celého bakteriálního chromozomu v intergenových oblastech polycistronních operonů nebo ohraničujících otevřené čtecí rámce. Jejich nukleotidová sekvence je vysoce konzervovaná, ale umístění se mezi druhy liší (Hulton *et al.* 1991). Při ERIC-PCR dochází k amplifikaci fragmentů genomové DNA za použití různých sad primerů, které jsou komplementární k těmto krátkým repetitivním sekvencím (Yuan *et al.* 2010).

Ve studii zabývající se vlivem směsi těžkých kovů (Cd, Cu, Pb a Zn) na růst a diverzitu mikrobiálního společenstva v půdě byla rovněž využita metoda DGGE. Ve společenstvu po přidavku těžkých kovů došlo k znatelnému úbytku množství a diverzity hub, zatímco množství a diverzita bakterií byla ovlivněna méně. Následnou sekvenací proužků DGGE bylo zjištěno, že nejvíce inhibovanými skupinami ve společenstvu byly *Acidobacteria*, *Ascomycota* a *Chytridiomycota* (Chen *et al.* 2014b).

Metody PCR a DGGE byly použity k analýze biodiverzity hub, které kontaminovaly bioreaktory s houbami bílé hniloby degradujícími barviva. Bylo zjištěno, že v průběhu kultivace diverzita kontaminace v sekvenčním bioreaktoru stoupala, zatímco v kontinuálním bioreaktoru klesala. Ve studii byl také sledován vliv houbové kontaminace na degradační schopnost hub bílé hniloby. Kontaminující houby kompetovaly s *P. chrysosporium* o živiny a měly tak negativní efekt na její růst, což vedlo ke snížení účinnosti dekolorizace (Lu *et al.* 2010).

Cyplik *et al.* (2011) použili ke studiu dynamiky bakteriálního společenstva degradujícího naftu real-time PCR.

Jho *et al.* (2014) studovali vliv Fentonova činidla, které je přidáváno do odpadních vod, na strukturu a funkci mikrobiálního společenstva v anaerobním bioreaktoru, které degradovalo chlorované alifatické látky (chloroethan a tetrachlorethen). Ke strukturní analýze společenstva byla použita metoda sekvenování 16S rRNA genů a automatizovaná analýza intergenních ribozomálních spacerů (ARISA). Metoda ARISA je založená na amplifikaci mezigenových oblastí mezi 16S a 23S rRNA genů v rRNA operonu, známých jako ITS1 oblast, které jsou typické značnou variabilitou v délce a nukleotidové sekvenci napříč různými bakteriálními genotypy (Daffonchio *et al.* 2003). Ve společenství, které bylo vystaveno působení Fentonova činidla, došlo ke snížení degradace chlorovaných alifatických látek a změnám ve struktuře společenstva (Jho *et al.* 2014).

Společenstvo v půdě může být charakterizováno i proteomickými metodami, mezi které patří jednorozměrná a dvourozměrná polyakrylamidová gelová elektroforéza (1-D a 2-D PAGE). Metodu 1-D PAGE použili např. Williams *et al.* (2010) ve své studii charakterizace proteomu mikrobiálního společenstva v půdě vystavenému působení toluenu. S pomocí hmotnostní spektrometrie bylo zjištěno, že buňky produkovaly ve větší míře některé proteiny (ABC transportéry, extracytoplazmatické vazebné proteiny a proteiny vnější membrány). Ve studii byla provedena také sekvenace genů 16S rRNA, která odhalila, že ve společenstvech ovlivněných přítomností toluenu v půdě z 80 % dominovaly bakterie velmi příbuzné rodu *Bacillus*, který je odolný vůči toluenu. Bylo studováno také spektrum metylesterů mastných kyselin.

Detekovat mikroorganismy v půdě lze také pomocí metody analýzy fosfolipidů bakteriálně či houbově specifických mastných kyselin (phospholipid fatty acids analysis, PLFA). Tuto metodu použili ve své studii Andersson *et al.* (2000), kteří pozorovali vliv hub na koncentraci PAU v půdě a na půdní bakteriální populaci.

Výše uvedené metody jsou vhodné pro studium struktury komplexních společenstev. S jejich pomocí lze charakterizovat biodiverzitu v půdě a strukturu a dynamiku společenstva během degradace. Ve výše uvedených pracech však nebylo řešeno, jak spolu mikroorganismy interagují a jaké mechanismy k tomu využívají. Výjimkou je studie Beaufort *et al.* (2012), ve které byl studován fenomén kompetice mezi modelovými organismy *E. coli* a kvasinkou *S. cerevisiae*. Do bioreaktoru byla očkovaná *S. cerevisiae* a o pár dní později byla přidána *E. coli*, která měla napodobovat kontaminaci. *S. cerevisiae* exprimovala zelený fluorescenční protein a *E. coli* červený fluorescenční protein, které byly detekovány skenovací konfokální laserovou mikroskopií. Ve studii byla demonstrována schopnost kvasinek tvořit biofilmy, ale bakteriální biofilm kvasinky rychle přerostl. Nicméně bakteriální biofilm měl na vývoj kvasinkového biofilmu pozitivní efekt tím, že docházelo k zachycování kvasinkových buněk do bakteriální exopolymerní struktury.

3.3.4. Mechanismy mezidruhových interakcí ve směsných společenstvech

Většina poznatků o biofilmech byla získána pozorováním jednodruhového biofilmu, ale v životním prostředí je biofilm obvykle tvořen několika bakteriálními druhy a jeho součástí bývají často také houby, řasy a prvoci (Jass *et al.* 2002). Mezidruhové interakce v biofilmu jsou studovány zejména kvůli klinickému významu vícedruhových biofilmů

(Pastar *et al.* 2013), podobné mechanismy byly později objeveny také v bakteriálních biofilmech izolovaných z přírodního prostředí (Burmolle *et al.* 2006).

Je známo, že život v biofilmu bakteriím poskytuje řadu výhod ve srovnání s planktonními buňkami (viz Kap. 3.1.4). Ochranná funkce biofilmu se ještě zvyšuje, je-li biofilm tvořen více bakteriálními druhy. Tuto skutečnost dokázali Burmolle *et al.* (2006) na příkladu čtyř bakteriálních kmenů izolovaných z mořské vody, které při společné kultivaci vytvořily o více než 167 % vyšší vrstvu biofilmu než je tloušťka jednodruhového biofilmu těchto bakterií. Buňky ve vícedruhovém biofilmu byly také odolnější vůči působení tetracyklinu a peroxidu vodíku a invazi bakterie *Pseudoalteromonas tunicata* než v jednodruhovém biofilmu.

Ve vícedruhových biofilmech byla zaznamenána zvýšená virulence ve srovnání s jednodruhovými biofilmy. Infekce rány methicillin-rezistentním *S. aureus* USA300 a *P. aeruginosa* a následný vznik duálního biofilmu způsobily podstatně pomalejší uzdravování, než jaké bylo zaznamenáno u neinfikované rány či u rány infikované jen jedním bakteriálním druhem (Pastar *et al.* 2013). Stejně tak i houby mohou stimulovat virulenci *S. aureus*. Při koinfekci *S. aureus* a *C. albicans* došlo ke zvýšení virulence *S. aureus* dvěma způsoby (Peters *et al.* 2010). Bylo zjištěno, že bakteriální buňky jsou těsně asociovány s houbovými hyfami, což pravděpodobně zvyšuje invazivitu *S. aureus* skrze epiteliální vrstvy. Analýza proteinů odhalila, že během kokultivace došlo ke snížení transkripce globálního transkripčního represoru CodY, který u *S. aureus* reprimuje funkce související s virulencí (Peters *et al.* 2010).

Vícedruhové biofilmy mohou tvořit optimální prostředí pro koexistenci druhů s různými typy metabolismu, např. aerobních a anaerobních druhů bakterií. Takové uspořádání je např. v biofilmech odstraňujících dusík v čistírnách odpadních vod, nitrifikační bakterie vyžadující kyslík tvoří povrch biofilmu a anaerobní denitrifikační bakterie jsou ve spodních vrstvách (Terada *et al.* 2003).

Vyšší odolnost a konkurenceschopnost vícedruhových biofilmů zvyšuje potenciál těchto společenstev pro využití v biodegradaci látek znečišťujících životní prostředí. Ve vícedruhovém biofilmu byla zaznamenána vyšší schopnost degradace PAU (Stach *et al.* 2002).

Ve vícedruhových biofilmech často probíhá přenos genů mezi různými bakteriálními druhy horizontálním genovým přenosem (HGT). Byl zaznamenán přenos genu tetracyklinové rezistence (TetM) na konjugativním transpozonu z *Veillonella dispar* do čtyř kmenů *Streptococcus* spp. v biofilmu ústní dutiny (Hannan *et al.* 2010). Blízkost více bakteriálních

druhů pravděpodobně také zvyšuje četnost HGT. Bakteriální kmen *Ochrobactrum rhizosphaerae* nebyl schopen přijmout plazmid, pokud byl kultivován pouze s donorovým kmenem *E. coli*. Ve společenstvu tvořeném celkem 15 bakteriálními druhy konjugace proběhla úspěšně (de la Cruz-Perera *et al.* 2013).

V mikrobiálních společenstvech a při tvorbě biofilmu hraje důležitou roli quorum sensing. Gram-negativní bakterie využívají ke komunikaci N-acyl homoserin lakton (AHL) (Galloway *et al.* 2011), zatímco gram-pozitivní bakterie peptidy (Tomasz 1965). Komunikace skrze AHL je druhově specifická (Riedel *et al.* 2001), zatímco autoinduktor 2 (furanosylborát-diester) se pravděpodobně uplatňuje v mezidruhové bakteriální komunikaci (Saito *et al.* 2008).

Bakteriální buňky v biofilmu jednodruhovém i vícedruhovém spolu přímo i nepřímo interagují. Přímá interakce, kdy jsou buňky vzájemně v těsném kontaktu, byly nalezeny např. v biofilmu ústní dutiny. Tato specifická interakce se nazývá koagregace a často se podílí na vzniku vícedruhového biofilmu (Kolenbrander *et al.* 2010). Při nepřímé interakci dochází k usnadnění tvorby biofilmu jednoho druhu bakterie přítomností jiného bakteriálního druhu. Taková interakce byla pozorována při tvorbě biofilmu *P. aeruginosa* a patogenního kmene *E. coli* O154:H7. *E. coli* samostatně biofilm netvořila, ale byla schopna přisednout na biofilm preformovaný *P. aeruginosa* (Klayman *et al.* 2009).

Ve vícedruhovém biofilmu může probíhat kooperace na úrovni metabolismu. Ve směsném biofilmu *P. putida* a *Acinetobacter* sp. byla pozorována kooperace při růstu na benzyl alkoholu. *Acinetobacter* metabolizoval benzyl alkohol na benzoát, který dále spotřebovávala *P. putida* (Hansen *et al.* 2007).

Cho *et al.* (2003) ve své studii pozorovali pozitivní vliv fluorescentních pseudomonád, které byly izolovány z povrchu *P. ostreatus*, na růst houbového mycelia a tvorbu primordií a basidiomu. Hiscox *et al.* (2010) popsali ve své studii mezidruhový houbový antagonismus mezi *T. versicolor* a pěti dalšími houbami, který se projevil zvýšenou produkcí oxidativních enzymů v zónách interakce mycelií, zejména lakázy a MnP.

Zmíněný přehled prací dokazuje, že směsná bakteriálně-houbová společenstva mohou být efektivní v biodegradacích a kontaminace čistých kultur, vedoucí také ke vzniku směsných společenstev, může mít pozitivní i negativní vliv na biodegradační potenciál hub. Zatím je však známo jen málo o mechanismech tohoto ovlivnění biodegradačního potenciálu. Současné DNA, proteinové i mikroskopické techniky nám dávají nástroj, jak analyzovat směsná společenstva i interakce mezi jednotlivými mikroorganismy. Tato práce se na

modelovém systému směsné kultury houby *P. ostreatus* a bakterie *R. erythropolis* snaží přiblížit interakci bakterie a houby a to i v průběhu degradace syntetického barviva RBBR.

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Chemikálie

Název chemikálie	Výrobce	Zkratka
2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonová kyselina	AppliChem	ABTS
2,6-dimethylfenol, purum ≥ 97 % (GC) ve 20% EtOH	Fluka	DMP
3,5-dinitrosalicylová kyselina ($\geq 98\%$)	Sigma Aldrich	DNS
Aceton	Lachema	
Agar (Agar Bacteriological)	Oxoid	
Akrylamid	Serva	
Benzonáza (2000 U)	Merck	
Bisakrylamid	Serva	
Bromfenolová modř	Lach-ner	
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva	
D-glukóza monohydrát G.R.	Lach-ner	
Dithiotreitol	Serva	DTT
Dusičnan stříbrný	Penta	
Ethanol	Lagron	
Fenol (pro molekulární biologii)	Fluka	
Glycerol	Lach-Ner	
Glycin	Serva	
Hydroxid sodný, p.a.	P-lab	
3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonio]propan-1-sulfonát	Serva	CHAPS
Chlorid hořečnatý	Lach-Ner	
Izopropanol	Lach-Ner	
Kyselina ethylendiamintetraoctová	Sigma-Aldrich	EDTA
Kyselina chlorovodíková	Lach-Ner	
Kyselina malonová p.a.	Sigma-Aldrich	
Kyselina octová, p.a.	P-lab	
Kyselina trichloroctová	Lach-Ner	TCA
Methanol	Lach-Ner	

Močovina	AppliChem	
Octan sodný p.a.	Lachema	
Peroxid vodíku 30% p.a.	Penta	
Peroxodisíran amonný	Sigma-Aldrich	APS
Pharmalyte pH 3-10	Sigma-Aldrich	
Phenylmethansulfonylfluorid	Sigma-Aldrich	PMSF
Remazol Brilliant Blue R	Sigma-Aldrich	RBBR
Dodecylsulfát sodný	P-lab	SDS
Síran manganatý p.a.	P-lab	
Sířičitan sodný, bezvodý (p.a.)	Mach Chemikálie s.r.o.	
Tetramethyldiamin	Serva	TEMED
Thiomočovina	Sigma-Aldrich	
Tris-HCl	Serva	
Vinan draselno-sodný, tetrahydrát	Lachema	

4.2. Laboratorní vybavení a přístroje

Přístroje		Výrobce
Binokulární lupa	Binokulární digitální lupa National	Motic Group Co. Ltd., Čína
Digitální fotoaparát	Olympus Powershot A460	Olympus, Japonsko
Skener	Expression 10 000 XL	Epson, USA
Centrifugy	Centrifuge Z 160 M	Hermle, Německo
	Spectrafuge™ Mini Centrifuge	Labnet, USA
	Universal 320 R	HETTICH, Německo
	Spectrafuge 24D	Labnet inc., USA
UV/Vis spektrofotometr	SpectraMax Plus 384	Molecular Devices, USA
Mikroskopy	Digitální mikroskop Motic BA 300 s fázovým kontrastem	Motic Group Co. Ltd., Čína
	Fluorescenční mikroskop Zeiss Jenalumar s digitální kamerou DSLR Nikon D 300	Zeiss, Německo
Váhy	Digitální váhy ACB plus – 600H	Adam Equipment, Velká Británie
	Analytické váhy A 200 S	Sartorius, Německo

	Přesné váhy 572	Kern, Německo
Kývače, míchače, třepačky	Kývač ProBlot™ Rocker 25	Labnet, USA
	Míchač Magnetic Stirrer 4802-02	Cole Parmer®, USA
	Míchač Microstirrer	VELP Scientifica, Itálie
	Třepačka Orbitron	Infors-HT, Švýcarsko
Vortexy	Genie	Bender & Hobein AG, Švýcarsko
	IKA® MS1 Minishaker	IKA-Werke GmbH & Co, Německo
Automatické pipety	Automatické pipety Pipetman®	Gilson®, USA
	Multi-pipety Eppendorf Xplorer	Eppendorf, Německo
Inkubátor	AccuBlock™ Digital Dry Bath	Labnet, USA
	Třepačka TH30	Edmund Bühler GmbH, Německo
pH metr	IQ140 pH/mV/Temp/ORP System	IQ Scientific Instruments, USA
Homogenizéry	Ultrasonic homogenizer 4710 Series	Cole Parmer®, USA
	T 18 digital Ultra-Turrax®	IKA labortechnik, Německo
Vybavení pro 1-D elektroforézu	Aparatura Atto AE-6220	Atto Technology inc., Japonsko
Vybavení pro 2-D elektroforézu	Electrophoresis Power Supply EPS 3501 XL	Amersham Biosciences, Švédsko
	Multiphor II Electrophoresis system	Pharmacia Biotech, Švédsko
	2-D Casting and Running Systems Investigator	Genomic Solutions, USA
Mikrokuličky	Skleněné mikrokuličky č. 10, vel. 265-325 µm	Ornela a.s., Česká republika
Polyuretanová pěna		GUMA s.r.o., Česká republika
Mikrotitrační destička 6-jamková	Nunc Nunclon Delta	Thermo Scientific, USA
Mikrotitrační destička 96-jamková	Nunc MicroWell 96	Thermo Scientific, USA

Počítačový program k UV/VIS spektrofotometru	SoftMax Pro 4.6	Molecular Devices, USA
--	-----------------	------------------------

4.3. Sterilizace materiálu

Veškeré laboratorní vybavení použité pro očkování a kultivaci mikroorganismů včetně kultivačních médií a nosičů (skleněné mikrokuličky, kostky polyuretanové pěny) bylo sterilizováno v autoklávu po dobu 25 min při 121 °C pod přetlakem 0,15 kPa.

4.4. Biologický materiál

- Bakteriální kmeny *Rhodococcus erythropolis* CCM 2595 a *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* CCM 303 pochází z České sbírky mikroorganismů v Ústavu experimentální biologie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně. Kmeny byly uchovávány v laboratoři v B1 médiu s 30% glycerolem při -80 °C. Tato zásobní konzerva obsahovala kulturu o $O.D._{600nm} = 2,0$.
- Kmen *Pleurotus ostreatus* 3004 byl získán ze sbírky basidiomycet CCBAS, Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i. Houbový kmen byl uchováván na MEG agarovém médiu při 4°C a subkultivován po pěti měsících.
- Enzym lakáza z kmene *Pleurotus ostreatus* 3004 byl purifikován v laboratoři Environmentální biotechnologie v Mikrobiologickém ústavu AVČR, v.v.i. Zásobní roztok o koncentraci enzymu 231 U/ml byl uchováván při -20 °C.

4.5. Mikroskopie

4.5.1. Binokulární lupa

Binokulární lupa National byla používána pro morfologické studie růstu *P. ostreatus* a *R. erythropolis* na skleněných mikrokuličkách a plovoucího biofilmu těchto organismů.

4.5.2. Optická mikroskopie

Optický mikroskop Motic umožňující digitální snímání obrazu byl využíván k pozorování směsných kultivací na kuličkách, zda bakterie rostou na houbových vláknech nebo mikroorganismy tvoří oddělená společenstva. Část kultury z misky byla odebrána, zbavena kuliček a byla připravena jako preparát pro mikroskopii. Vzorek nebyl barven.

4.5.3. Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie byla použita pro stanovení životaschopnosti buněk *R. erythropolis* při směsné kultivaci na kuličkách s *P. ostreatus*. Stanovení probíhalo metodou „live/dead“ barvení, kde barva proniká do mrtvých buněk. Pro barvení vzorků byl použit kit LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Inc., USA), postup dle přiloženého návodu.

4.6. Metody kultivace

4.6.1. Kultivační média

- **Nutrient Broth w 1% peptone (B1)**

Složení (na 100 g) směsi B1 (Himedia, Indie):

hovězí extrakt	40 g
pepton	40 g
chlorid sodný	20 g

Příprava 1 l B1 média: 25 g směsi B1 doplnit do 1 l destilovanou vodou. Pro přípravu pevného média přidat 20 g agaru. Médium sterilizovat v autoklávu. Konečné pH média je 7,2 ± 0,2 při 25 °C.

- **Malt extract glukózové médium (MEG)**

Složení (na 1 l):

Malt extract Broth (Oxoid, Velká Británie)	5 g
glukóza	10 g

Příprava 1 l Malt extract-glucose (MEG) média: 5 g Malt extract Broth doplnit do 1 l destilovanou vodou a přidat 10 g glukózy. Pro přípravu pevného média přidat 20 g agaru. Médium sterilizovat v autoklávu. Konečné pH média je $\text{pH } 5,4 \pm 0,2$ ve $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.6.2. Kultivace bakteriálních a houbových kultur na pevném a v tekutém médiu

4.6.2.1. Kultivace *P. ostreatus* na pevném a v tekutém médiu

Ke kultivaci *P. ostreatus* na pevném médiu byly použity Petriho misky o průměru 10 cm s 25 ml MEG média s přidaným agarem (2 %). Terčík agaru s myceliem (průměr 8 mm) byl odebrán ze zásobní agarové misky *P. ostreatus* staré 10 dní a byl umístěn do středu nové agarové misky. Kultivace probíhala v termostatu při $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, misky byly obaleny parafilmem a alobalem.

Pro kultivaci *P. ostreatus* v tekutém médiu byly použity 250ml Erlenmeyerovy baňky s 25 ml MEG média. Korkovrtem byly ze zásobní agarové kultury odebrány 3 terčíky agaru s myceliem a přeneseny do baňky. Kultivace probíhala staticky v termostatu při $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 14 dní. Poté byla kultura homogenizována pomocí T 18 digital Ultra-Turrax[®] (IKA Labor Technik, Německo) a výsledná suspenze byla použita pro inokulaci kultivace na skleněných mikrokuličkách či ve formě plovoucího biofilmu.

Ke kultivaci *P. ostreatus* na polyuretanové pěně (PUF) byly použity 250ml Erlenmeyerovy baňky s 50 ml MEG média a 1,5 g PUF kostek (o rozměru 1 cm^3). Kultura rostoucí na pevném MEG médiu byla rozkrájena skalpelem na kousky cca $5 \times 5\text{ mm}$ a do baňky byla přenesena třetina obsahu misky (mycelium i s agarem). Kultivace probíhala staticky v termostatu při 28°C 2 týdny. Kultura narostlá na PUF kostkách byla použita pro očkování „fixed-bed“ bioreaktoru.

4.6.2.2. Příprava zásobních bakteriálních kultur

Zásobní kultury *R. erythropolis* a *S. marcescens* v glycerolových konzervách byly připraveny z tekuté kultury v B1 médiu, která byla kultivována přes noc při $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ na orbitální třepačce při 160 rpm. Do mikrozku mávek Eppendorf[®] o objemu 1,5 ml bylo přidáno 500 μl bakteriální kultury a 500 μl 60% glycerolu, výsledná $\text{O.D.}_{600\text{nm}}$ zásobních kultur ve 30% glycerolu byla přibližně 2,0. Takto připravené zásobní kultury byly skladovány v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.6.2.3. Kultivace *R. erythropolis* na pevném a v tekutém médiu

Tekuté kultury *R. erythropolis* byly připraveny ve 100ml Erlenmeyerově baňce v 10 ml B1 nebo MEG média. Tekutá kultura byla zaočkována 300 μ l zásobní kultury z glycerolové konzervy a kultivace probíhala přes noc v termostatu při 28 °C, na orbitální třepačce při 160 rpm.

Ke kultivaci *R. erythropolis* na pevném médiu byly použity Petriho misky o průměru 10 cm s 25 ml MEG média s přidaným agarem (2 %). Na misku bylo očkováno 10 μ l bakteriální kultury (nočního inokula). Kultivace probíhala v termostatu při 28 °C po dobu 6 dní.

4.6.2.4. Kokultivace *P. ostreatus* a *R. erythropolis* na agarovém médiu

Houbové a bakteriální kultury byly kultivovány společně na MEG agarovém médiu s cílem sledovat tvorbu inhibičních zón mezi organismy. Ke kultivaci byly použity Petriho misky (průměr 10 cm) s 25 ml MEG agarového média. Do středu misky byl inokulován 1 terčík ze zásobní kultury *P. ostreatus*. Ve vzdálenosti cca 1,5 cm od houbového terčíku byla inokulována kultura *R. erythropolis*, a to buď v čase očkování *P. ostreatus*, nebo 3 dny po zahájení kultivace *P. ostreatus*. K inokulaci bylo použito 10 μ l tekuté bakteriální MEG kultury (viz Kap. 4.6.2.3). Inokulované misky byly zalepeny parafilmem a inkubovány 6 dní při 28 °C.

Jako kontrola byly použity misky s *P. ostreatus*, které byly také zaočkovány 1 terčíkem ze zásobní kultury *P. ostreatus* a misky s *R. erythropolis*, které byly inokulovány 10 μ l tekuté bakteriální MEG kultury. Kontrolní kultivace probíhala 6 dní při 28 °C.

4.6.2.5 Kultivace *S. marcescens* v tekutém médiu

Tekuté kultury *S. marcescens* byly připraveny ve 100ml Erlenmeyerově baňce v 10 ml B1 nebo MEG média. Tekutá kultura byla zaočkována 300 μ l zásobní kultury z glycerolové konzervy a kultivace probíhala přes noc v termostatu při 28 °C, na orbitální třepačce při 160 rpm.

4.6.3. Kultivace *P. ostreatus* a *R. erythropolis* na skleněných mikrokuličkách

Další metodou použitou pro směsnou kultivaci obou mikroorganismů byla kultivace na skleněných mikrokuličkách. Před pokusem byly mikrokuličky promyty a povařeny v 0,1M

HCl (100 °C, 30 min) a následně ještě důkladně omyty vodovodní a následně destilovanou vodou. Poté byly mikrokuličky vysušeny na vzduchu a vysterilizovány v autoklávu.

Kultivace probíhala na Petriho miskách o průměru 6 cm. Na dno misek bylo umístěno 10 ml vysušených a vysterilizovaných skleněných mikrokuliček a přidáno 5 ml MEG média. Misky byly rovnoměrně zaočkovány pomocí 1 ml homogenizované suspenze kultury *P. ostreatus* v MEG médiu (viz Kap. 4.6.2.1). Jako inokulum *R. erythropolis* bylo použito 1 ml tekuté bakteriální kultury v B1 médiu o $O.D._{600nm} = 2,0$ (viz Kap. 4.6.2.3). Tato bakteriální suspenze byla nakapána na povrch kuliček, u směsných kultur byla nakapána na povrch mycelia.

Misky s houbou *P. ostreatus* byly kultivovány staticky 8 dní při 28 °C ve vlhké komůrce, poté byl přidán *R. erythropolis* a kultivace pokračovala další 3 dny. Misky obsahující pouze *R. erythropolis* byly kultivovány po dobu 8 dní při 28 °C. Misky byly po 3 (bakteriální kultura), 8 (houbová kultura) a 11 (směsná kultura) dnech kultivace vyfoceny fotoaparátem a vyhodnoceny za použití binokulární lupy. Rovněž byly odebrány vzorky pro proteomickou analýzu.

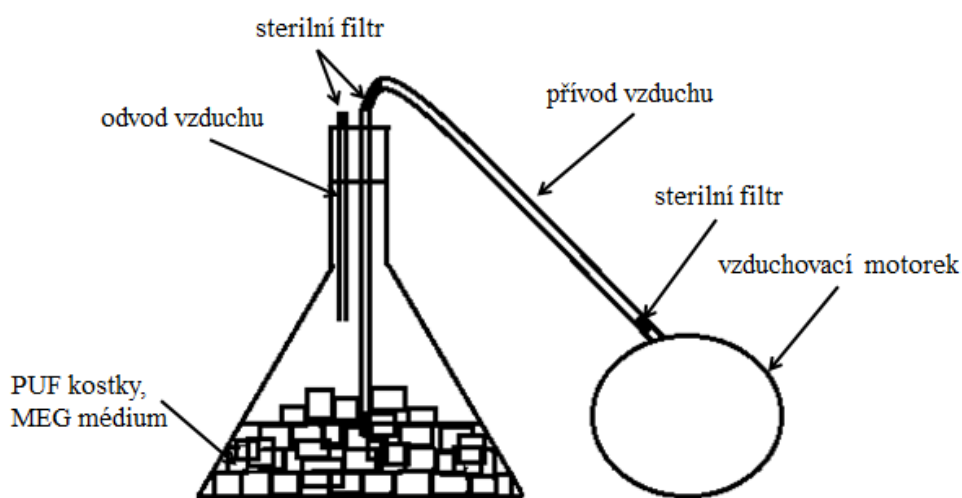
4.6.4. Kultivace *P. ostreatus* a *R. erythropolis* ve formě plovoucího biofilmu

Dalším použitým kultivačním systémem byla kultivace ve formě plovoucího biofilmu v 6-jamkové mikrotitrační destičce s tekutým médiem. Do jamek bylo sterilně nalito 7 ml média. Byla připravena 1 destička s B1 médiem a 2 destičky s MEG médiem. Inokulum *P. ostreatus* v tekuté kultuře bylo zhomogenizováno a jamky zaočkovány touto suspenzí do finální koncentrace 3 %, 5 % či do 7 % (v/v). Inokulum *R. erythropolis* v B1 médiu připravené dle Kap. 4.6.2.3 bylo očkováno do tří výsledných koncentrací – na $O.D._{600nm} = 0,4$, 0,5 a 1,0. Destičky byly zaočkovány následovně: destička s B1 médiem pouze *R. erythropolis*, jedna destička s MEG médiem pouze *P. ostreatus*, druhá s MEG médiem byla zaočkována směsí obou mikroorganismů. Kultivace probíhala staticky po dobu 13 dní při 28 °C, po ukončení kultivace byly pořízeny snímky biofilmu fotoaparátem a binokulární lupou.

4.6.5. Kultivace *P. ostreatus* a *R. erythropolis* ve „fixed-bed“ bioreaktoru

Jako další kultivační systém pro kokultivaci *P. ostreatus* a *R. erythropolis* byla použita kultivace ve „fixed-bed“ bioreaktoru. Bioreaktor byl tvořen 250ml Erlenmeyerovými baňkami se vzdušnáním (viz schéma na Obr. 5) a byl inokulován houbovou kulturou narostlou na PUF

kostkách (viz Kap. 4.6.2.1). Do bioreaktoru byl asepticky přenesen celý obsah jedné baňky PUF kultury *P. ostreatus* a bylo přidáno 80 ml MEG média. Jako inokulum *R. erythropolis* byly použity tekuté kultury narostlé ve 20 ml MEG média (viz Kap. 4.6.2.3). Bioreaktor byl očkovan bakteriemi na výslednou $O.D._{600nm} = 0,2$ v 80 ml MEG média. Pro měření schopnosti dekolorizace *P. ostreatus* a *R. erythropolis* bylo do vybraných bioreaktorů přidáno barvivo RBBR na výslednou koncentraci 100 mg/l v konečném objemu kultivačního média. Po inokulaci byly bioreaktory připojeny ke vzdušnění a kultivace probíhala staticky při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin. V průběhu kultivace byly v časech 0, 4, 6 a 24 hod odebrány vzorky (0,6 ml kultivační tekutiny) k měření množství bakterií v médiu, ke stanovení množství barviva RBBR v médiu a k měření enzymatické aktivity lakázy (Lac), mangan-dependentní peroxidázy (MnP) a mangan-independentní peroxidázy (MiP). Zpracování vzorků je popsáno v následujících podkapitolách. Všechna spektrofotometrická měření probíhala v objemu 200 μ l na 96-jamkové destičce ve spektrofotometru SpectraMax Plus 384. Jako blank sloužilo čisté MEG médium.



Obr. 5. – Schéma kokultivace *P. ostreatus* a *R. erythropolis* ve „fixed-bed“ bioreaktoru.



Obr. 6. – Snímek z digitálního fotoaparátu; kultivace *P. ostreatus* ve „fixed-bed“ bioreaktoru.

4.6.5.1. Stanovení růstu bakterií ve „fixed-bed“ bioreaktoru

Z odebraného vzorku kultivační tekutiny bylo nejprve 200 μl použito na stanovení absorbance při vlnové délce 600 nm (Abs1) ihned po odebrání vzorku, následně byl zbytek vzorku stočen na centrifuze při 10 000 g po dobu 60 s a u supernatantu byla opět měřena absorbance při 600 nm (Abs2). Rozdíl hodnot absorbance Abs1 – Abs2 udává množství bakterií v médiu. Měření růstu bakterií v médiu v bioreaktoru bylo opakováno šestkrát.

Po ukončení kultivace byly ze dna bioreaktoru sterilně odebrány 3 PUF kostky, z nichž bylo vymačkáno zhruba 500 μl média. Médium bylo následně přefiltrováno za použití injekční stříkačky s nitrocelulózovým filtrem s póry o velikosti 0,45 μm , aby bylo vyčištěno od částí houbového mycelia. Z takto získaných vzorků byly připraveny ředící řady. Od každého vzorku bylo připraveno ředění 100x a 1000x. Z každého ředění, včetně neředěných suspenzí, bylo zaočkováno 50 μl na Petriho misku s B1 médiem. Misky byly kultivovány 2 dny při 30 °C, poté byl vyhodnocen nárůst bakteriálních kolonií. Experiment byl prováděn ve dvou opakováních.

4.6.5.2. Dekolorizace barviva RBBR ve „fixed-bed“ bioreaktoru

Na počátku kultivace bylo do bioreaktoru přidáno barvivo RBBR o koncentraci 100 mg/l. V průběhu kultivace byl měřen jeho úbytek. Ze vzorku kultivační tekutiny odebrané z reaktoru v časech 0, 4, 6 a 24 hod a stočené na centrifuze při 10 000 g po dobu 60 s bylo

použito 200 µl na měření absorbance při vlnové délce 592 nm. Úbytek barviva RBBR v bioreaktoru byl měřen ve čtyřech opakováních.

4.6.5.3. Stanovení enzymatické aktivity ligninolytických enzymů v bioreaktoru

V průběhu kultivace byla sledována aktivita ligninolytických enzymů Lac, MnP a MiP, které do média produkuje *P. ostreatus*. Aktivita byla měřena ve vzorcích kultivační tekutiny z bioreaktoru, které byly odebírány v časech 0, 4, 6 a 24 hod kultivace a stočeny na centrifuze při 10 000 g po dobu 60 s. Stanovení enzymatické aktivity probíhalo spektrofotometricky pomocí kolorimetrických reakcí ve spektrofotometru SpectraMax Plus 384 a za využití programu SoftMax Pro 4.6. Ke všem stanovením bylo použito 20 µl vzorku a všechna stanovení probíhala ve třech opakováních. Experiment byl opakován šestkrát. Jedna jednotka enzymatické aktivity U je definována jako množství enzymu tvořící 1 µmol reakčního produktu za minutu. Výpočet byl proveden podle následující rovnice:

$$U = \frac{\Delta A \cdot V_{RM}}{t \cdot \epsilon \cdot l \cdot V_{VZ}}$$

Kde „U/l“ je množství jednotek enzymu (U) v litru (l) vzorku, „ΔA“ je změna absorbance reakční směsi za čas „t“ (jednotky min), „V_{RM}“ je objem reakční směsi (jednotky l), „ε“ je molární extinkční koeficient reakčního produktu (kationtu ABTS⁺ / oxidovaného DMP) v jednotkách µM⁻¹.cm⁻¹, „l“ je délka optické dráhy světelného paprsku (jednotky cm) a „V_{VZ}“ je objem testovaného vzorku (jednotky l).

4.6.5.3.1. Pufry a roztoky pro stanovení enzymatické aktivity

- 120mM Na-acetátový pufr (pH 5,0):
 - Rozpustit 0,7206 g kyseliny octové ve 100 ml destilované vody. Připravit roztok octanu sodného smícháním 0,984 g octanu a 100 ml destilované vody. Smíchat oba roztoky až do konečného pH 5,0.
- 65,8mM Na-malonátový pufr (pH 4,5):
 - Do 100 ml destilované vody přidat 1,37 g kyseliny malonové, pH upravit na hodnotu 4,5 pomocí 3M NaOH a doplnit na celkový objem 200 ml destilovanou vodou.
- 10mM H₂O₂:
 - Do 44 ml destilované vody přidat 50 µl 30% H₂O₂.

4.6.5.3.2. Stanovení enzymatické aktivity lakázy

Aktivita Lac byla stanovována pomocí oxidace 5 mM ABTS v Na- acetátovém pufru při pH 5,0. Molární extinkční koeficient ABTS⁺ pro výpočet enzymové aktivity byl 36 000 M⁻¹.cm⁻¹.

Reakční směs pro stanovení enzymové aktivity obsahovala 20 µl z každého vzorku, 160 µl Na-acetátového pufru a 20 µl 50 mM roztoku ABTS. Ihned po přidání ABTS byla měřena absorbance roztoku při vlnové délce 420 nm. Absorbance byla měřena v 12-ti sekundových intervalech po dobu 5 min.

4.6.5.3.3. Stanovení enzymatické aktivity Mn-dependentní peroxidázy a Mn-independentní peroxidázy

Stanovení aktivity MnP a MiP je založeno na oxidaci 1mM 2,6-DMP v Na-malonátovém pufru o pH 4,5.

Pro stanovení enzymatické aktivity MnP a MiP jsou nutné tři reakce pro každý vzorek (A, B a C). Výsledné hodnoty MnP a MiP aktivity byly získány přepočtem z výsledků těchto tří reakcí. Reakční směsi měly složení podle Tab. 1. Těsně před zahájením měření byla spuštěna reakce přidáním 10 µl 20mM 2,6-DMP. Měření absorbance probíhalo při vlnové délce 469 nm, po dobu 5 min s intervalem měření 12 sekund. Molární extinkční koeficient pro výpočet enzymové aktivity byl 49 600 M⁻¹.cm⁻¹.

Hodnoty naměřené z reakční směsi A udávají aktivitu Lac. Aktivitu MnP získáme odečtením hodnot reakční směsi C od hodnot reakční směsi B. Aktivitu MiP získáme odečtením hodnot reakční směsi A od hodnot reakční směsi C.

Reakční směs A	Reakční směs B	Reakční směs C
20 µl vzorku	20 µl vzorku	20 µl vzorku
170 µl Na-malonátového pufru	152 µl Na-malonátového pufru	152 µl Na-malonátového pufru
10 µl 20 mM 2,6-DMP	10 µl 20 mM MnSO ₄	10 µl 20 mM EDTA
	8 µl 10 mM H ₂ O ₂	8 µl 10 mM H ₂ O ₂
	10 µl 20 mM 2,6-DMP	10 µl 20 mM 2,6-DMP

Tab. 1. – Složení reakčních směsí použitých pro spektrofotometrické stanovení enzymatické aktivity Lac, MnP a MiP.

4.6.6. Růst bakterií v kultivační tekutině po kultivaci *P. ostreatus*

Pro bližší studium vlivu extracelulárních látek produkovaných *P. ostreatus* do média na bakterie v bioreaktoru byl sledován růst bakterií v tomto médiu po kultivaci *P. ostreatus* (**kultivační tekutina**). Kromě *R. erythropolis* byla v experimentu použita také bakterie *Serratia marcescens*. Ke kultuře *P. ostreatus* narostlé na PUF (viz Kap. 4.6.2.1) bylo po 14 dnech kultivace doplněno 100 ml MEG média, po dalších 2 dnech byla kultivace ukončena a kultura byla sterilně přefiltrována za použití vakuové filtrace a sterilního filtru (nitrocelulóзовý filtr, velikost pórů filtru 0,45 μm). Inokulum *R. erythropolis* a *S. marcescens* byla napěstována ze zásobních konzerv ve 100ml Erlenmeyerových baňkách s 10 ml MEG média (viz Kap. 4.6.2.3).

Přefiltrovaná kultivační tekutina *P. ostreatus* byla rozdělena sterilně do 100ml Erlenmeyerových baněk po 10 ml a očkována bakteriálními kulturami na výchozí zákal $\text{O.D.}_{600\text{nm}} = 0,1$. Následná kultivace probíhala na třepačce po dobu 24 hodin při 160 rpm ve 28 °C. Průběžně byl sledován bakteriální růst. Bylo odebíráno 200 μl kultivační tekutiny a na mikrotitrační destičce byla měřena absorbance při 600 nm, jako blank bylo použito čisté MEG médium. Stanovení absorbance probíhalo v objemu 200 μl .

4.6.7. Pozorování vlivu lakázy v médiu na růst bakterií

Vliv Lac na růst bakterií *R. erythropolis* a *S. marcescens* byl sledován pomocí přídavku tohoto enzymu do média.

Bakteriální kultury byly kultivovány v 250ml Erlenmeyerových baňkách s 20 ml čerstvého MEG média. Očkovány byly na výchozí $\text{O.D.}_{600\text{nm}} = 0,03$ z tekuté MEG kultury bakterií připravené podle Kap. 4.6.2.3. Kultivace probíhala 8 hod na třepačce při 160 rpm a 28 °C. V hodinových intervalech byly odebírány vzorky kultur (200 μl), z nichž bylo spektrofotometricky stanoveno množství bakterií v médiu. Po 4 hodinách kultivace byla do média přidána Lac (purifikovaný enzym z *P. ostreatus*) naředěná v MEG médiu (celkový objem 400 μl) na výslednou enzymatickou aktivitu 200 mU ve 20 ml média, do kontrol bylo přidáno 400 μl MEG média. Následně byl sledován bakteriální růst, z odběrů prováděných po přidání Lac byla stanovována také enzymatická aktivita Lac (metodika viz Kap. 4.6.5.3.2).

4.6.8. Pozorování vlivu změny pH MEG média na růst bakterií

Ke kultuře *P. ostreatus* rostlé na PUF (viz Kap. 4.6.2.1) bylo po 2 týdnech kultivace přidáno 100 ml MEG média, po dalších 2 dnech inkubace při 28 °C byla kultivace ukončena a kultivační tekutina sterilně přefiltrována za použití filtru (nitrocelulózový filtr, velikost pórů 0,45 µm). V průběhu dvoudenní kultivace *P. ostreatus* s přidaným MEG médiem bylo měřeno pH kultivační tekutiny v čase 0, 24 a 48 hod pomocí pH metru.

Přefiltrovaná kultivační tekutina byla rozdělena do 500ml Erlenmeyerových baněk po 50 ml a byla zaočkována *R. erythropolis* na výchozí zákal kultury o $O.D._{600nm} = 0,05$. Kultivace probíhala na třepačce při 160 rpm při 28 °C po dobu 24 hod. V průběhu kultivace byly prováděny odběry, z nichž bylo zjišťováno množství bakterií v médiu a pH média.

4.6.9. Stanovení úbytku glukózy v tekutém médiu po kultivaci *P. ostreatus*

Po 24 hodinách kultivace *P. ostreatus* v bioreaktoru byla odebrána kultivační tekutina, ve které byla kolorimetricky stanovena hladina glukózy. Vzorky byly desetkrát naředěny, aby bylo dosaženo koncentrace glukózy pod 2 g/l a byly připraveny v triplicátech. Zároveň byla připravena řada standardů v rozmezí 0-2 g/l glukózy. Ke každému vzorku a standardu byl přidán 1 ml 1% roztoku DNS (příprava viz Tab. 2) na 1 ml kultivační tekutiny. Směs byla zahřáta v uzavřené nádobě na 90 °C a inkubace trvala 15 min. Poté bylo ke každému vzorku přidáno 0,33 ml 40% roztoku vinanu sodno-draselného a směs byla zchlazena ve vodní lázni na laboratorní teplotu. U vzorků a standardů byla stanovena absorbance při 575 nm. Dle kalibrační křivky standardů byla spočítána koncentrace glukózy ve vzorcích kultivační tekutiny.

1% roztok DNS	40% roztok vinanu sodno-draselného	Standardy
10 g dinitrosalicylové kyseliny	40 g vinanu sodno-draselného	Zásobní roztok glukózy (bezvodá/monohdrát) v destilované vodě, 10g/l
2 g fenolu	Doplnit destilovanou vodou do 100 ml.	
0,5 g siřičitanu sodného		
10 g hydroxidu sodného		
Doplnit destilovanou vodou do 1 l.		

Tab. 2. – Roztoky použité pro stanovení koncentrace glukózy a jejich příprava.

4.7. Polyakrylamidová gelová elektroforéza

4.7.1. Pufry, roztoky a kity pro přípravu vzorku

- Lyzační pufr - 50 mM Tris-HCl pH 8; 10 mM MgCl₂; 50 µl 100 mM PMSF. Uchovávat při 4 °C.
- Inhibitory proteáz:
 - CompleteTM - Protease Inhibitor Coctail Tablets (Roche, Německo) – 1 tableta do 500 µl deionizované H₂O. Uchovávat při -20 °C.
 - PMSF - 100 mM roztok v izopropanolu. Uchovávat při -20 °C.
- Benzonáza – uchovávat při -20 °C.
- 50% TCA (w/v) – k 25 g TCA přidat deionizovanou H₂O do konečného objemu 50 ml. Uchovávat při 4 °C.
- Ledový aceton – uchovávat při -20 °C
- Vzorkové pufry:
 - Vzorkový pufr pro 1-D elektroforézu - složení: 500 µl 1 M Tris-HCl (pH 6,8); 500 µl 98% glycerolu; 2,5 g močoviny, 500 mg SDS, 500 mg DTT, 1 mg bromfenolové modři a doplnit do 10 ml destilovanou H₂O. Uchovávat při – 20 °C.
 - Vzorkový pufr pro 2-D elektroforézu - 7 M močovina, 2 M thiomočovina, 4% CHAPS (w/v), 1% Pharmalyte pH 3-10; 1% DTT (w/v), několik krystalků bromfenolové modři. Uchovávat při – 80 °C.

4.7.2. Izolace proteinů

4.7.2.1. Izolace buněčných bakteriálních proteinů z tekuté kultury

Buněčné bakteriální proteiny byly izolovány z kultivace *R. erythropolis* v kultivační tekutině *P. ostreatus* a kontrolních tekutých kultur *R. erythropolis* kultivovaných na MEG médiu. Po ukončení kultivace bylo 50 ml bakteriální kultury slito do zkumavek Falcon[®] a ty byly stočeny při 5 500 g 10 min při 4 °C. Supernatant byl ze zkumavek, peleta promyta 10 ml lyzačního pufru a zkumavky opět stočeny. Poté byl supernatant slit a k peletě přidáno 10 ml lyzačního pufru a 10 µl Complete (inhibitor proteáz). Vzorky byly vychlazeny na ledu a sonikovány 4 cykly po 30 s, v mezičase byly vzorky chlazeny 1 min na ledu. Po sonikaci byla do vzorků přidána benzonáza (1 µl na 10 ml vzorku) a vzorky byly inkubovány 20 min ve 37

°C ve vyhřevném bloku, poté byly stočeny při 3 000 g 5 min ve 4 °C. Supernatant byl odebrán do nové zkumavky a vzorky byly sráženy pomocí TCA o finální koncentraci 6 % TCA (v/v). Lyzát byl inkubován 1 hodinu na ledu, poté byly zkumavky stočeny při 10 000 g 10 min ve 4 °C, supernatant slit a peleta opláchnuta 2 ml ledového acetonu. Zkumavky byly opět stočeny při 10 000 g 10 min ve 4 °C, aceton slit a peleta byla resuspendována v 600 µl vzorkového pufru pro 1-D elektroforézu a přenesena do mikrozkušavky Eppendorf®. Vzorky byly umístěny do -80 °C. Po rozmražení byly vzorky povařeny 5 min ve vodní lázni a použity pro 1-D elektroforézu.

4.7.2.2. Izolace extracelulárních bakteriálních proteinů z tekuté kultury

Po ukončení kultivace *R. erythropolis* a *S. marcescens* v kultivační tekutině *P. ostreatus* bylo 50 ml bakteriální kultury slito do 50ml zkumavek Falcon® a stočeny na centrifuze při 3 000 g 5 min. Supernatant byl odebrán do nových zkumavek, přidán inhibitor proteáz (Complete či PMSF) a bylo pokračováno ve srážení bílkovin pomocí TCA (viz Kap. 4.7.2.1), jen finální koncentrace kyseliny byla 10%. Pokud nedošlo k úplné solubilizaci vzorků ve vzorkovém pufru, bylo možno vzorky krátce sonikovat (30 sec). Vzorky byly analyzovány pomocí 1-DE.

4.7.2.3. Izolace extracelulárních proteinů z média a buněčných proteinů *P. ostreatus* z PUF kostek z „fixed-bed“ bioreaktoru

Po ukončení kultivace bylo z bioreaktorů vypuštěno 60 ml média do zkumavek Falcon®. Sterilní pinzetou byly vybrány PUF kostky a injekční stříkačkou z nich bylo vymačkáno zbylé médium, které bylo přidáno k vypuštěné frakci. Ke vzorkům média bylo přidáno 5 µl PMSF či Complete a izolace bílkovin pokračovala dle Kap. 4.7.2.1.

K PUF kostkám zbaveným média bylo přidáno 25 ml lyzačního pufru, vzorky byly vychlazeny na ledu a poté sonikovány 2 cykly po dobu 30 s kvůli uvolnění houbového mycelia z povrchu PUF kostek, v mezičase byly 1 min chlazeny na ledu. Lyzační pufr s obsahem rozbitých buněk byl injekční stříkačkou z PUF kostek vymačkán a získaný roztok byl stočen při 3 000 g 5 min při 4 °C, odstraněn debris. Supernatant byl odebrán do čisté zkumavky a byla k němu přidána 50% TCA na výsledný 6% roztok (v/v). Srážení vzorků pokračovalo dle protokolu (viz Kap. 4.7.2.1.) Takto připravené vzorky byly dále zpracovány pomocí 1-D elektroforézy.

4.7.2.4. Izolace buněčných proteinů *P. ostreatus* a *R. erythropolis* z kultivace na kuličkách

Po 11 dnech kultivace *P. ostreatus* na skleněných mikrokuličkách bylo mycelium narostlé na povrchu kuliček odebráno do 50ml zkumavky Falcon[®], zbylé mikrokuličky byly promyty 4 ml lyzačního pufru, stočeny 5 min při 3 000 g při 4 °C a supernatant byl přidán k myceliu. Ke vzorku byly přidány 3 ml lyzačního pufru a zkumavka byla přes noc ponechána v -80 °C. Po rozmražení byl vzorek sonikován 6 cyklů po 30 s, v mezičase 1 min chlazení na ledu. Poté byl vzorek inkubován 20 min ve 37 °C a opět sonikován 3 cykly po 30 s, v mezičase 1 min chlazení na ledu. Do zkumavky bylo přidáno 1,5 μl benzonázy a vzorek byl stočen 5 min při 3 000 g při 4 °C, čímž došlo k oddělení buněčné debris a supernatant byl přelit do nové zkumavky. K supernatantu byla přidána 48% TCA na výsledný 6% roztok (v/v) (viz Kap. 4.7.2.1). Peleta byla resuspendována v 400 μl vzorkového pufru pro 2-D elektroforézu.

K izolaci buněčných proteinů *R. erythropolis* byly použity 3 dny staré kultury narostlé na skleněných mikrokuličkách. Celý obsah Petriho misky byl přemístěn do 50ml zkumavky Falcon[®], ke vzorku byly přidány 4 ml lyzačního pufru a 10 μl Complete. Kuličky byly promyty a supernatant odebrán do nové zkumavky. Takto bylo promytí kuliček opakováno ještě dvakrát. Získaný supernatant byl sonikován 6 cyklů po 30 s, v mezičase 1 min chlazení na ledu. Ke vzorku bylo přidáno 1,5 μl benzonázy, poté byl inkubován 20 min ve 37 °C. Vzorek byl stočen 5 min při 3 000 g při 4 °C a supernatant přenesen do nové zkumavky. K supernatantu byla přidána 48% TCA na výsledný 6% roztok (v/v), viz Kap. 4.7.2.1. Peleta byla resuspendována v 400 μl vzorkového pufru pro 2-D elektroforézu.

4.8. Stanovení koncentrace proteinů ve vzorku

Ke stanovení koncentrace proteinů ve vzorku byl použit 2-D Quant Kit (GE Healthcare Life Sciences, USA), postup podle návodu výrobce. Principem metody je kvantitativní precipitace proteinů, kdy dochází ke specifické vazbě iontů mědi na protein. Nenavázaná měď v roztoku je poté měřena spektrofotometricky při 480 nm. Naměřená absorbance je nepřímo úměrná koncentraci proteinů, která je stanovena podle standardní kalibrační křivky BSA.

4.9. Jednorozměrná elektroforéza (1-DE)

4.9.1. Pufry a roztoky pro 1-D elektroforézu

- Tris-HCl pufry
 - pufř I: 1,5M Tris-HCl pH = 8,8 (w/v) – 36,3 g Tris báze, doplnit deionizovanou H₂O do 200 ml. Uchovávat při 4 °C.
 - pufř II: 0,5M Tris-HCl pH = 6,8 (w/v) – 3,0 g Tris báze, doplnit deionizovanou H₂O do 50 ml. Uchovávat při 4 °C.
- 30% akrylamid (w/v; zásobní roztok) – 29,2% akrylamid (w/v), 0,8% bisakrylamid (w/v). Smíchat 58,4 g akrylamidu a 1,6 g bisakrylamidu, doplnit deionizovanou H₂O do 200 ml. Přefiltrovat, uchovávat ve tmě při 4 °C.
- 10% APS (peroxodisíran amonný) (w/v) – 100 mg APS doplnit deionizovanou H₂O do 1 ml. Připravovat vždy čerstvý.
- 10% SDS (sodium dodecylsulfát) (w/v) – 10 g SDS doplnit deionizovanou H₂O do konečného objemu 100 ml. Uchovávat při laboratorní teplotě.
- TEMED (Tetramethyldiamin)
- 10x koncentrovaný elektrodoř pufř (zásobní roztok) – 144 g/l glycinu, 0,25M Tris, 1% SDS (w/v). Uchovávat při 4 °C.
- 1,2% (w/v) Colloidal Coomassie Blue G-250

4.9.2. Jednorozměrná elektroforéza

Jednorozměrná elektroforéza byla využita pro proteomickou analýzu extracelulárních bakteriálních a houbořých proteinů z tekutých kultur. Byla použita sodium dodecylsulfát-polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE) podle Laemmliho (1970), při které jsou proteiny děleny podle jejich molekulové hmotnosti. Separační gel měl 12% koncentraci polyakrylamidu, zaostřovací gel měl koncentraci 4 %.

Rozpis na 40 ml 12% separačního gelu:		Rozpis na 12 ml 4% zaostřovacího gelu:	
30% akrylamid	16 ml	30% akrylamid	1,6 ml
1,5M Tris pH 8,8	10 ml	0,5M Tris pH 6,8	3 ml
10% SDS	400 µl	10% SDS	120 µl
10% APS	400 µl	10% APS	120 µl
TEMED	40 µl	TEMED	15 µl
deionizovaná H ₂ O	13,2 ml	deionizovaná H ₂ O	7,2 ml

Tab. 3. – Rozpis chemikálií na přípravu separačního a zaostřovacího gelu na 1-DE.

Dělení bílkovin probíhalo na aparatuře ATTO (Atto AE-6220, střední typ, velikost gelů 16 x 16 cm). Gely pro dělení bílkovin byly připraveny dle rozpisu uvedeného výše v Tab. 3.

Vzorky proteinů byly resuspendovány ve vzorkovém pufru pro 1-D. Byla stanovena koncentrace proteinů ve vzorku (viz Kap. 4.8.). Na gel bylo nanášeno 40 - 60 µg proteinu na dráhu.

Jako standard byl použit PageRuler™ Prestained Protein Ladder (firma Thermo Scientific), v množství 5 µl na dráhu. Zařízení na dělení proteinů obsahuje místa pro 2 gely, při tomto osazení byl konstantně nastaven proud 80 mA. Doba dělení se pohybovala kolem 2 hodin. Bílkoviny byly následně detekovány pomocí barvy Colloidal Coomassie Blue G250 (viz Kap. 4.10.).

4.9.3. Dvourozměrná elektroforéza

Příprava vzorku na 2-D elektroforézu je uvedena v Kap. 4.7.2.4. Stanovení koncentrace proteinů bylo obdobné, jako je uvedeno u 1-DE (viz Kap 4.8.). Analýza vzorku pomocí 2-D elektroforézy byla provedena v Laboratoři buněčné signalizace technickým pracovníkem MVDr. Silvií Bezouškovou dle zavedeného postupu (Bjellqvist *et al.* 1993).

4.10. Detekce bílkovin pomocí Colloidal Coomassie Blue G250

Po ukončení 1-D či 2-D elektroforézy byly gely 3 x 10 min promyty v deionizované vodě a přes noc barveny za stálého kývání v roztoku Colloidal Coomassie Blue G250 dle

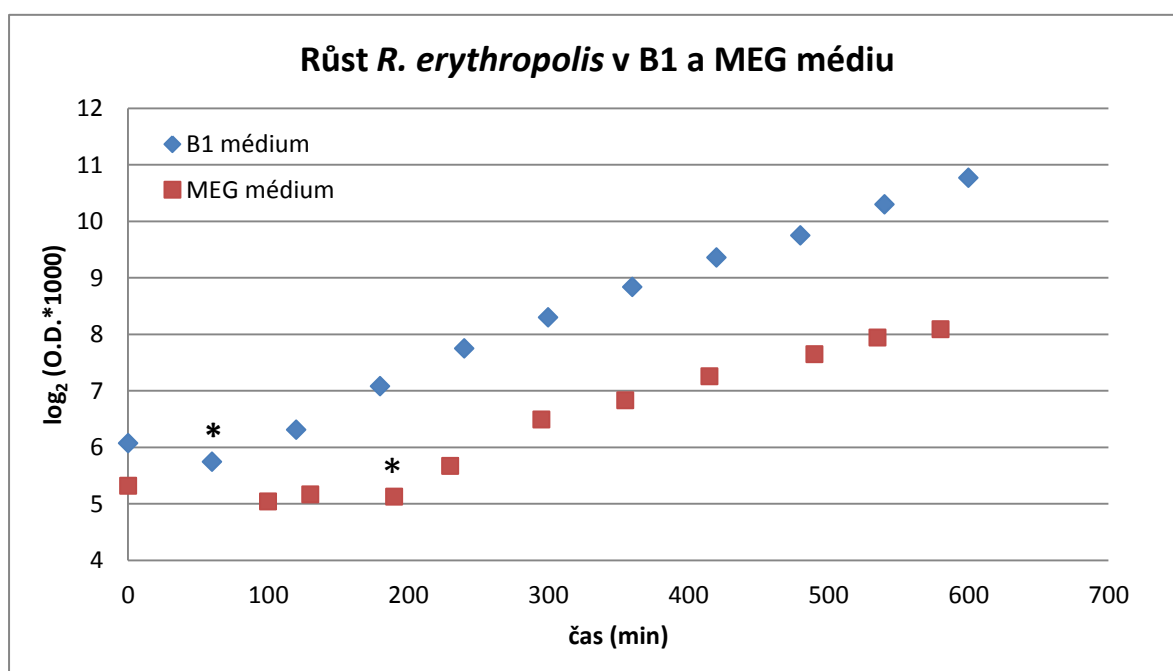
protokolu (Dyballa a Metzger 2009). Následující den byla barva slita a gely byly odbarvovány v deionizované vodě. Digitalizace gelů byla provedena na odpovídajícím skeneru.

5. VÝSLEDKY

5.1. Růstové charakteristiky kultivačních partnerů

5.1.1. Růst *R. erythropolis* v tekuté půdě

Pro zjištění růstových parametrů *R. erythropolis* v B1 a MEG médiu byl sledován růst bakterie při kultivaci v těchto médiích. Na Obr. 7 je uvedeno grafické znázornění reprezentativního pokusu sledování růstu *R. erythropolis* v B1 a MEG médiu. Výchozí zákal kultury byl přibližně $OD_{600nm} = 0,05$, kultivace probíhala 10 hodin. Lag fáze v MEG médiu trvala 190 min, v B1 médiu 60 min. Přibližná doba lag fáze ve sledovaných médiích je v grafu označena hvězdičkou. Růstová rychlost bakterie v MEG médiu byla vypočítána ze směrnice rovnice lineární regrese dat $y = 0,0058x + 4,8115$, která byla stanovena podle růstu kultury v rozmezí 295. – 580. minuty kultivace. Růstová rychlost v B1 médiu byla vypočítána ze směrnice rovnice lineární regrese dat $y = 0,0113x + 5,0264$, která byla stanovena podle růstu kultury v rozmezí 60. - 240. minuty kultivace. Doba zdvojení v MEG médiu je 172 min, v B1 médiu je výrazně kratší, pouze 88 min.

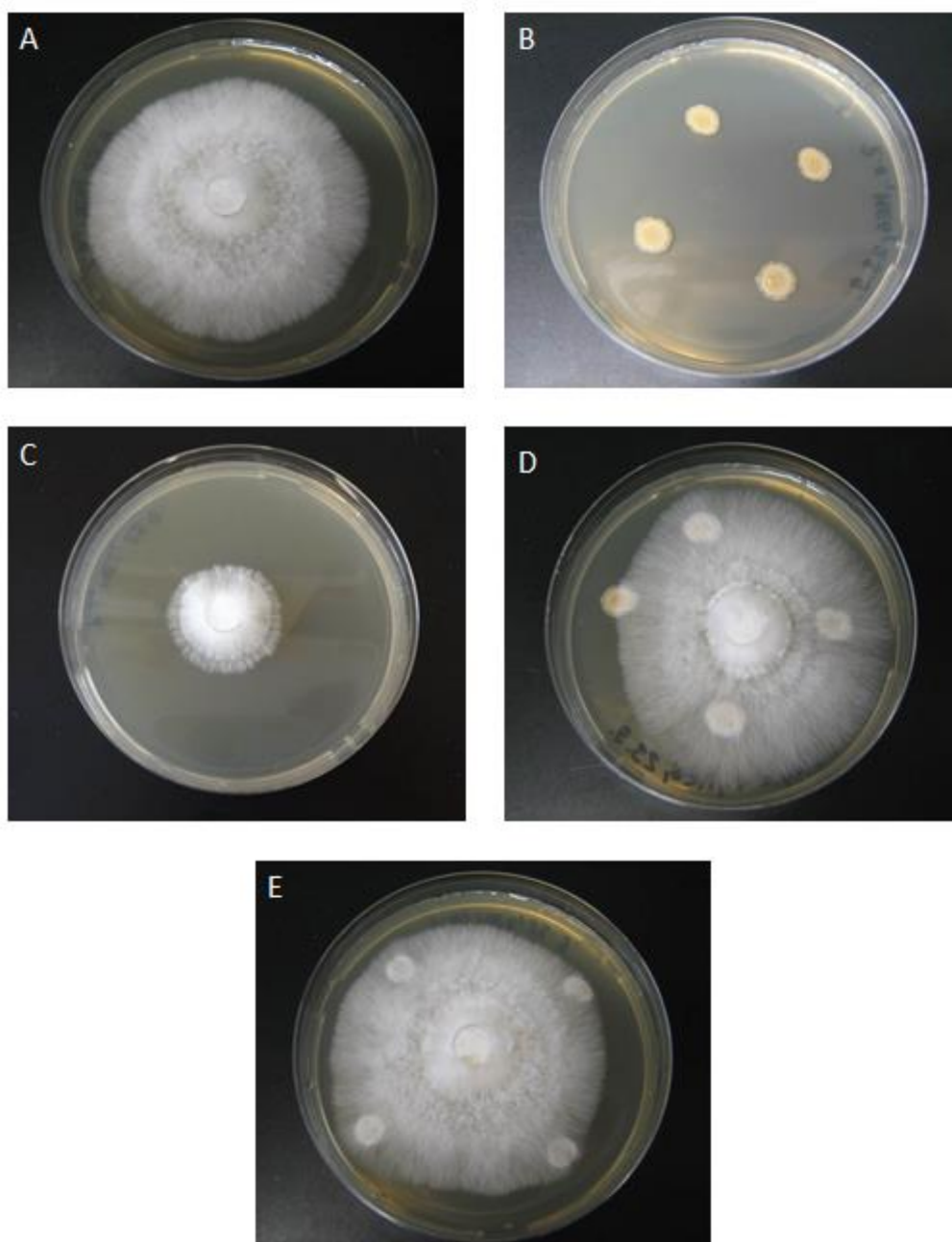


Obr. 7. – Růstová křivka *R. erythropolis* v tekutém B1 a MEG médiu. Závislost $\log_2(O.D.*1000)$ na čase kultivace (min). Přibližná doba lag fáze ve sledovaných médiích je označena hvězdičkou.

5.1.2. Kokultivace *P. ostreatus* a *R. erythropolis* na pevné půdě

Kultury *P. ostreatus* a *R. erythropolis* byly společně kultivovány na MEG agarové půdě a bylo sledováno, zda při společné kultivaci obou mikroorganismů na pevném médiu dojde ke vzniku inhibičních zón. Cílem bylo zjistit, zda se organismy při společném růstu vzájemně neinhibují.

Kultivace probíhala staticky při 28 °C po dobu 6 dní na pevném MEG médiu, poté byly misky vyfoceny a byl vyhodnocen vznik inhibičních zón. V kontrolní kultivaci *P. ostreatus* vytvořil po 6 dnech kultivace bohaté mycelium o průměru 6 cm (Obr. 8 A). Bakteriální kolonie po 6 dnech kultivace jsou vidět na Obr. 8 B. Byly připraveny dvě verze kokultivace, v jedné byly oba organismy očkované zároveň (Obr. 8 D), v druhé byl *R. erythropolis* na misku očkován okolo houbového mycelia po 3 dnech kultivace (Obr. 8 C) a poté kultivace pokračovala další 3 dny (Obr. 8 E). Při obou typech kokultivace nebyl pozorován vznik inhibičních zón mezi mikroorganismy, přítomnost bakterií ani nijak neovlivnila rychlost nárůstu houbové kolonie (Obr. 8 A vs. Obr. 8 D, E).



Obr. 8. – Sledování tvorby inhibičních zón při kokultivaci *P. ostreatus* a *R. erythroplis* na pevném médiu (fotografie z digitálního fotoaparátu).

A – *P. ostreatus*, kultivace 6 dní; **B** – *R. erythroplis*, kultivace 6 dní; **C** – *P. ostreatus*, kultivace 3 dny; **D** - *P. ostreatus* a *R. erythroplis*, kultivace 6 dní; **E** - *P. ostreatus*, kultivace 6 dní a *R. erythroplis*, kultivace 3 dny

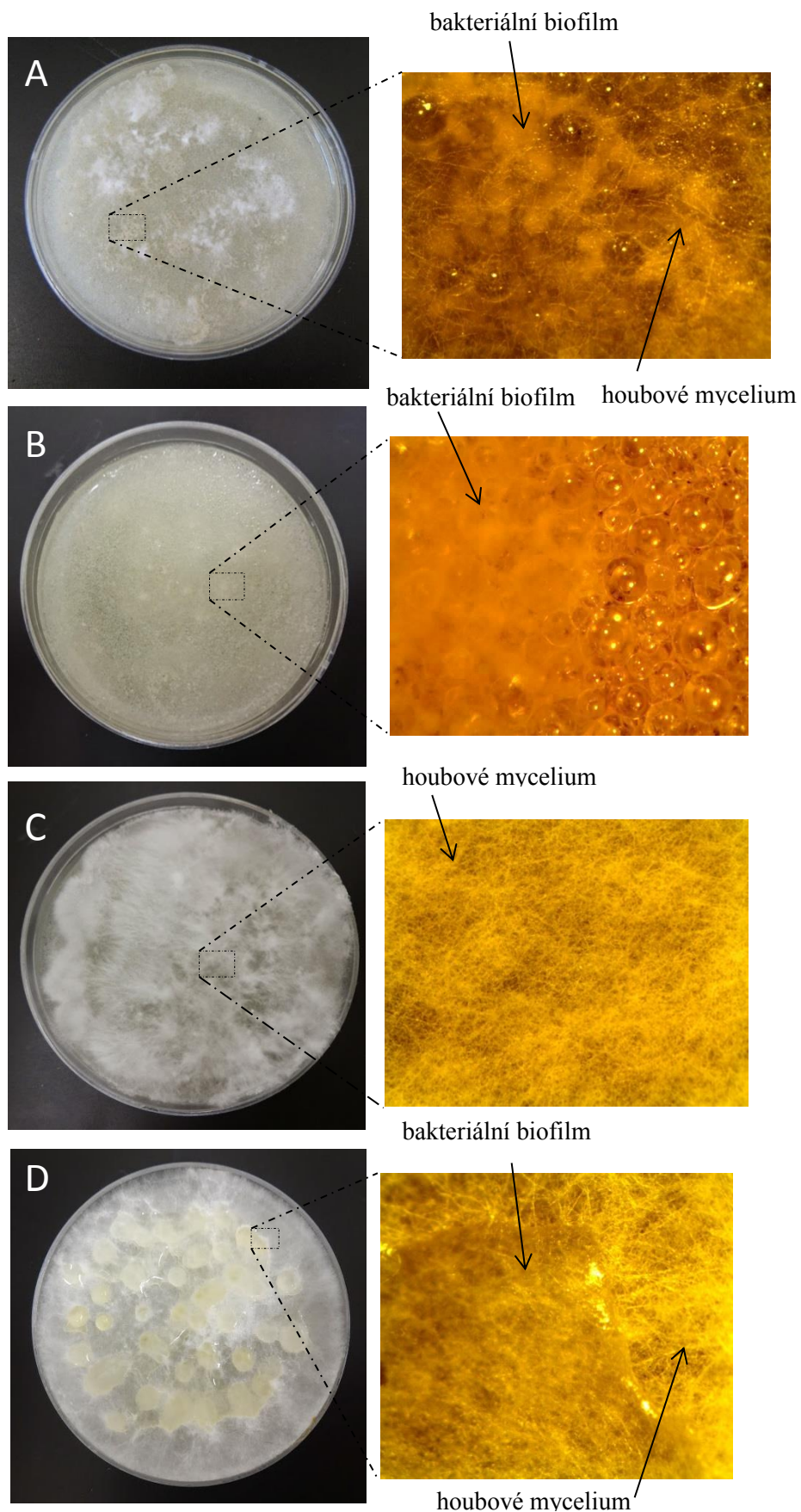
5.2. Morfologická analýza mikrobiálního společenstva

5.2.1. Tvorba směsného biofilmu na skleněných mikrokuličkách

Jako kultivační systém pro studium tvorby směsného biofilmu byla zvolena kultivace na skleněných mikrokuličkách. Systém byl tvořen Petriho miskou naplněnou skleněnými mikrokuličkami a MEG médiem, jehož množství bylo zvoleno tak, aby hladina média dosahovala k povrchu kuliček a tím vznikal vhodný prostor pro tvorbu biofilmu. Petriho misky byly umístěny ve vlhké komůrce (viz Kap. 4.6.3.)

Tato kultivační metoda se ukázala jako nevhodná z důvodu, že nedošlo ke vzniku směsného biofilmu. Pokud byly organismy očkované na misku zároveň, došlo k rychlému nárůstu biofilmu *R. erythropolis*, který značně omezil růst *P. ostreatus* (viz Obr. 9 A), ve srovnání s tím samotná kultura *P. ostreatus* vytvořila za 11 dní hustý nárůst mycelia (Obr. 9 C).

Následující experimenty byly prováděny s časovým posunem inokulace bakteriální kulturou, *P. ostreatus* byl na miskách kultivován po dobu 8 dní a *R. erythropolis* byl následně zaočkován na již narostlé houbové mycelium, poté kultivace pokračovala další 3 dny. Na Obr. 9 D lze pozorovat, že bakteriální kultura zůstala na povrchu mycelia v izolovaných kapkách, nebylo tedy dosaženo vzniku směsného biofilmu.



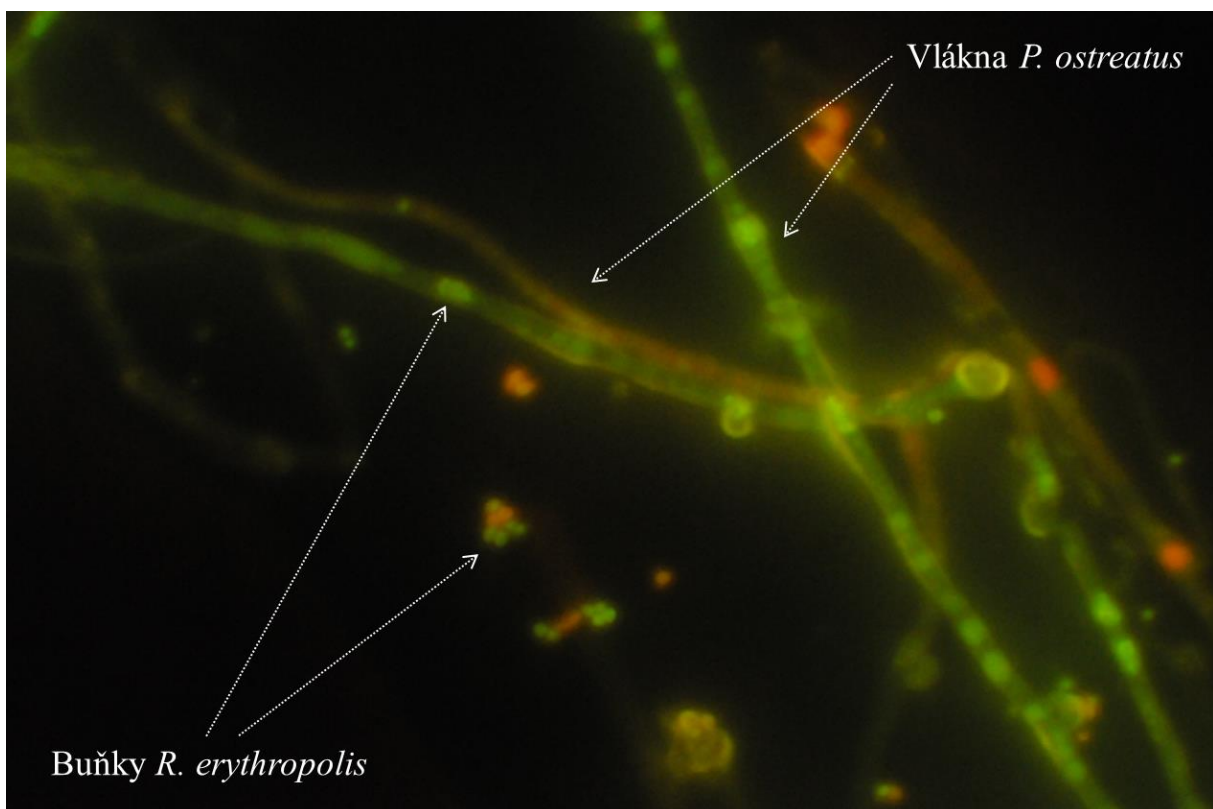
Obr. 9. – Fotografie z digitálního fotoaparátu a fotografie z binokulární lupy, zvětšení 30x: morfologická analýza tvorby smíšeného biofilmu *P. ostreatus* a *R. erythropolis* na skleněných mikrokuličkách.

A – Smíšená kultura *P. ostreatus* a *R. erythropolis*, 11 dní kultivace; B – *R. erythropolis*, 3 dny kultivace; C – *P. ostreatus*, 11 dní kultivace; D - Smíšená kultura *P. ostreatus* a *R. erythropolis*, 11 dní kultivace, *R. erythropolis* očkován po 8 dnech kultivace

5.2.2. Analýza směsné kultury na mikrokuličkách metodou „live/dead“ barvení

K analýze byla použita směsná kultura *P. ostreatus* a *R. erythropolis* po 11 dnech kultivace na skleněných mikrokuličkách, kdy *R. erythropolis* byl na houbové mycelium očkovan s časovým posunem po 8 dnech kultivace (viz Kap. 5.2.1). Z povrchu mikrokuliček byly odebrány vzorky směsné kultury, nabarveny (za použití Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit) a pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem. Cílem bylo zjistit životaschopnost buněk *R. erythropolis* v kokultivaci s *P. ostreatus*.

Na Obr. 10 lze pozorovat převážně zeleně zbarvená vlákna houbového mycelia *P. ostreatus*. V okolí vláken jsou patrné zeleně i oranžově zbarvené buňky *R. erythropolis*, které místy nasedají na vlákno houby. Oranžově zbarvené buňky jsou mrtvé, zeleně zbarvené jsou živé.

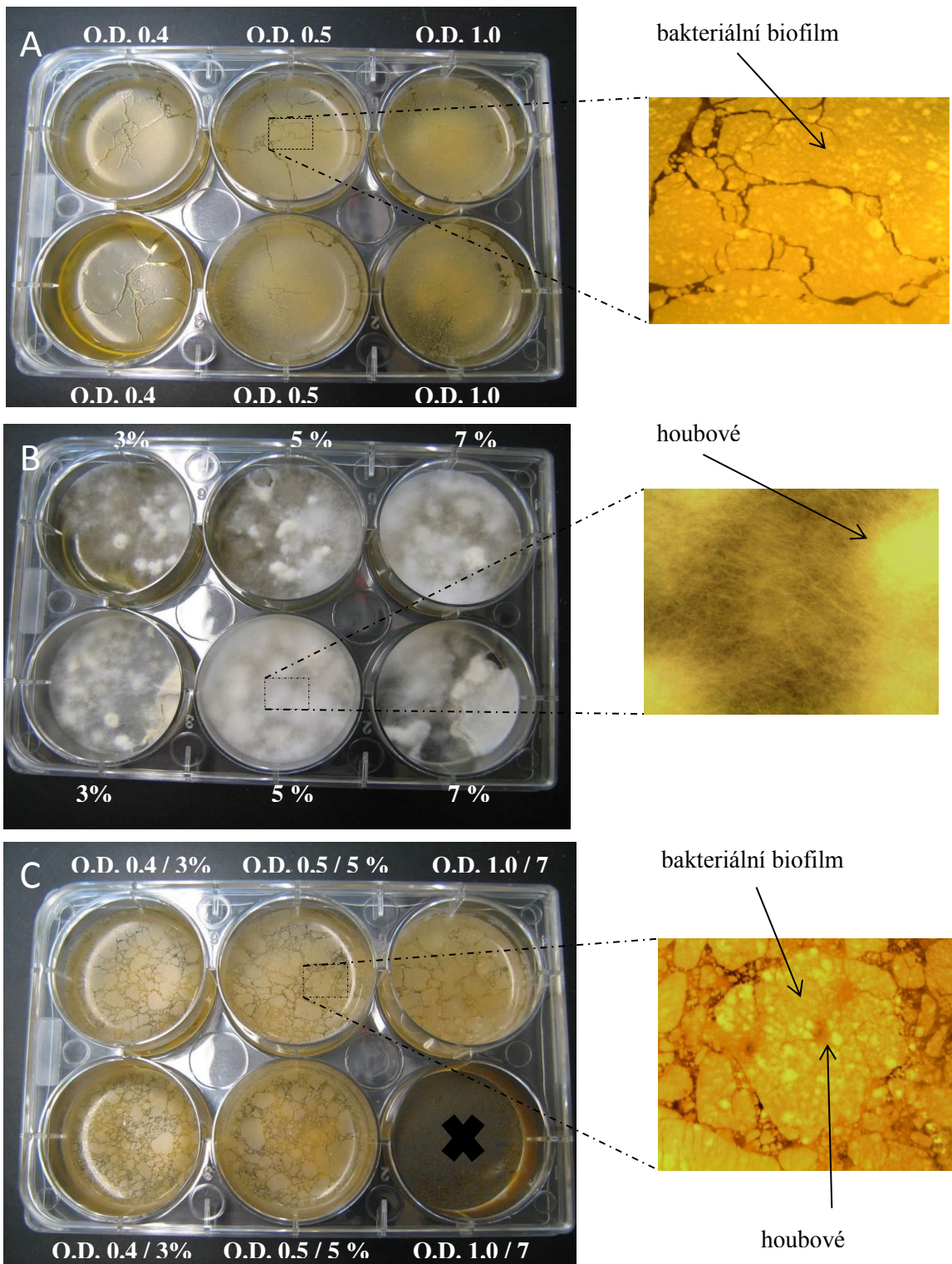


Obr. 10. – Vzorek směsné kultury *P. ostreatus* a *R. erythropolis* na skleněných mikrokuličkách po 11 dnech kultivace, *R. erythropolis* očkovan s časovým posunem po 8 dnech kultivace. Vzorek byl analyzován metodou „live/dead“ barvení. Fotografie z fluorescenčního mikroskopu, zvětšení objektiv 40x.

5.2.3. Tvorba plovoucího směsného biofilmu *P. ostreatus* a *R. erythropolis*

P. ostreatus a *R. erythropolis* byly také společně kultivovány ve formě plovoucího biofilmu v kultivačním systému, který byl tvořen 6-jamkovou mikrotitrační destičkou s tekutým médiem. Do jamek bylo přidáno 7 ml B1 či MEG média. První destička obsahovala B1 médium a byla zaočkována *R. erythropolis* na výslednou O.D._{600nm} = 0,4, 0,5 a 1,0. Druhá destička s MEG médiem byla zaočkována homogenizovanou kulturou *P. ostreatus* na 3 %, 5 % a 7 % (v/v) výsledného objemu kultivační směsi. Třetí destička obsahující MEG médium byla očkovaná směsí obou mikroorganismů v těchto poměrech: *R. erythropolis* (O.D._{600nm} = 0,4) + *P. ostreatus* 3 % objemu, *R. erythropolis* (O.D._{600nm} = 0,5) + *P. ostreatus* 5 % objemu, *R. erythropolis* (O.D._{600nm} = 1,0) + *P. ostreatus* 7 % objemu. Doba kultivace byla 13 dní, probíhala staticky ve 28 °C. Po 13 dnech byl vyhodnocen nárůst biofilmu a pořízeny snímky z fotoaparátu a z binokulární lupy (Obr. 11)

Bylo pozorováno, že oba mikroorganismy tvoří biofilm na hladině tekutého média. Po 13 dnech kultivace byly na dně jamek s bakteriálním biofilmem pozorovány odumřelé buňky. *P. ostreatus* po 13 dnech kultivace vytvořil husté mycelium na hladině média (Obr. 11 B). Při směsné kultivaci se nepodařilo zkoordinovat růst mikroorganismů. *R. erythropolis* rostl rychleji než *P. ostreatus*. Na třetí destičce výrazně převládá bakteriální biofilm, houbové mycelium pozorujeme pouze v podobě ojedinělých shluků vláken (Obr. 11 C).



Obr. 11. Morfologická analýza tvorby plovoucího smíšeného biofilmu *P. ostreatus* a *R. erythropolis*

(fotografie z digitálního fotoaparátu a fotografie z binokulární lupy, zvětšení 30x).

A – *R. erythropolis*, B1 médium, 13 dní kultivace; jamky očkovány *R. erythropolis* na výchozí O.D._{600nm} = 0,4; 0,5 a 1,0;

B - *P. ostreatus*, MEG médium, 13 dní kultivace; jamky očkovány *P. ostreatus* do 3 %, 5% a 7 % objemu média;

C – *P. ostreatus*, *R. erythropolis*, MEG médium, 13 dní kultivace; jamky očkovány *R. erythropolis* na výchozí O.D._{600nm} = 0,4; 0,5 a 1,0 a *P. ostreatus* do 3 %, 5% a 7 % objemu média (jamka vpravo dole nebyla vyhodnocena, médium vyschlo).

5.3. Kokultivace *P. ostreatus* a *R. erythropolis* ve „fixed-bed“ bioreaktoru

Pro následující experimenty byl vybrán kultivační systém „fixed-bed“ bioreaktor (viz schéma na Obr. 5, Kap. 4.6.5.), který byl sestaven ze vzdušné Erlenmeyerovy baňky o objemu 250 ml s kulturou *P. ostreatus* narostlou na PUF kostkách. Ke kultuře bylo přidáváno 80 ml sterilního MEG média a *R. erythropolis* byl do bioreaktoru očkovan z tekuté kultury na výslednou $O.D._{600nm} = 0,2$. Bioreaktory byly připojeny ke vzdušnění, kultivace probíhala staticky při laboratorní teplotě po dobu 24 hod a v časech 0, 4, 6 a 24 hod byly odebírány vzorky. Ze vzorků byl analyzován růst bakterií v bioreaktoru, míra dekolorizace barviva RBBR a enzymatická aktivita ligninolytických enzymů lakázy, mangan-dependentní peroxidázy a mangan-independentní peroxidázy. Po ukončení kultivace byly odebrány vzorky k analýze proteinů a ke zjištění počtu bakterií v PUF nosiči houbové kultury.

5.3.1. Růst *R. erythropolis* ve „fixed-bed“ bioreaktoru

V průběhu kultivace mikrobiálního společenstva v bioreaktoru byly v časech 0, 4, 6 a 24 hod odebírány vzorky média, ze kterých bylo zjišťováno množství bakterií v bioreaktoru. Z důvodu přítomnosti barviva RBBR v médiu byla u vzorků obsahujících barvivo stanovena absorbance při vlnové délce 600 nm ihned po odebrání, následně byly vzorky stočeny a opět změřena $O.D._{600nm}$. Rozdíl hodnot udává množství bakterií v médiu.

Tab. 4 shrnuje výsledky ze dvou až pěti opakování pokusu. Bylo zjištěno, že množství bakterií *R. erythropolis* v médiu v bioreaktoru v kokultivaci s *P. ostreatus* se již od počátku kultivace snižuje, po 24 hod kultivace došlo k úplnému vymizení bakterií z volné kultivační tekutiny. V grafu na Obr. 12 jsou vyneseny normalizované hodnoty $O.D._{600nm}$ média z bioreaktoru v závislosti na čase, kde lze pozorovat postupný růst bakterií v kultivaci bez přítomnosti houby a pokles množství bakterií v médiu v kokultivaci s *P. ostreatus*.

	<i>R.e.</i>		<i>R.e.</i> + RBBR			
	$O.D._{600nm}$ 1	$O.D._{600nm}$ 2	$O.D._{600nm}$ 1	$O.D._{600nm}$ 2	$O.D._{600nm}$ 3	$O.D._{600nm}$ 4
0 hod	0,114	0,105	0,102	0,096	0,011	0,082
4 hod	0,021	0,12	0,109	x	0,112	0,101
6 hod	0,01	x	0,121	0,115	0,161	0,105
24 hod	1,038	1,333	0,840	0,490	x	0,206

	<i>P.o. + R.e.</i>					<i>P.o. + R.e. + RBBR</i>			
	O.D. _{600nm} 1	O.D. _{600nm} 2	O.D. _{600nm} 3	O.D. _{600nm} 4	O.D. _{600nm} 5	O.D. _{600nm} 1	O.D. _{600nm} 2	O.D. _{600nm} 3	O.D. _{600nm} 4
0 hod	0,122	0,106	0,065	0,114	0,085	0,165	0,024	0,078	0,079
4 hod	0,077	0,065	0,012	0,015	0	0,040	0,058	0,046	x
6 hod	0,038	0,047	0,006	0,022	0	0,036	0,023	0,038	0,055
24 hod	0	0,000	0	0,255	0	0	0	0,004	0,009

Tab. 4. – Tabulka shrnuje úbytek množství bakterií *R. erythropolis* v bioreaktorech v čase, srovnání kultivace *R. erythropolis* a kokultivace *R. erythropolis* s *P. ostreatus*, v obou případech bez přidání a po přidání RBBR. Vzorky byly měřeny ve dvou až pěti opakováních.

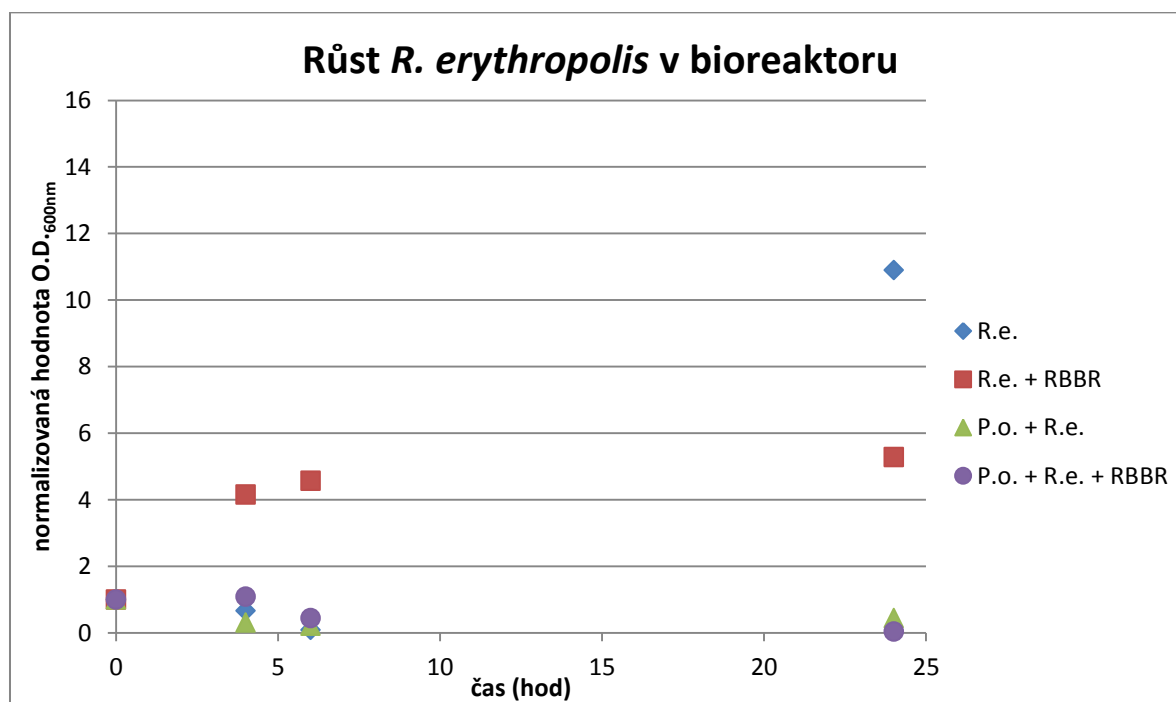
R.e. = bioreaktor s *R. erythropolis*.

R.e. + RBBR = bioreaktor s *R. erythropolis*, přidáno barvivo RBBR.

P.o. + R.e. = kokultivace *P. ostreatus* a *R. erythropolis*.

P.o. + R.e. + RBBR = kokultivace *P. ostreatus* a *R. erythropolis*, přidáno barvivo RBBR.

Okna v tabulce s „x“ značí chybějící hodnoty.



Obr. 12. – Grafické zobrazení normalizovaných hodnot absorbance kultivačního média při vlnové délce 600 nm.

Všechny hodnoty O.D._{600 nm} byly vztaženy k počáteční hodnotě O.D._{600 nm}, která odpovídá 1.

R.e. = bioreaktor s *R. erythropolis*.

R.e. + RBBR = bioreaktor s *R. erythropolis*, přidáno barvivo RBBR.

P.o. + R.e. = kokultivace *P. ostreatus* a *R. erythropolis*.

P.o. + R.e. + RBBR = kokultivace *P. ostreatus* a *R. erythropolis*, přidáno barvivo RBBR.

Jako součást sledování růstu bakterií v bioreaktoru bylo zjišťováno, zda se v PUF houbovém nosiči nacházejí životaschopné bakteriální buňky. Po ukončení kultivace byly z bioreaktorů odebrány 3 PUF kostky, z nichž bylo získáno médium zbavené částí mycelia. Ze vzorků byla připravena ředící řada, bylo použito ředění 100x a 1000x. Vzorky byly vysety na

Petriho misky s B1 médiem a po 3 dnech kultivace ve 28 °C byly spočítány bakteriální kolonie. Výsledky ze šesti opakování pokusu jsou uvedeny v Tab. 5.

Ačkoli bakterie při kokultivaci s *P. ostreatus* z volné kultivační tekutiny během kultivace ubývaly, v PUF kostkách byly detekováno cca $1,3 \cdot 10^6$ životaschopných buněk na 1 ml. Počet detekovaných bakterií byl nižší v bioreaktoru s RBBR ($4 \cdot 10^5$ CFU/ml). Značné množství bakterií bylo v kontrolní kultivaci, kde byla přítomna v bioreaktoru pouze bakterie.

bioreaktor	průměrný počet CFU/ml
<i>P.o.</i> + <i>R.e.</i> bez RBBR	$1,3 \cdot 10^6$
<i>P.o.</i> + <i>R.e.</i> s RBBR	$4 \cdot 10^5$
<i>R.e.</i> bez RBBR	nepočítatelně

Tab. 5. – Tabulka shrnuje průměrné množství životaschopných bakteriálních buněk přítomných v PUF kostkách v jednotlivých uspořádáních bioreaktorů po 24 hod kultivace.

P.o. + *R.e.* bez RBBR = kokultivace *P. ostreatus* a *R. erythropolis*, bez barviva RBBR.

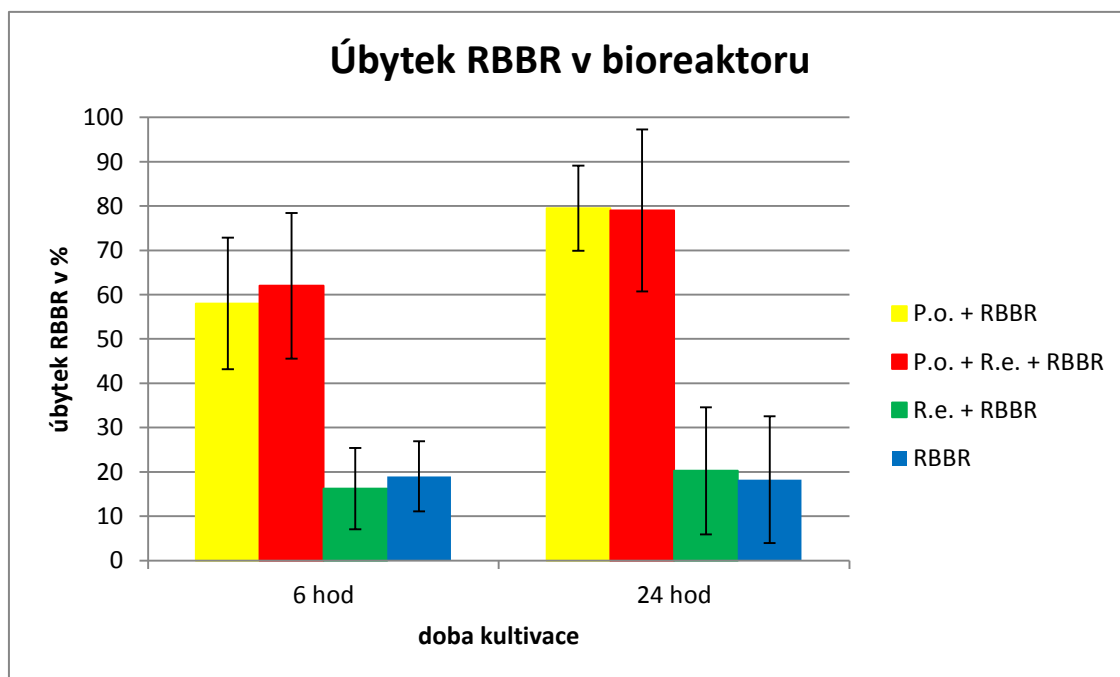
P.o. + *R.e.* s RBBR = kokultivace *P. ostreatus* a *R. erythropolis*, přidáno barvivo RBBR.

R.e. bez RBBR = bioreaktor s *R. erythropolis*, bez barviva RBBR.

5.3.2. Dekolorizace barviva RBBR směsnou kulturou ve „fixed-bed“ bioreaktoru

Během kokultivace *P. ostreatus* s *R. erythropolis* ve „fixed-bed“ bioreaktoru byla sledována schopnost houby *P. ostreatus* odbourávat textilní barvivo RBBR. Barvivo bylo přidáno do MEG média v koncentraci 100 mg/l. V průběhu kultivace byl z odebíraných vzorků spektrofotometricky zjišťován úbytek barviva v čase. Cílem bylo zjistit, zda přítomnost *R. erythropolis* bude ovlivňovat schopnost *P. ostreatus* barvivo odbourávat.

Graf na Obr. 13 shrnuje výsledky čtyř opakování pokusu. Nejvyšší úbytek barviva RBBR v médiu po 6 a 24 hodinách byl zjištěn v bioreaktoru s *P. ostreatus* a v kokultivaci *P. ostreatus* a *R. erythropolis* (viz Obr. 13 A, B). Rozdíl v dekolORIZACI mezi těmito dvěma bioreaktory je nepatrný, po 6 hodinách kultivace došlo v obou bioreaktorech k odbourání zhruba 60 % barviva, po 24 hodinách kultivace bylo odbouráno kolem 80 % barviva. Samotná bakterie *R. erythropolis* barvivo RBBR zřejmě neodbourává, po 6 hodinách ubylo 16 % barviva, po 24 hodinách 20 % barviva. Tyto hodnoty jsou srovnatelné s kontrolou, která obsahovala pouze PUF nosič, MEG médium a RBBR (po 6 hodinách úbytek o 19 % barviva, po 42 hodinách o 18 % barviva). V kontrole docházelo k viditelné sorpci barviva na povrch PUF kostek.



Obr. 13. – Grafické znázornění úbytku barviva RBBR v průběhu kultivace ve „fixed-bed“ bioreaktoru po 6 a 24 hodinách kultivace.

P.o. + RBBR = bioreaktor s *P. ostreatus*, přidáno barvivo RBBR.

P.o. + R.e. + RBBR = kokultivace *P. ostreatus* a *R. erythropolis*, přidáno barvivo RBBR.

R.e. + RBBR = bioreaktor s *R. erythropolis*, přidáno barvivo RBBR.

RBBR = pouze barvivo RBBR.

5.3.3. Produkce ligninolytických enzymů ve „fixed-bed“ bioreaktoru

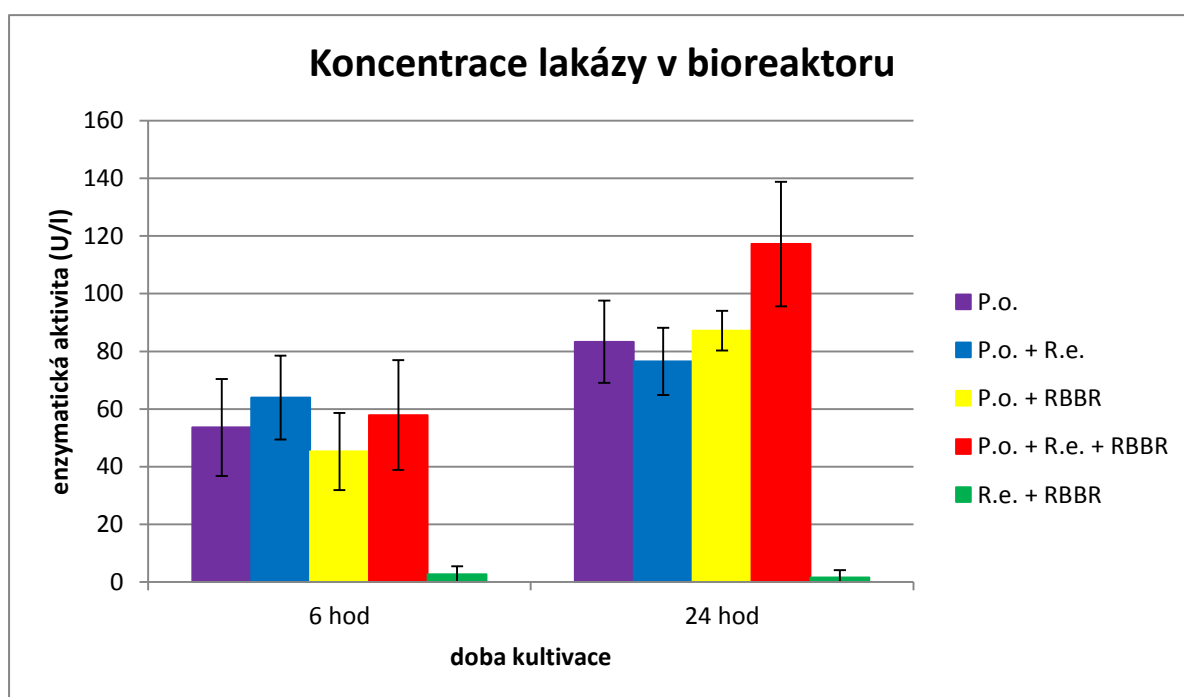
Ze vzorků odebíraných z bioreaktoru v průběhu kultivace byla zjišťována také aktivita extracelulárních ligninolytických enzymů, které produkuje *P. ostreatus*. Sledovanými enzymy byla lakáza (Lac), mangan-dependentní peroxidáza (MnP) a mangan-independentní peroxidáza (MiP). Bylo zjišťováno, zda na produkci houbových enzymů bude mít vliv přítomnost bakterie *R. erythropolis* a barviva RBBR v bioreaktoru.

Ze skupiny námi sledovaných enzymů byla majoritně produkovaným enzymem Lac. MnP a MiP byly v médiu zjištěny ve velmi nízkém množství a s velkou směrodatnou odchylkou. V bioreaktorech byly naměřeny aktivity obou enzymů v hodnotách do 5 U/l. Data nejsou uvedena.

Na Obr. 14 je uvedeno grafické znázornění enzymatické aktivity Lac po 6 a 24 hod kultivace v bioreaktoru v uvedeném uspořádání, které zahrnuje výsledky šesti pokusů. Po 6 hodinách kultivace bylo největší množství Lac zjištěno při směsné kultivaci bez barviva RBBR, enzymatická aktivita činila průměrně $63,9 \pm 14,5$ U/l. O trochu nižší koncentrace byla

při kokultivaci s barvivem RBBR, průměrně $57,9 \pm 19,0$ U/l. V kultivaci *P. ostreatus* bez RBBR byla aktivita $53,6 \pm 16,8$ U/l a v kultivaci *P. ostreatus* s RBBR byla $45,3 \pm 13,4$ U/l. V kultivaci *R. erythropolis* s RBBR bylo zjištěno minimální množství Lac, průměrně $2,6 \pm 2,8$ U/l.

Po 24 hod kultivace byla nejvyšší koncentrace Lac při kokultivaci s RBBR, kde vzrostla na $117,2 \pm 21,6$ U/l. Méně Lac bylo v kultivaci *P. ostreatus* s RBBR, kde bylo průměrně $87,2 \pm 6,9$ U/l a v kultivaci *P. ostreatus* bez RBBR, kde bylo zjištěno $83,3 \pm 14,3$ U/l. Při kokultivaci bez RBBR, kde byla hladina Lac po 6 hodinách kultivace nejvyšší, bylo po 24 hodinách naměřeno $76,5 \pm 11,6$ U/l. V kultivaci *R. erythropolis* s RBBR byla průměrně $1,5 \pm 2,6$ U/l.



Obr. 14. – Grafické znázornění koncentrace lakázy ve „fixed-bed“ bioreaktoru po 6 a 24 hodinách kultivace.

P.o. = bioreaktor s *P. ostreatus*.

P.o. + R.e. = kokultivace *P. ostreatus* a *R. erythropolis*.

P.o. + RBBR = bioreaktor s *P. ostreatus*, přidáno barvivo RBBR.

P.o. + R.e. + RBBR = kokultivace *P. ostreatus* a *R. erythropolis*, přidáno barvivo RBBR.

R.e. + RBBR = bioreaktor s *R. erythropolis*, přidáno barvivo RBBR.

RBBR = pouze barvivo RBBR.

5.4. Růst bakterií v kultivační tekutině *P. ostreatus*

V rámci studia vlivu houby *P. ostreatus* na růst bakterií byly testovány bakterie *R. erythropolis* a *S. marcescens*, které byly kultivovány v kultivační tekutině získané filtrací kultivační tekutiny po kultivaci houby *P. ostreatus* na MEG médiu. Bakteriální kultury byly pěstovány v objemu 10 ml v Erlenmayerově baňce. Jako kontrola byla použita bakteriální kultura pěstovaná v MEG médiu. Kultivace probíhala dle Kap. 4.6.6. Pokus byl proveden ve třech paralelních opakováních. V průběhu kultivace byl zjišťován nárůst bakterií spektrofotometricky.

Získané hodnoty optické denzity média s bakteriemi jsou uvedeny v Tab. 6 a normalizované hodnoty jsou graficky znázorněny na Obr. 15. Při kultivaci *R. erythropolis* v kultivační tekutině *P. ostreatus* byl prvních 7,5 hod kultivace pozorován úbytek bakterií, po 24 hod množství bakterií v médiu vzrostlo na $O.D._{600nm} = 0,341$, což je výrazně nižší hodnota než v kontrolní MEG kultivaci. Po dvou hodinách kultivace v kultivační tekutině *P. ostreatus* byly v médiu pozorovány shluky bakterií, kterých postupem času přibývalo, to mělo vliv i na přesnost měření zákalu bakterií v médiu. V kontrolní kultivaci v MEG médiu bakterie rostly standardně. Byla pozorována lag fáze trvající 2 hodiny a po 24 hod zákal média dosahoval $O.D._{600nm} = 2,356$.

Při kultivaci *S. marcescens* v kultivační tekutině *P. ostreatus* byl pozorován úbytek bakterií v médiu. Po 24 hod kultivace zákal média poklesl na $O.D._{600nm} = 0,059$. V kontrolní kultivaci v MEG médiu byla zaznamenána lag fáze dlouhá 6,5 hod. Na konci kultivace po 24 hod množství bakterií v médiu dosahovalo $O.D._{600nm} = 2,146$. V kultivaci *S. marcescens* tvorba shluků nebyla pozorována.

	<i>R.e.</i> MEG $O.D._{600nm}$	<i>R.e.</i> kult. tek. $O.D._{600nm}$	<i>S.m.</i> MEG $O.D._{600nm}$	<i>S.m.</i> kult. tek. $O.D._{600nm}$
0 hod	0,128	0,124	0,104	0,092
7,5 hod	0,554	0,063	0,114	0,082
24 hod	2,356	0,341	2,146	0,059

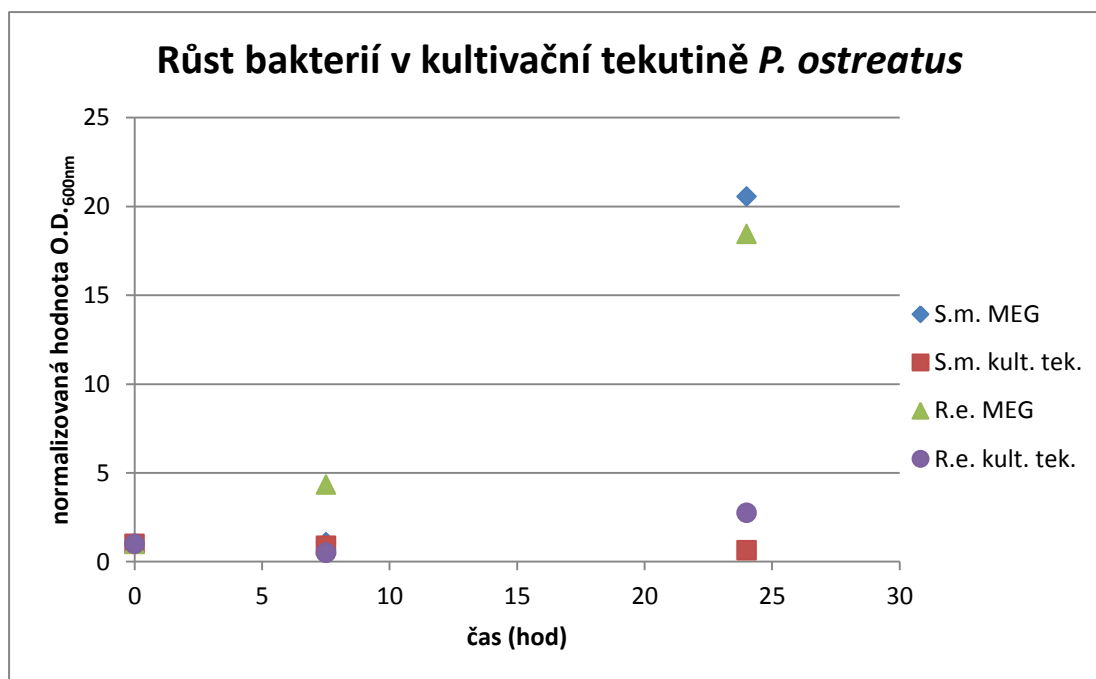
Tab. 6. – Souhrnná tabulka hodnot $O.D._{600nm}$ bakterií v průběhu kultivace *R. erythropolis* a *S. marcescens* v kultivační tekutině *P. ostreatus*.

R.e. MEG = *R. erythropolis* v MEG médiu.

R.e. kult. tek. = *R. erythropolis* v kultivační tekutině *P. ostreatus*.

S.m. MEG = *S. marcescens* v MEG médiu.

S.m. kult. tek. = *S. marcescens* v kultivační tekutině *P. ostreatus*



Obr. 15. – Grafické zobrazení normalizovaných hodnot množství bakterií *R. erythropolis* a *S. marcescens* v kultivační tekutině *P. ostreatus* a v čistém MEG médiu během 24 hod kultivace. Všechny hodnoty O.D._{600nm} byly vztaženy k počáteční hodnotě O.D._{600nm}, která odpovídá 1.

R.e. MEG = *R. erythropolis* v MEG médiu.

R.e. kult. tek. = *R. erythropolis* v kultivační tekutině *P. ostreatus*.

S.m. MEG = *S. marcescens* v MEG médiu.

S.m. kult. tek. = *S. marcescens* v kultivační tekutině *P. ostreatus*.

5.5. Inhibiční vlivy na růst bakterií v kultivační tekutině po *P. ostreatus*

5.5.1. Vliv lakázy přítomné v kultivační tekutině na růst bakterií

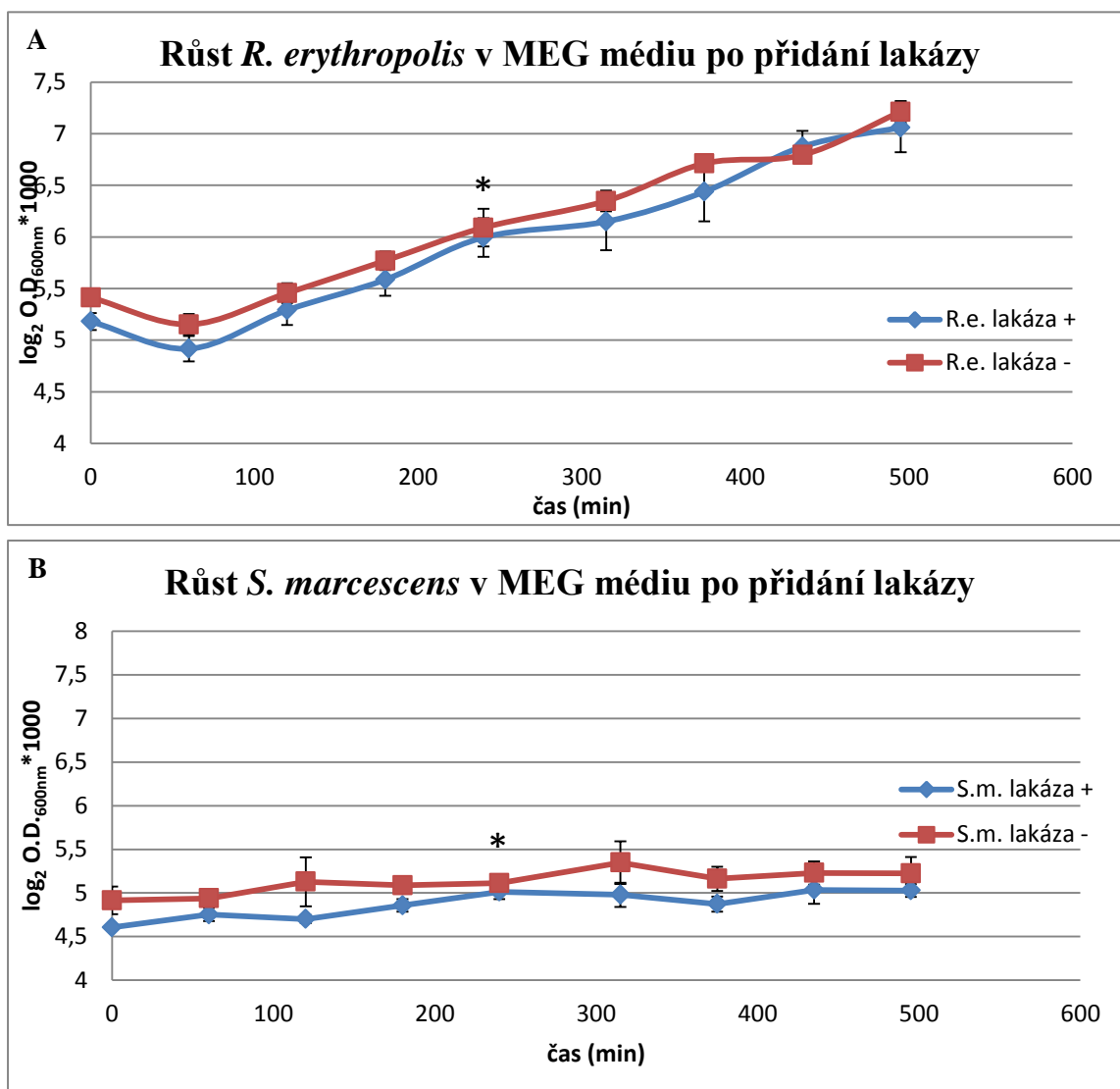
V tomto experimentu byl studován vliv přídavku enzymu lakázy do kultivačního média na růst bakteriální kultury *R. erythropolis* a *S. marcescens*. Byla použita lakáza izolovaná z kmene *P. ostreatus* 3004. Bakterie byly standardně kultivovány v MEG médiu a po 4 hod kultivace byla do média přidána lakáza v množství 200 mU enzymové aktivity na kulturu (objem kultury 20 ml). Poté byly prováděny odběry vzorků kultury, z nichž bylo zjišťováno množství bakterií v kultuře a enzymatická aktivita lakázy. Experiment byl prováděn ve třech opakováních, výsledky pokusu jsou uvedeny na Obr. 16.

Lag fáze v obou kultivacích *R. erythropolis* trvala 60 min. Čas přidání lakázy do média je v grafu vyznačen hvězdičkou. Přídavek enzymu neměl vliv na růst bakterie. Doba

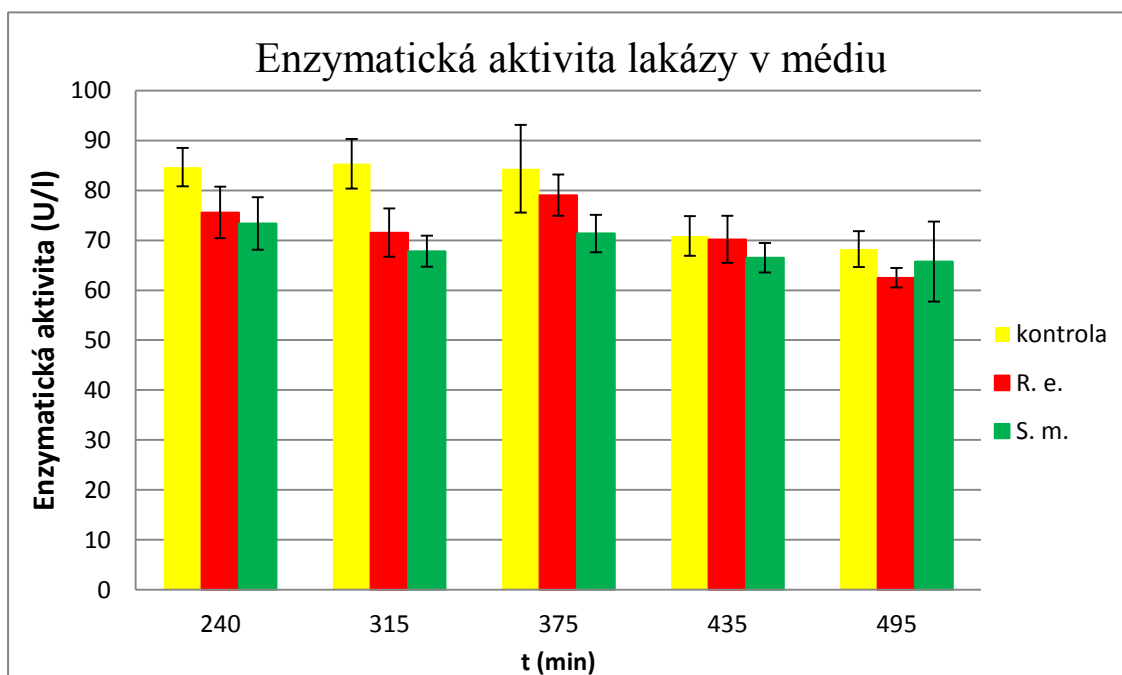
zdvojení bakterie byla vypočítána z hodnot v čase 240.–495. minuty kultivace, tedy po přidání lakázy do média. Doba zdvojení v kultivaci *R. erythropolis* s lakázou činila $182,3 \pm 39,7$ min, v kultivaci bez lakázy $174,8 \pm 38,2$ min.

Bakterií *S. marcescens* v průběhu experimentu ani v jedné kultivaci nepřibývalo (viz Obr. 16 B). Tato kultivace proto nebyla dále vyhodnocována.

V průběhu kultivace byla také sledována enzymatická aktivita lakázy v bakteriálních kulturách s přidaným enzymem. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v grafu na Obr. 17. Jako kontrola bylo použito MEG médium bez bakterií, do kterého bylo přidáno stejné množství enzymu jako k bakteriálním kulturám a které bylo kultivováno současně s testovanými bakteriemi. Výsledky ukázaly, že i po 255 minutách kultivace přetrvalo v kulturách 80-90 % přidaného enzymu. V kontrole byl pozorován 20% úbytek enzymu způsobený deaktivací enzymu za kultivačních podmínek.



Obr. 16. – Grafické znázornění růstu *R. erythropolis* (A) a *S. marcescens* (B) v MEG médiu po přidání lakázy. Přídavek lakázy do média v průběhu kultivace je označen v grafu hvězdičkou.



Obr. 17. – Grafické znázornění množství enzymatické aktivity lakázy v médiu při kultivaci bakterií *R. erythropolis* a *S. marcescens*

5.5.2. Stanovení změny pH kultivační tekutiny po *P. ostreatus*

P. ostreatus byl kultivovaný na PUF kostkách v MEG médiu. Získaná kultivační tekutina po této kultivaci dále sloužila k testování bakterií, tentokrát s ohledem na změnu pH média.

Nejprve byla sledována změna pH MEG média v kultuře *P. ostreatus* na PUF kostkách. V čase 12 dní kultivace bylo ke kultuře *P. ostreatus* přidáno 100 ml čerstvého MEG média, které mělo pH 4,88. Po přidání média do kultivace byla sledována změna pH média po dobu 48 hod (viz Tab. 7). Měřením bylo zjištěno, že za 48 hod nedošlo k významným změnám hodnot pH.

Po 48 hodinách kultivace byla kultivační tekutina zfiltrována od houbových kultur a použita pro následnou kultivaci *R. erythropolis*. V průběhu kultivace bylo pak sledováno pH média.

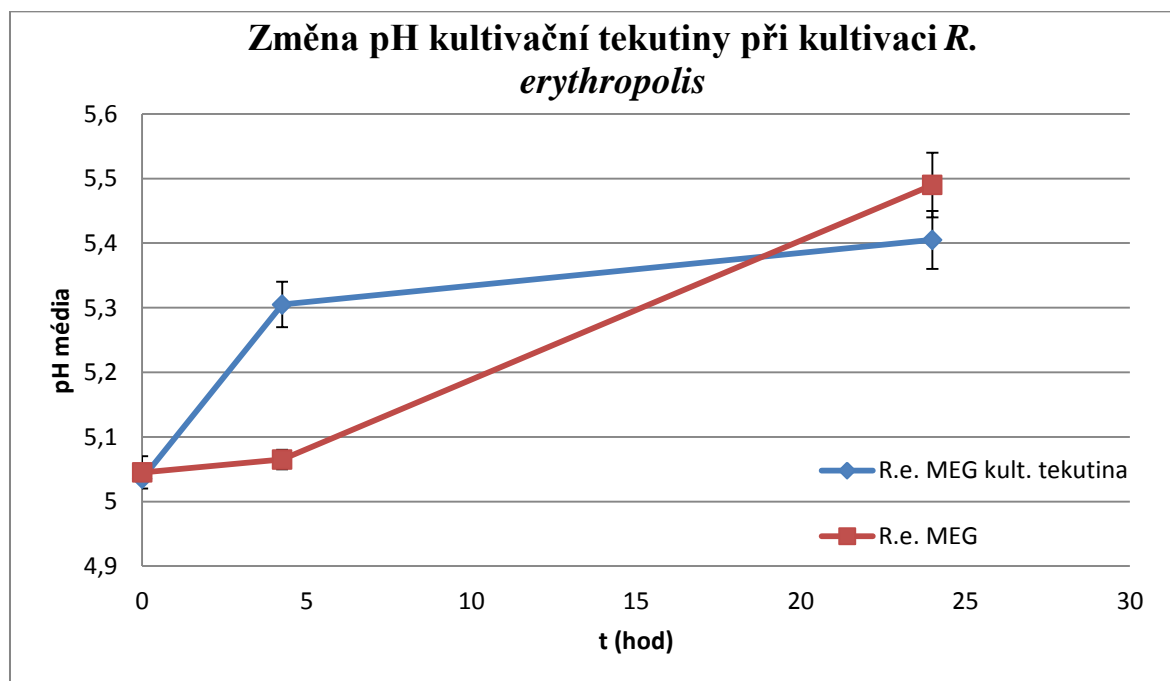
Bakteriální kultury rostly stejně jako v předchozím experimentu (viz Kap. 5.5.1). Na Obr. 18 lze pozorovat, že během 24 hod kultivace bakterie *R. erythropolis* došlo ke zvýšení pH v kultivační tekutině z *P. ostreatus* i při kontrolní kultivaci pouze v MEG médiu. V kultivační tekutině z *P. ostreatus* změna nastala rychleji. V čase 4,25 hod je průměrné pH média v této kultivaci 5,31, v kontrolní kultivaci je průměrné pH média 5,07. Po 24 hod kultivace je vyšší pH média v kontrolní kultivaci, kde dosahuje hodnoty 5,49, zatímco

v kultivační tekutině z *P. ostreatus* je průměrné pH 5,41. Po 24 hod kultivace došlo v kultivační tekutině z *P. ostreatus* ke zvýšení pH média zhruba o 0,37 jednotky, v kontrolní kultivaci o 0,45 jednotky.

P. ostreatus v průběhu 48 hod kultivace pH MEG média prakticky nemění. Naproti tomu bakterie *R. erythropolis* v průběhu 24 hod kultivace v kultivační tekutině zvyšuje pH média.

čas (hod)	pH média
0	4,88
24	4,93 ± 0,08
48	4,90 ± 0,06

Tab. 7. – Hodnoty pH kultivačního média v průběhu kultivace s *P. ostreatus*.



Obr. 18. – Změna pH média v kultivaci *R. erythropolis* během 24 hod.

5.5.3. Stanovení úbytku glukózy v tekutém médiu během kultivace *P. ostreatus*

Po 24 hodinách kultivace *P. ostreatus* v bioreaktoru byly odebrány vzorky média pro kolorimetrické stanovení obsahu glukózy. Cílem bylo zjistit, zda nedochází vlivem kultivace *P. ostreatus* v médiu k poklesu glukózy natolik, aby byl tímto ovlivněn růst bakterií, jak bylo pozorováno v Kap. 5.4.

V Tab. č. 8 jsou uvedeny hodnoty glukózy v MEG médiu a v kultivační tekutině po *P. ostreatus*. Vzorky byly měřeny v triplicátech. Po 24 hodinách kultivace v médiu zbývalo 65 % výchozího množství glukózy, což by měla být dostatečná hodnota pro růst bakterií.

	MEG médium	Kultivační tekutina
Obsah glu v g/l	15,69 ± 0,432	10,15 ± 0,237
Obsah glu v %	100 %	65 %

Tab. 8. – Hladina glukózy v MEG médiu a v kultivační tekutině *P. ostreatus* získané z bioreaktoru.

5.6. Proteomická analýza bakteriálních a houbových proteinů

5.6.1. Proteinový profil buněčných a EC proteinů houby a bakterie (1-DE)

Houbové a bakteriální vzorky z výše uvedených kultivačních experimentů posloužily i pro proteomické analýzy. Pomocí 1-D elektroforézy byly separovány proteiny získané z tekutých kultur bakterií nebo z „fixed-bed“ bioreaktoru.

Bylo porovnáno spektrum extracytoplazmatických proteinů (ECP) v kultivační tekutině z *P. ostreatus* (SUP), ve které byla následně kultivována *S. marcescens* a *R. erythropolis* se spektrem ECP *S. marcescens* a *R. erythropolis* kultivované v MEG médiu (MEG). Cílem bylo detekovat houbové proteiny, které *P. ostreatus* produkuje do média, a zjistit, jak přítomnost bakterií při kultivaci tyto houbové proteiny ovlivňuje.

Ve vzorcích ECP *S. marcescens* a *R. erythropolis* kultivovaných v SUP (Obr. 19, dráhy č. 3 a 5) pozorujeme výrazný proužek v oblasti 45 kDa, který není přítomný u ECP *S. marcescens* a *R. erythropolis* kultivovaných pouze v MEG (dráhy č. 2 a 4). Proteinový proužek ve stejné oblasti je přítomen i u vzorků ECP z bioreaktoru - kultivace *P. ostreatus* samostatně i kokultivace *P. ostreatus* a *R. erythropolis* (dráhy č. 6, 7 a 8). Toto zjištění nasvědčuje tomu, že tento dominantní proužek by mohl být houbovým produktem. Intenzita tohoto proužku je v kultivaci s *S. marcescens* nižší než při kultivaci s *R. erythropolis*, což by mohlo souviset s rozdílnou rychlostí degradace této bílkoviny v závislosti na typu kultivace.

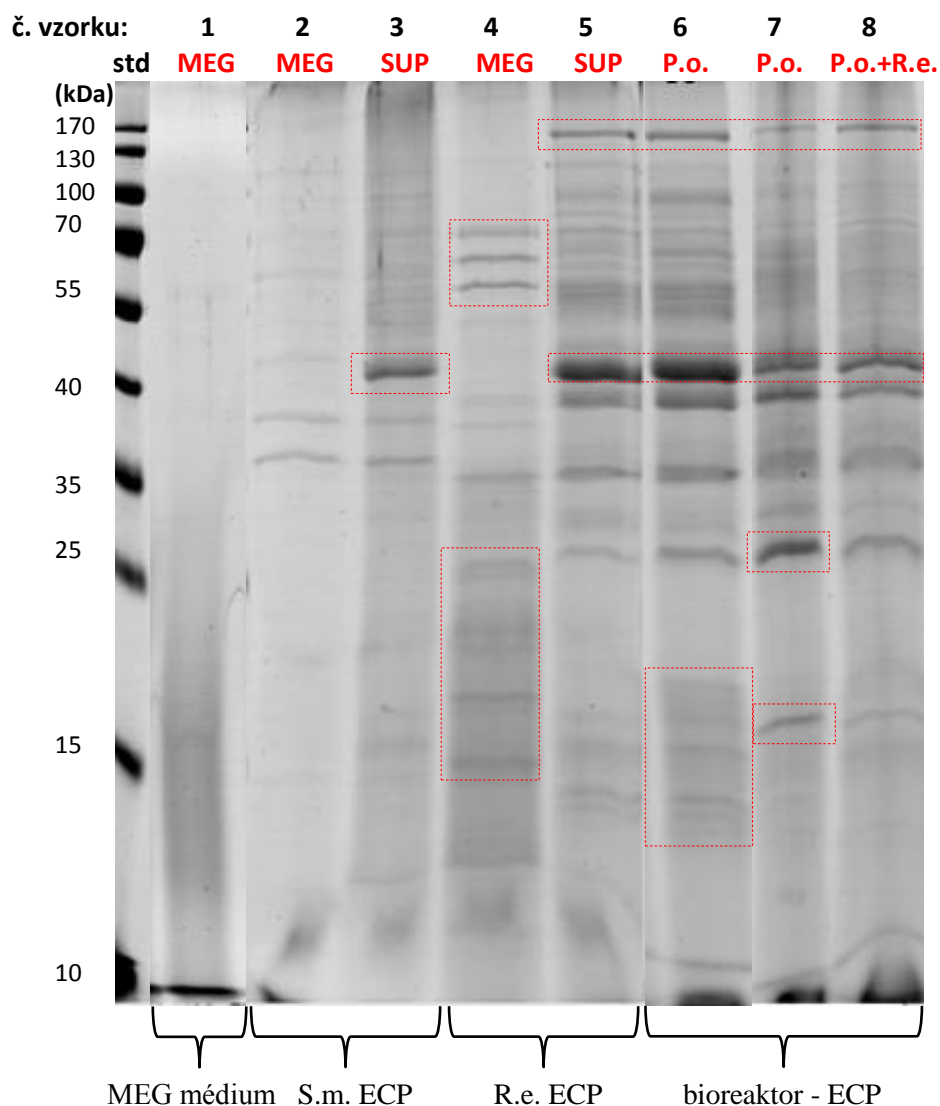
Ve vzorku ECP bakterie *R. erythropolis* kultivované v MEG (dráha č. 2) pozorujeme proužky v oblasti 55–90 kDa a v oblasti 15–25 kDa, které chybí ve vzorcích ECP z bakterie *R. erythropolis* kultivované v SUP (dráha č. 3), což by mohlo poukazovat na proteiny produkované samotnou bakterií *R. erythropolis*.

Další výrazný proužek v oblasti 170 kDa je přítomen ve vzorcích ECP ze SUP, jak houby kultivované v bioreaktoru, tak z kokultivace *P. ostreatus* a *R. erythropolis* v bioreaktoru (dráhy č. 6, 7 a 8). Tento proužek rovněž pozorujeme ve vzorku ECP *R. erythropolis* kultivované v SUP (dráha č. 5), ale nebyl zachycen ve vzorku ECP *S. marcescens* kultivované v SUP (dráha č. 3). I přesto by se mohlo jednat o unikátní houbový protein, který mohl být opět během kultivace s bakterií *S. marcescens* degradován.

Při srovnání vzorků z bioreaktoru, kdy byl kultivován v zařízení pouze *P. ostreatus* (dráhy č. 6 a 7) se vzorky z kokultivace *P. ostreatus* a *R. erythropolis* (dráha č. 8), byly pozorovány pouze drobné kvantitativní změny a to v oblasti 15 kDa a 25 kDa.

Výraznější proteinové změny byly překvapivě zaznamenány mezi duplikáty kultivace *P. ostreatus* v bioreaktoru (dráhy č. 6 a 7), přestože byly dodrženy stejné podmínky kultivace. Nicméně jedná se opět převážně o změny kvantitativního charakteru, a to v oblasti 170 kDa, 45 kDa, 25 kDa a rozmezí 10 až 20 kDa.

Pro úplnost bylo MEG médium podrobena stejné izolační proceduře pro získání proteinů jako u ostatních vzorků (dráha č. 1). Tato kontrola posloužila pro vyloučení možné kontaminace vzorků proteiny obsaženými v médiu. V médiu nebyly detekovány proteiny v množství, které by bylo pro tuto analýzu rozhodující.



Obr. 19. – 1-DE gel ECP bakterií a hub.

std = standard molekulových hmotností, jeho hodnoty uvedeny v levé části obrázku

1. MEG médium = proteiny izolované z MEG média

2. S.m. ECP MEG = ECP izolované z MEG média po kultivaci bakterie *S. marcescens*

3. S.m. ECP SUP = ECP izolované z kultivační tekutiny („supernatant“) po následné kultivaci bakterie *S. marcescens*

4. R.e. ECP MEG = ECP izolované z MEG média po kultivaci bakterie *R. erythropolis*

5. R.e. ECP SUP = ECP izolované z kultivační tekutiny po následné kultivaci bakterie *R. erythropolis*

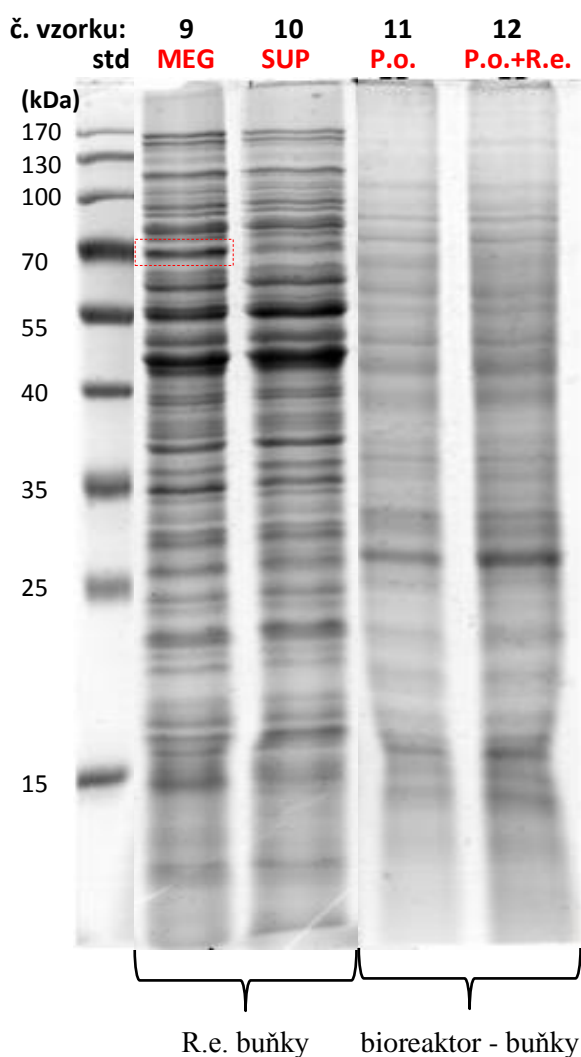
6. BR ECP P.o. = ECP získané z kultivační tekutiny z bioreaktoru - kultivace *P. ostreatus*

7. BR ECP P.o. = ECP získané z kultivační tekutiny z bioreaktoru - kultivace *P. ostreatus*

8. BR ECP P.o. + R.e. = ECP získané z kultivační tekutiny z bioreaktoru – kokultivace *P. ostreatus* a *R. erythropolis*

Spektrum buněčných bakteriálních proteinů (Obr. 20) z kultur narostlých v kultivační tekutině *P. ostreatus* je prakticky shodné se spektrem proteinů z kultur narostlých v MEG médiu (dráhy č. 9 a 10). Výjimkou je proužek v oblasti 70 kDa, který je u kultur rostoucích v MEG médiu zřetelnější. Expresi této skupiny proteinů by mohla být negativně ovlivněna látkami produkovanými *P. ostreatus*.

Byly také srovnávány vzorky buněčných proteinů z kultivace *P. ostreatus* v bioreaktoru a kokultivace *P. ostreatus* a *R. erythropolis* z bioreaktoru. Mezi vzorky nejsou patrné žádné rozdíly, přítomnost bakterie nemá vliv na expresi houbových buněčných proteinů.



Obr. 20. – 1-DE gel buněčných proteinů bakterií a hub.

std = standard molekulových hmotností, jeho hodnoty uvedeny v levé části obrázku

9. R.e. buňky MEG = buněčné proteiny *R. erythropolis* po kultivaci v MEG médiu

10. R.e. buňky SUP = buněčné proteiny izolované z kultivační tekutiny po následné kultivaci bakterie *R. erythropolis*

11. BR buňky P.o. = buněčné proteiny *P. ostreatus* získané z PUF kostek z bioreaktoru – kultivace *P. ostreatus*

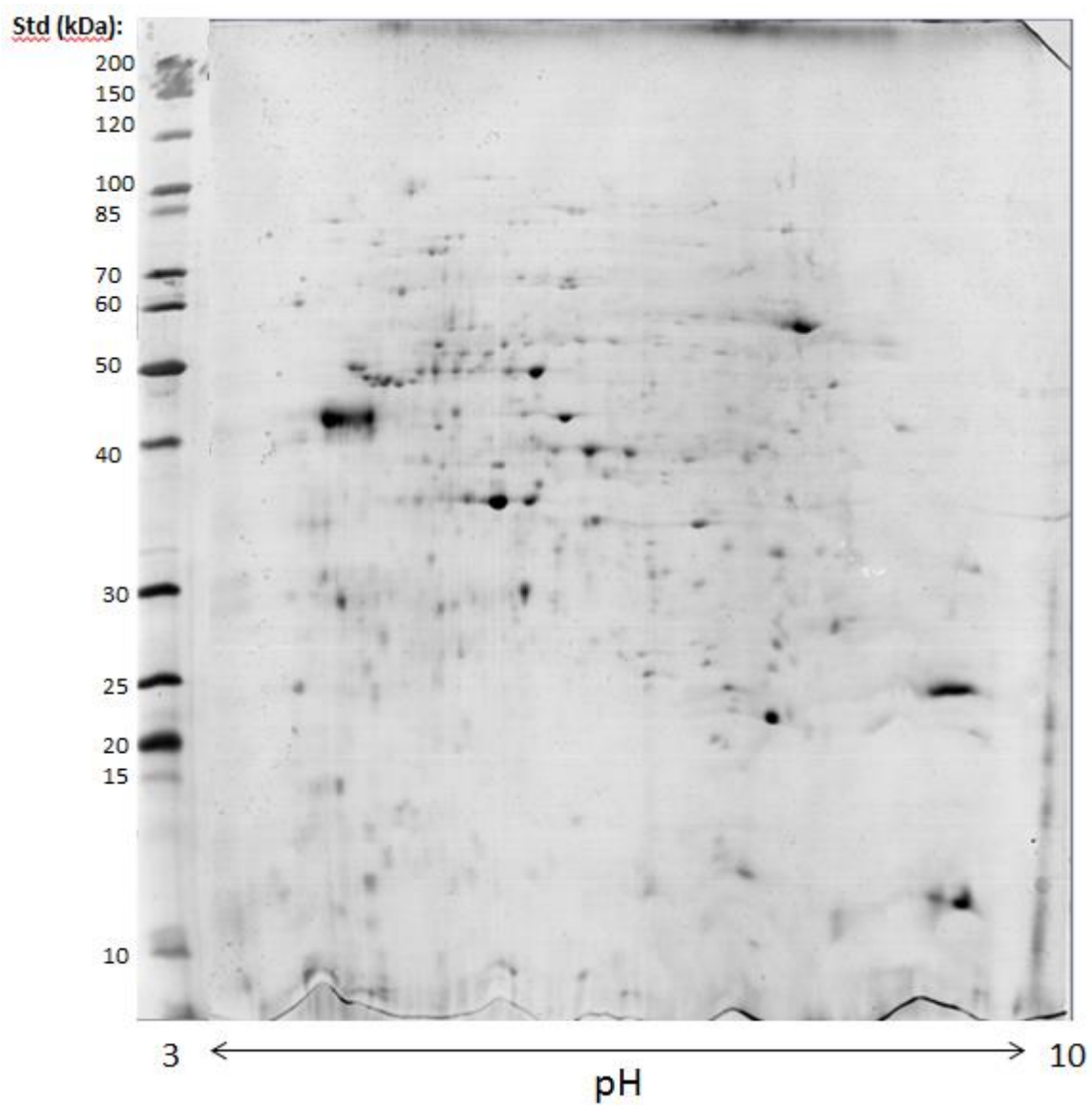
12. BR buňky P.o.+R.e. = buněčné proteiny směsné kultury získané z PUF kostek z bioreaktoru – kokultivace *P. ostreatus* a *R. erythropolis*

5.6.2. Buněčný proteom *P. ostreatus* a *R. erythropolis*

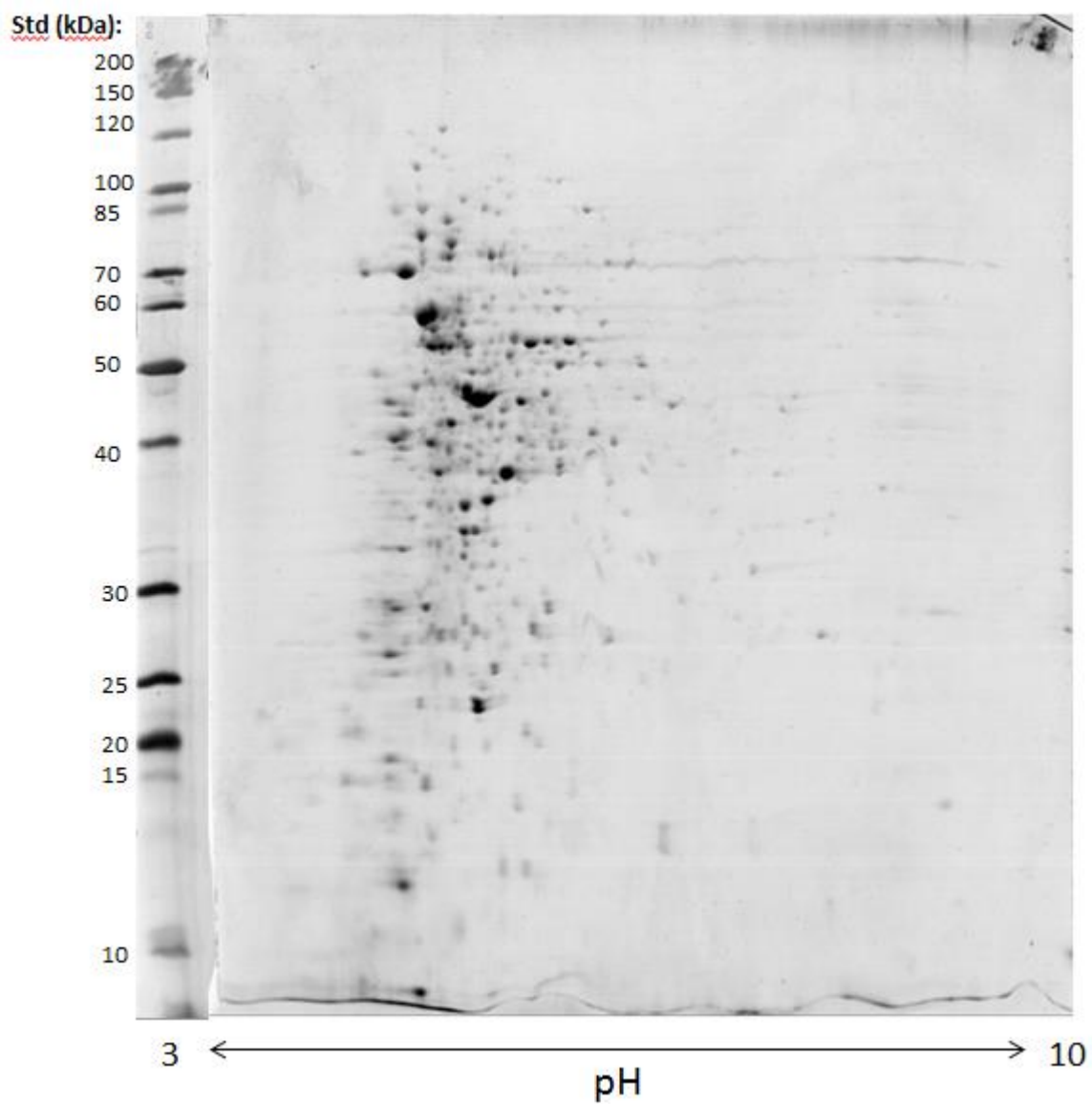
V pilotním proteomovém experimentu jsme chtěli otestovat, jak dobře lze bílkoviny houbové i bakteriální separovat pomocí 2-DE a jak odlišné budou jejich bílkovinné profily.

2-D elektroforéza byla použita pro analýzu buněčných proteinů *P. ostreatus* a *R. erythropolis*, které byly získány z kultivace na kuličkách v MEG médiu.

Obr. 21 a 22 představuje proteomy *P. ostreatus* a *R. erythropolis* kultivované na inertním povrchu – skleněné kuličky s MEG médiem. U obou vzorků nebyl problém se solubilizací a dělením bílkovin. Výsledné buněčné proteomy jsou velmi odlišné, zásadní rozdíl lze pozorovat ve spektru proteinů houby *P. ostreatus*, která má proteiny zastoupeny v celé škále použitého rozmezí pH stripu, tj. pH 3 až 10, zatímco u bakterie *R. erythropolis* je převážná část proteinů v kyselé oblasti stripu v rozmezí pH 4-7. Protože se nepodařilo vypěstovat na mikrokuličkách směsnou kulturu, kde by byly oba mikroorganismy zastoupeny stejným poměrem, nebylo možné získat proteom směsné kultury. Proteomy získané z 2-DE nebyly proto dále hodnoceny.



Obr. 21. – 2-DE gel buněčných proteinů *P. ostreatus* z kultivace na skleněných mikrokuličkách.



Obr. 22. – 2-DE gel buněčných proteinů *R. erythropolis* z kultivace na skleněných mikrokuličkách.

6. DISKUZE

Cílem této diplomové práce bylo studium vzájemných interakcí houby *P. ostreatus* a bakterie *R. erythropolis* při biodegradačních procesech. Oba mikroorganismy disponují velkým biodegradačním potenciálem (shrnuto v Cohen *et al.* 2002 a v Martínková *et al.* 2009) a proto byly vybrány do experimentu za účelem navýšení degradační kapacity. Možnost kooperace houby a bakterií v biodegradačních reakcích byla již dříve navrhována na základě jejich metabolických schopností a potvrzena ve studiích se směsnými kulturami (shrnuto v Mikesková *et al.* 2012). V případě dekolizace směsi průmyslových barviv v odpadních vodách byla takováto kooperace pozorována např. se směsnou kulturou *Irpex lacteus* a aktivovaného kalu (Novotný *et al.* 2011).

V práci bylo vyzkoušeno několik kultivačních systémů pro vzájemnou kokultivaci *P. ostreatus* a *R. erythropolis*. Nejprve byl pro testování vzájemné inhibice růstu obou organismů použit jednoduchý inhibiční test na Petriho miskách podle práce Radtke *et al.* (1994), který ukázal, že by nemělo docházet k vzájemným inhibičním interakcím mezi sledovanými druhy (Obr. 8).

První část práce pak zahrnovala vyzkoušení různých kultivačních zařízení vhodných pro kokultivaci i s ohledem na následující získání obou partnerů pro morfologickou a biochemickou analýzu. Biochemická charakterizace zahrnovala biodegradační experimenty, sledování enzymatické aktivity ligninolytických enzymů v kulturách a proteomickou analýzu. Použit byl dvoufázový systém podle Nquyen *et al.* (2005) - skleněné mikrokuličky s tekutým médiem, které určitým způsobem simulují přirozené prostředí (částičky půdy). Tento systém byl s úspěchem použit pro studium diferenciací u streptomycet (Nquyen *et al.* 2005; Petráčková *et al.* 2013) a je vhodný pro následnou čistou izolaci proteinů. Další výhodou tohoto prostředí je, že kuličky tvoří inertní povrch, který houba není schopna svými extracelulárními enzymy degradovat, na rozdíl od agaru. Pozorování kultur v tomto systému ukázalo, že současná inokulace houby i bakterie vedla k rychlému nárůstu bakteriálního biofilmu kvůli vyšší rychlosti růstu bakterií a tím došlo k inhibici růstu houby. Ani předsazení inokulace houby před bakterií nemělo žádoucí vliv na sjednocení růstu. Jak ukazují snímky z binokulární lupy (Obr. 9), hydrofobní povrch mycelia znemožnil přilnutí bakterií k houbovým vláknům a jejich růst, nebylo tedy dosaženo vzniku směsného biofilmu. Fluorescentní barvení bakterií pak ukázalo přítomnost živých i mrtvých bakteriálních buněk v blízkosti houbových hyf (Obr. 10). Živé bakterie místy přisedaly na povrch houbových vláken. Obdobné problémy nastávaly při kokultivaci v tekutém médiu (plovoucí biofilm),

(Obr. 11). Ve společné kultivaci výrazně převažoval bakteriální biofilm, který neumožnil dostatečný prostor pro růst houbového mycelia. Ale i přesto takováto konsorcia vláknitých hub a bakterií mohou být úspěšná v dekolorizaci syntetických barviv (Gou *et al.* 2009; Novotný *et al.* 2011).

Pro další pokusy a biochemickou charakterizaci kokultur *P. ostreatus* a *R. erythropolis* byl vybrán systém bioreaktorový, ve kterém houba byla imobilizována na PUF kostkách (podle Kasinath *et al.* 2003). Zhang *et al.* 1999 ve své studii dekolorizace barviva Orange II houbovým kmenem F29 zjistili, že imobilizace mycelia přispívá ke zvýšení účinnosti dekolorizace. V této práci bioreaktorový systém napodoboval možnou průmyslovou aplikaci houbového filtru při čištění odpadních vod, kdy lze předpokládat jeho kontaminaci bakteriemi. Předkultivací houbového mycelia na PUF kostkách, které byly následně přeneseny do bioreaktoru, bylo ve srovnání s předchozími kultivačními systémy dosaženo dostatečného nárůstu houby.

Jedním ze sledovaných faktorů kultivace v bioreaktoru byl růst *R. erythropolis*. Bylo zjištěno, že ihned po inokulaci bioreaktoru bakteriemi začala koncentrace planktonických bakterií v kultivační tekutině klesat, až prakticky vymizely (Obr. 12). Jako příčina této skutečnosti bylo zvažováno několik možností. Za jednu z nich bylo považováno působení enzymu lakázy (Lac), který *P. ostreatus* produkuje do média v poměrně velkém množství. Je známo, že ligninolytické enzymy houby produkují při interakci s jinými organismy, zejména antagonisty, a při chemickém stresu (např. ethanol, isopropanol, chlorid lithný, chlorid vápenatý), (White a Boddy 1992; Crowe a Olsson 2001). Tyto enzymy mohou ovlivnit bakterie přímým napadením bakteriální membrány nebo mohou uvolnit živiny pro bakterie následkem rozkladu organické hmoty (Tornberg *et al.* 2003). Mohou mít tedy negativní i pozitivní vliv. V bioreaktoru, kam byla k houbové kultuře přidána bakterie *R. erythropolis* a RBBR, byla zaznamenána nejvyšší hladina Lac (Obr. 14). Nicméně úbytek bakterií v médiu byl v tomto bioreaktoru stejný jako v bioreaktoru, kde byla pouze směsná kultura bez RBBR a ve kterém hladina Lac nebyla tak vysoká (viz Obr. 12 a 14). Do testování vlivu Lac na růst bakterií byla zahrnuta i bakterie *S. marcescens*, která byla vybrána z důvodu, že na rozdíl od *R. erythropolis* se jedná o zástupce skupiny gram-negativních bakterií, ale má podobné fyziologické vlastnosti jako *R. erythropolis* (fakultativně anaerobní půdní bakterie). Na gram-negativní a gram-pozitivní bakterie působí houby rozdílně. Bylo zjištěno, že množství gram-negativních bakterií v půdě po inokulaci hub vzrostlo (Tornberg *et al.* 2003), zatímco růst gram-pozitivních bakterií houby často inhibují (Coletto a Labollita 1997). Zvýšení růstu gram-negativních bakterií bylo pravděpodobně způsobeno uvolněním živin z lyzovaných

gram-pozitivních bakterií či z organické hmoty rozkládané houbou (Tornberg *et al.* 2003). Bakterie *R. erythropolis* a *S. marcescens* byly kultivovány v MEG médiu s Lac, v žádné kultivaci nebyla zaznamenána odchylka v růstu od kontrolní kultivace (Obr. 16). Enzym Lac pravděpodobně nebyl příčinou hynutí bakterií v bioreaktoru.

V rámci hledání příčiny úhynu bakterií v bioreaktoru bylo zjišťováno, zda nedochází ke snížení pH média vlivem působení *P. ostreatus*. Je známo, že vláknité houby produkují do svého okolí organické kyseliny, které napomáhají degradaci ligninu a celulózy, vyvazují toxické kovy z prostředí za vzniku nerozpustných sloučenin a uplatňují se v procesu patogeneze rostlin (shrnutí v Gadd 1999). Snížení pH okolí může rovněž přispět ke zvýšení konkurenceschopnosti hub vůči půdním bakteriím, které lépe rostou v neutrálním nebo slabě zásaditém pH (Rousk *et al.* 2009). MEG médium má pH přibližně rovno 4,9. Výraznější snížení hodnoty pH média by mohlo inhibovat bakteriální růst. Nicméně ke změně pH média vlivem přítomnosti *P. ostreatus* během 24 hodin kultivace nedošlo (Tab. 7) a bakterie v kontrolní kultivaci v MEG médiu o tomto pH vykazovaly normální nárůst (Obr. 18). Faktor pH se tedy také neprokázal jako příčina hynutí bakterií v bioreaktoru.

Třetím možným faktorem, který by mohl mít negativní vliv na bakteriální růst, byla možnost úbytku množství glukózy v médiu vlivem růstu *P. ostreatus*. Stanovením množství glukózy v kultivační tekutině odebrané z bioreaktoru bylo zjištěno, že v médiu po kultivaci *P. ostreatus* stále zbývá přibližně 10 g/l glukózy pro růst bakterií. Doporučená komplexní média pro *R. erythropolis* přitom obsahují 10 g/l glukózy (B8 médium – kvasinkový glukózový agar, Česká sbírka mikroorganismů, Masarykova univerzita Brno).

Příčinu hynutí bakterií v kultivační tekutině bioreaktoru by bylo tedy třeba hledat jinde. Vzorke kultivační tekutiny z kultur *P. ostreatus* z této práce byly předány na chemickou analýzu v Laboratoři environmentální biotechnologie za účelem stanovení houbových metabolitů, které by mohly ovlivňovat růst bakterií. Bylo ukázáno, že příbuzná houba *Pleurotus sajor-caju* produkuje organické látky s antimikrobiálními účinky, jako jsou beta-sitosterol, cholestanol, 1,5-dibenzoylnaftalen a 1,2-benzendikarboxylová kyselina (Gogavekar *et al.* 2014). Předběžné GC-MS analýzy kultivační tekutiny *P. ostreatus* ukázaly, že houba produkuje do kultivační tekutiny 3',4'-dimethoxy propiophenon, 6,7-dimethoxy-1(3H)-isobenzofuranon a 1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahydro-1,1,4a-trimethyl fenantren (dosud nepublikováno). Účinek těchto látek na *R. erythropolis* však nebyl dosud studován. Jeden derivát isobenzofuranonu byl nedávno izolován z houby *Paraphoma radicina* a testován na antimikrobiální účinky (El-Elimat *et al.* 2014). Antibakteriální vlastnosti látek produkovaných *P. ostreatus* vyžadují další cílené studium.

Po ukončení kultivace v bioreaktoru byly z kultur odebrány PUF kostky, ze kterých byla vymačkána suspenze buněk a vyseta na agarové misky. V suspenzi se nacházelo poměrně velké množství životaschopných bakteriálních buněk (Tab. 5). Je možné, že planktonní bakterie v kultivační tekutině v bioreaktoru uhynuly, ale bakterie, které se přichytily uvnitř PUF kostek a vytvořily biofilm, se tak staly odolnější vůči působení látky, která ovlivňovala jejich planktonický růst. Je známo, že bakterie žijící v biofilmu vykazují vyšší odolnost vůči nepříznivým vlivům než planktonní buňky (Olson *et al.* 2002).

Za účelem sledování kooperace *P. ostreatus* a *R. erythropolis* při biodegradčních procesech bylo do bioreaktoru přidáno textilní barvivo RBBR, které je častým znečištěním odpadních vod v zemích s textilním a barvírenským průmyslem. Směsná kultura *P. ostreatus* a *R. erythropolis* odbourávala barvivo s prakticky stejnou účinností jako čistá kultura *P. ostreatus* (Obr. 13). Bakterie *R. erythropolis* nedegradovala antrachinonové barvivo RBBR a ve směsné kultuře nedošlo ke kooperaci obou mikroorganismů, která by vedla ke zvýšení efektivity dekolorizace RBBR. Podle současných znalostí o dekolorizaci rodu *Rhodococcus* jsou tyto bakterie schopny dekolorizovat azobarviva (Chang a Lin 2001), včetně jejich sulfonovaných forem (Heiss *et al.* 1992). U nově objeveného kmene *Rhodococcus qingshengii* JB301 byla zjištěna schopnost dekolorizace trifenylmethanových barviv (Li *et al.* 2014). *Rhodococcus jostii* RHA1 disponuje peroxidázou dekolorizující barvivo Reactive Blue 4, které je rovněž součástí třídy antrachinonových barviv a je strukturně velice podobné RBBR (Roberts *et al.* 2011).

Bakteriální kontaminace může mít na efektivitu dekolorizace ligninolytických hub různý vliv. Podobné výsledky jako v této práci byly pozorovány ve studii srovnávající efektivitu dekolorizace RBBR houbou *I. lacteus* v půdě ve sterilních podmínkách a v přítomnosti půdního bakteriálního konsorcia získaného z půdy kontaminované barvivem (Bhatt *et al.* 2000). Směsná kultura byla v dekolorizaci prakticky stejně úspěšná jako jednotlivé kultury, ačkoli samotné bakteriální konsorcium dekolorizovalo barvivo s ještě vyšší účinností než samotná houba. Tato skutečnost je ve studii přisuzována antibakteriálnímu vlivu houby. Negativní vliv bakteriální kontaminace byl sledován v případě *T. versicolor*, která v čisté kultuře efektivně degradovala dvě azobarviva a antrachinonové barvivo Reactive Blue 19. Po kontaminaci bioreaktoru bakteriemi nastal pokles účinnosti dekolorizace. Růst bakteriální populace v bioreaktoru omezil růst houby a došlo ke snížení produkce houbových peroxidáz (Borchert a Libra 2001). Pozitivní vliv bakteriální kontaminace na efektivitu dekolorizace houbou *T. versicolor* pozoroval ve své studii Baldrian (2004).

V průběhu kultivace v bioreaktoru byla sledována hladina tří ligninolytických enzymů v kultivační tekutině – Lac, mangan-dependentní peroxidázy (MnP) a mangan-independentní peroxidázy (MiP). Obě uvedené peroxidázy se vyskytovaly v kulturách ve velice nízkém množství. Bylo zjištěno, že po 24 hodinách kultivace je nejvyšší množství Lac v bioreaktoru se směsnou kulturou *P. ostreatus* a *R. erythropolis*, kam bylo přidáno barvivo RBBR. Je možné, že houba byla stimulována k vyšší produkci enzymu kombinací obou těchto faktorů, tedy přítomností bakterie i barviva. Ve studii, kterou provedl Baldrian (2004), produkovaly *P. ostreatus* a *T. versicolor* vyšší množství Lac po přidání půdních bakterií do média, což způsobilo zvýšení dekolorizace barviva RBBR. V této práci pozitivní vliv vyšší koncentrace Lac na dekolorizaci RBBR směsnou kulturou pozorován nebyl. Ve studii Baldriana (2004) měla houba *T. versicolor* negativní vliv na růst půdních bakterií, nicméně nebylo prokázáno, že by příčinou byla právě Lac, stejně jako v této práci. Zvýšení produkce Lac bylo pozorováno také v blízkosti jiných druhů hub, a to zejména v interakčních zónách (Hiscox *et al.* 2010). Produkce Lac může být součástí mezidruhových interakcí (White a Boddy 1992). U houby *Trametes versicolor* bylo pak prokázáno, že produkce Lac byla indukována na transkripční úrovni organickým polutantem 17 α -ethinylestradiolem (Přenosilová *et al.* 2013) a směsí polychlorovaných bifenylnů Delor 103 (Plačková *et al.* 2012). Syntetická barviva, mezi nimi i RBBR, měla pak pozitivní vliv na produkci MnP u houby *Irpex lacteus* (Šušla a Svobodová 2008). Vedle ovlivnění hladiny produkovaných enzymů přítomnost barviv vedla i k produkci forem MnP s jinými hodnotami pI, než které byly detekovány v kontrolních kultivacích (Šušla a Svobodová 2008). Obdobný efekt by tedy RBBR mohlo vykazovat i v kulturách *P. ostreatus*.

Za účelem bližšího sledování vlivu *P. ostreatus* na bakteriální růst byl proveden pokus, kdy byly bakterie kultivovány v kultivační tekutině po *P. ostreatus*, z níž bylo mycelium odfiltrováno. *R. erythropolis* v kultivační tekutině dosáhl podstatně nižšího nárůstu v porovnání s kontrolní kultivací v MEG médiu (Obr. 15). Zároveň se v tekutině tvořily bakteriální shluky. Hydrofobní buňky *R. erythropolis* se shlukují v reakci na stres, kdy se snaží vystavit co nejmenší povrch buněk působení škodlivé látky. Ve studii Carvalho *et al.* (2004) bylo shlukování *R. erythropolis* sledováno v reakci na přítomnost rozpouštědel (butanolu a dimethylformamidu) v kultivačním médiu. Ve studii Chang *et al.* (2009) byla v procesu degradace alkanů *R. erythropolis* rovněž pozorována tvorba buněčných shluků, které měly v průměru až 2 cm. Je tedy možné, že *R. erythropolis* reagoval při kultivaci v kultivační tekutině *P. ostreatus* na nějaký, dosud neidentifikovaný, houbový metabolit působící obdobným stresem, jaký byl zaznamenán ve zmíněných pracech. Pro shlukování buněk se

ukázala jako klíčová vlastnost hydrofobicita buněčného povrchu *R. erythropolis*, která je způsobena přítomností alifatických řetězců mykolových kyselin, glykolipidů, mastných kyselin a polysacharidů (shrnutí v Sutcliffe 1998). Hydrofobicita buněčného povrchu umožnila asociaci buněk vzájemně a poté jejich adhezi ke kapénkám uhlovodíků, což umožnilo efektivní degradaci alkanů (Chang *et al.* 2009). *S. marcescens* v kultivační tekutině nerostla a tvorba shluků nebyla pozorována. V kontrolní kultivaci *S. marcescens* v MEG médiu byla zaznamenána dlouhá lag fáze. Z toho je zřejmé, že MEG médium není pro kultivaci *S. marcescens* vhodné.

Součástí studia interakcí houby *P. ostreatus* a *R. erythropolis* byla také proteomická studie. Za použití 1-DE byly separovány extracytoplazmatické a buněčné bílkoviny izolované ze vzorků získaných bioreaktoru či z tekuté kultury, které byly následně porovnány (Obr. 19 a 20). Cílem bylo zjistit, zda přítomnost bakterie v bioreaktoru ovlivňuje expresi houbových proteinů a růst bakterií pozmění spektrum extracelulárních houbových bílkovin v kultivační tekutině. Pomocí 1-DE se podařilo detekovat jak extracelulární houbové proteiny, tak i extracelulární bakteriální proteiny. Z výsledků je patrné, že houbové extracelulární proteiny jsou ve vzorcích dominantní a vlivem kultivace bakterií v této houbové kultivační tekutině dochází k mírným, převážně kvantitativním změnám. Jasně hodnocení těchto změn bylo ovšem problematické vzhledem k nejednotnému zastoupení houby a bakterie ve vzorku.

Srovnáním vzorků extracelulárních proteinů z bioreaktoru z kultivace *P. ostreatus* a vzorků ze směsné kultivace bylo zjištěno, že přítomnost bakterie ovlivnila expresi houbových proteinů jen velmi nepatrně (Obr. 19, číslo vzorku 7 a 8). V případě buněčných houbových proteinů nedošlo vlivem bakterií k žádné změně (Obr. 19, číslo vzorku 11 a 12). Naproti tomu byly pozorovány rozdíly v duplikátech extracelulárních proteinů z kultivace *P. ostreatus* v bioreaktoru, přestože byly dodrženy stejné kultivační podmínky (Obr. 19, číslo vzorku 6 a 7). Roli zde hraje pravděpodobně biologická variabilita houbových kultur, která byla v malé míře pozorována například i v proteomu *Aspergillus flavus* (Pechanová *et al.* 2013). V průběhu této práce bylo několikrát pozorováno, že charakteristiky růstu *P. ostreatus* se navzdory zachování stejných kultivačních podmínek lišily.

Separací buněčných proteinů *R. erythropolis* po kultivaci v kultivační tekutině a MEG médiu byl detekován protein či skupina proteinů o velikosti přibližně 70 kDa (Obr. 20, číslo vzorku 9 a 10), které jsou v kultivační tekutině exprimovány méně než v kontrolní kultivaci. Tento protein/proteiny by mohly představovat proteiny ovlivněné houbou a jejich funkce by mohla napovědět o mechanismu interakce obou organismů. Je však zapotřebí proteiny lépe separovat, např. pomocí 2-DE, a identifikovat pomocí hmotnostní spektrometrie.

2-DE byla v této práci použita pro separaci a podrobnější analýzu buněčných proteinů *P. ostreatus* a *R. erythropolis*. Pro tyto experimenty byly separovány vzorky z čistých kultur z kultivace na skleněných mikrokuličkách, jež umožnily získat vhodný vzorek pro následnou proteomickou analýzu, a na rozdíl od směsných kultur rostly bez problémů. Z uvedených výsledků je patrný rozdíl mezi proteomy obou mikroorganismů, zejména v rozdělení proteinů v prvním rozměru. Zatímco *P. ostreatus* má proteiny v celé škále pH použitého stripu (v našem případě pH 3 - 10), *R. erythropolis* má proteiny převážně v kyselé oblasti (Obr. 21-22).

Techniky 2-DE separace proteinů jsou v současné době používány ke studiu extracelulárních i vnitrobuněčných proteinů vláknitých hub (např. studie Chimi *et al.* 2013; Salvachúa *et al.* 2013; Vasina *et al.* 2013), protože na rozdíl od proteomických aplikací hmotnostní spektrometrie umožňují snazší komparativní analýzu proteomů a identifikaci markerových proteinů. *P. ostreatus* byl použit jako jeden z modelových organismů pro optimalizaci protokolu 2-DE separace houbových extracelulárních proteinů (Fragner *et al.* 2009).

Proteom *P. ostreatus* získaný v této práci z kultur ze skleněných mikrokuliček představuje jednu z mála dosud získaných proteinových map této houby. Dosud byly studovány převážně sekretomy této houby (Fragner *et al.* 2009; Salvachúa *et al.* 2013). 1-DE v kombinaci s hmotnostní spektrometrií byla použita na studium extracelulárních i intracelulárních proteinů *P. ostreatus* (Fernández-Fueyo *et al.* 2014) a příbuzné houby *Pleurotus tuber-regium* (Zhang *et al.* 2012). Rozdělení proteinů *P. ostreatus* po celé škále stripu (pH 3-10) odpovídá houbovým vnitrobuněčným proteomům z jiných prací (Pechanová *et al.* 2013, Chimi *et al.* 2013). Oproti tomu buněčné proteiny houby *T. hirsuta* byly separovány v rozmezí pH 3-6 (Vasina *et al.* 2013).

Skutečnost, že proteomy obou studovaných mikroorganismů z této práce se tolik liší v pH spektru, by mohla usnadnit identifikaci proteinů obou mikroorganismů ve směsné kultivaci. Izolace proteinů ze směsné kultury za stejných podmínek však nebyla provedena, protože se nepodařilo sjednotit nárůst mikroorganismů a poměr množství proteinů houby a bakterie tedy byl velmi rozdílný. Získané 2-DE proteomy nebyly proto dále hodnoceny.

V této práci bylo dokázáno, že *P. ostreatus* za studovaných podmínek v bioreaktoru ovlivňoval růst modelové bakterie *R. erythropolis*. Bakterie neovlivnila biodegradační potenciál houby, ale *R. erythropolis* na *P. ostreatus* reagoval změnou charakteristiky svého růstu, pravděpodobně v reakci na neidentifikovaný houbový metabolit. Dokončení 2-DE proteomové studie bakteriálních proteinů z kultivace na houbové kultivační tekutině a směsných kultur by mohlo ukázat na proteinové funkce hrající roli ve vzájemné interakci

organismů. Zároveň je třeba věnovat větší pozornost identifikaci houbových metabolitů s potenciálními antibakteriálními účinky.

7. SOUHRN

- V první části práce byl vybírán optimální kultivační systém pro směsnou kultivaci houby *P. ostreatus* a bakterie *R. erythropolis*. V případě kultivace na mikrokuličkách a v tekutém médiu byla provedena morfologická analýza kultur. V kultivaci na mikrokuličkách bylo zjištěno, že oba mikroorganismy jsou přítomny, bakterie jsou živé, ale stejně jako v tekutých kulturách v těchto kultivačních systémech nedochází ke vzniku smíšeného biofilmu. Ve „fixed-bed“ bioreaktoru bylo možné houbu úspěšně kultivovat v dostatečném množství v imobilizované podobě na pevném nosiči (PUF kostkách) a následně kontaminovat kulturu bakteriemi. Tento systém byl vhodný pro provedení biodegradčních experimentů a byl použit v další části práce.
- Při sledování růstu bakterií v houbovém bioreaktoru bylo zjištěno, že se množství bakterií v kultivační tekutině v bioreaktoru ihned po inokulaci začalo snižovat, až v tekutině prakticky žádné bakterie nebyly. Nezanedbatelné množství životaschopných bakteriálních buněk ($4 \cdot 10^5$ - $1,3 \cdot 10^6$ CFU/mL) bylo nalezeno v PUF nosiči. Za účelem vysvětlení růstu bakterií v kokultivaci bylo testováno, zda bakteriím nevadil houbový enzym lakáza, který byl přítomen v médiu ve velkém množství. Dále bylo zjišťováno, zda *P. ostreatus* svým růstem neovlivnil pH média nebo množství glukózy v médiu. Bylo zjištěno, lakáza neměla na růst bakterií vliv, při kultivaci *P. ostreatus* k poklesu pH média nedocházelo a zůstatek glukózy v médiu po kultivaci *P. ostreatus* byl 65 % původní koncentrace, tj. 10 g/l. Úbytek bakterií v tekutině v bioreaktoru byl pravděpodobně spojen s produkcí neznámého metabolitu houbou. Byl-li *R. erythropolis* kultivován na kultivační tekutině získané z kultur *P. ostreatus*, docházelo u bakterií k výrazné změně morfologie - shlukování buněk.
- Biodegradční experimenty ukázaly, že *P. ostreatus* účinně odbarvoval barvivo RBBR. U *R. erythropolis* biodegradace RBBR zjištěna nebyla. Efektivita dekolorizace byla u smíšené kultury i kultury *P. ostreatus* prakticky stejná (v obou průměrně 80 %). Bakterie se na dekolorizaci ve smíšené kultuře nepodílela.
- Majoritním enzymem v médiu produkovaným houbou *P. ostreatus* během kultivace v bioreaktoru byla lakáza. Největší množství lakázy bylo zjištěno v kokultivaci *P. ostreatus* a *R. erythropolis*, kam bylo přidáno RBBR. Mangan-dependentní peroxidáza a mangan-independentní peroxidáza byly v kulturách detekovány pouze v nepatrném množství.

- Z profilů extracytoplasmatických a buněčných bakteriálních a houbových proteinů z bioreaktorových kultur bylo zjištěno, že přítomnost *R. erythropolis* v bioreaktoru neměla vliv na expresi houbových buněčných proteinů. Pomocí 1-DE byl nalezen buněčný protein (či skupina proteinů) *R. erythropolis*, jejichž exprese je při kultivaci v kultivační tekutině po *P. ostreatus* negativně ovlivněna. Tento protein/proteiny by měly být dále identifikovány. V práci byla použita rovněž separace proteinů pomocí 2-DE, která poskytla bližší představu o podobě proteomů obou mikroorganismů.

8. SEZNAM LITERATURY

Abadulla E., Tzanov T., Costa S., Robra K.H., Cavaco-Paulo A., Gubitz G.M. (2000) Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. Appl. Environ. Microbiol. 66:3357-3362

Abu-Ruwaida A.S., Banat I.M., Haditirto S., Khamis A. (1991) Nutritional requirements and growth characteristics of a biosurfactant producing *Rhodococcus* bacterium. World J. Microb. Biot. 7:53-61

Alkhatib M.F., Alam M.Z., Muyibi S.A., Husain I.A.F. (2011) An isolated bacterial consortium for crude oil biodegradation. Afr. J. Biotechnol. 10:18763-118767

Amitai G., Adani R., Sod Moriah G., Rabinovitz I., Vincze A., Leader H., Chefetz B., Leibovitz-Persky L., Friesem D., Hadar Y. (1998) Oxidative biodegradation of phosphorothiolates by fungal laccase. FEBS Lett. 438:195-200

Andersson B.E., Welinder L., Olsson P.A., Olsson S., Henzysson T. (2000) Growth of inoculated white-rot fungi and their interactions with the bacterial community in soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, as measured by phospholipid fatty acids. Bioresour. Technol. 73:29-36

Ayed L., Harbi B., Cheref A., Bakhrouf A., Achour S. (2010a) Application of the mixture design to optimise the formulation of active consortia to decolorize azo-dye methyl red. Water Sci. Technol. 62:2837-2845

Ayed L., Khelifi E., Jannet H.B., Miladi H., Cheref A., Achour S., Bakhrouf A. (2010b) Response surface methodology for decolorization of azo dye Methyl Orange by bacterial consortium: produced enzymes and metabolites characterization. Chem. Eng. J. 165:200-208

Ayed L., Achour S., Bakhrouf A. (2011) Application of the mixture design to decolourise effluent textile wastewater using continuous stirred bed reactor. Water SA 37:21-26

Baldrian P. (2004) Increase of laccase activity during interspecific interactions of white-rot fungi. FEMS Microbiol. Ecol. 50:245-253

Bazanella G.C. dos Santos, Souza D.F. de., Castoldi R., Oliveira R. F., Bracht A., Peralta R. M. (2013) Production of laccase and manganese peroxidase by *Pleurotus pulmonarius* in solid-state cultures and application in dye decolorization. Folia Microbiol. 58: 641-647

Beaufort S., Da Silva T., Lafforgue C., Alfenore S. (2012) Fluorescent proteins as *in-vivo* and *in-situ* reporters to study the development of a *Saccharomyces cerevisiae* yeast biofilm and its invasion by the bacteria *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Ecol. 80:342-351

Beauvais A., Schmidt Ch., Guadagnini S., Roux P., Perret E., Henry Ch., Paris S., Mallet A., Prévost M.Ch., Latgé J.P. (2007) An extracellular matrix glues together the aerial grown hyphae of *Aspergillus fumigatus*. Cell. Microbiol. 9:1588-1600

Bezalel L., Hadar Y., Cerniglia C.E. (1995) Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Appl. Environ. Microbiol. 62:292-295

Bhatt M., Patel M., Rawal B., Novotný Č., Molitoris H.P., Šašek V. (2000) Biological decolorization of the synthetic dye RBBR in contaminated soil. World J. Microbiol. Biotechnol. 16:195-198

Bjellqvist B., Sanchez J.C., Pasquali C., Ravier F., Paquet N., Frutiger S., Hughes G.J., Hochstrasser D. (1993) Micropreparative two-dimensional electrophoresis allowing the separation of samples containing milligram amounts of proteins. Electrophoresis 14:1375-1378

Bonchan S., Britz M.L., Stanley G.A. (2000) Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. Appl. Environ. Microbiol. 66:1007-1019

Borchert M., Libra J.A. (2001) Decolorization of reactive dyes by the white rot fungus *Trametes versicolor* in sequencing batch reactors. Biotechnol. Bioeng. 75:313-321

Burmolle M., Webb J.S., Rao D., Hansen L.H., Sorensen S.J., Kjelleberg S. (2006) Enhanced biofilm formation and increased resistance towards microbial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 72:3916-3923

Cajthaml T., Křesinová Z., Svobodová K., Möder M. (2009) Biodegradation of endocrine-disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi. Chemosphere 75:745-750

Cao J., Zhang H.-J., Xu Ch.-P. (2014) Culture characterization of exopolysaccharides with antioxidant activity produced by *Pycnoporus sanguineus* in stirred-tank and airlift reactors. J. Taiwan. Inst. Chem. Eng. 45:2075-2080

Carvalho C.C.C.R. de, Cruz A.R.L. da, Pons M.N., Pinheiro H.M., Cabral J.M.S., Fonseca M.M.R. da, Fernandes P., Ferreira B.S. (2004) *Mycobacterium* sp., *Rhodococcus erythropolis* and *Pseudomonas putida* behaviour in the presence of organic solvents. Microsc. Res. Tech. 64:215-222

Carvalho C.C.C.R. de, Parreno-Marchante B., Neumann G., Fonseca M.M.R. da, Hepieper H.J. (2005) Adaptation of *Rhodococcus erythropolis* DCL14 to growth on *n*-alkanes, alcohols and terpenes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 67:383-388

Carvalho C.C.C.R. de, Fatal V., Alves S.S., Fonseca M.M.R. da (2007) Adaptation of *Rhodococcus erythropolis* cells to high concentrations of toluene. Appl. Microbiol. Biotechnol. 76:1423-1430

Chang J.-S., Lin Ch.-Y. (2001) Decolorization kinetics of a recombinant *Escherichia coli* strain harboring azo-dye-decolorizing determinants from *Rhodococcus* sp. Biotechnol. Lett. 23:631-636

- Chang Y.I., Su C.Y. (2003) Flocculation behavior of *Sphingobium chlorophenolicum* in degrading pentachlorophenol at different life stages. *Biotechnol. Bioeng.* 82:843-850
- Chang W.-N., Liu C.-W., Liu H.-S. (2009) Hydrophobic cell surface and bioflocculation behavior of *Rhodococcus erythropolis*. *Process Biochem.* 44:955-962
- Chen L.Z., Li Y.L., Yu Y.L. (2014a) Soil bacterial and fungal community successions under the stress of chlorpyrifos application and molecular characterization of chlorpyrifos-degrading isolates using ERIC-PCR. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 15:322-332
- Chen J.H., He F., Zhang X.H., Sun X., Zheng J.F., Zheng J.W. (2014b): Heavy metal pollution decreases microbial abundance, diversity and activity within particle-size fractions of a paddy soil. *FEMS Microbiology Ecology* 87: 164-181.
- Chimi M.A., Droese S., Wittig I., Heide H., Steger M., Werner A., Hamann A., Osiewacz H.D., Brandt U. (2013) Age-related changes in the mitochondrial proteome of the fungus *Podospora anserina* analyzed by 2D-DIGE and LC-MS/MS. *J. Proteomics* 91:358-374
- Cho Y.-S., Kim J.-S., Crowley D.E., Cho B.-G. (2003) Growth promotion of the edible fungus *Pleurotus ostreatus* by fluorescent pseudomonads. *FEMS Microbiol. Lett.* 218:271-276
- Cohen R., Persky L., Hadar Y. (2002) Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Appl. Microbiol. Technol.* 58:582-594
- Coletto M., Labollita A. (1997) Antibiotic activity in basidiomycetes. XI. Antibacterial and antifungal activity of 25 new strains. *Allionia* 35:95-101
- Coneely A., Smyth W.F., McMullan G. (2002) Study of the white-rot fungal degradation of selected phthalocyanine dyes by capillary electrophoresis and liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* 451:259-270
- Couto S.R., Rosales E., Sanromán M.A. (2006) Decolourization of synthetic dyes by *Trametes hirsuta* in expanded-bed reactors. *Chemosphere* 62:1558-1563
- Crowe J.D., Olsson S. (2001) Induction of laccase activity in *Rhizoctonia solani* by antagonistic *Pseudomonas fluorescens* strains and a range of chemical treatments. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2088-2094
- Cruz-Morato C., Ferrando-Climent L., Rodriguez-Mozaz S., Barcelo D., Marco-Urrea E., Vicent T., Sarra M. (2013) Degradation of pharmaceuticals in non-sterile urban wastewater by *Trametes versicolor* in a fluidized bed bioreactor. *Water res.* 47:5200-5210
- Cruz-Perera C.I. de la, Ren D., Blanchet M., Dendooven L., Marsch R., Sorensen S.J., Burmolle M. (2013) The ability of soil bacteria to receive the conjugative IncP1 plasmid, pKJK10, is different in a mixed community compared to single strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 338, 95-100
- Cyplik P., Schmidt M., Szulc A., Marecik R., Lisiecki P., Heipieper H.J., Owsianiak M., Vainshtein M., Chrzanowski L. (2011) Relative quantitative PCR to assess bacterial

community dynamics during biodegradation of diesel and biodiesel fuels under various aeration conditions. *Bioresour. Technol.* 102:4347-4352

Čejková A., Masák J., Jirků V., Veselý M., Pátek M., Nešvera J. (2005) Potential of *Rhodococcus erythropolis* as a bioremediation organism. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21:317-321

Čvančarová M., Křesinová Z., Filipová A., Covino S., Cajthaml T. (2012) Biodegradation of PCBs by ligninolytic fungi and characterization of the degradation products. *Chemosphere* 88:1317-1323

Daffonchio D., Cherif A., Brusetti L., Rizzi A., Mora D., Boudabous A., Borin. S. (2003) Nature of polymorphisms in 16S-23S rRNA gene intergenic transcribed spacer fingerprinting of *Bacillus* and related genera. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5128–5137

Demanou J., Sharma S., Dörfler U., Schroll R., Pritsch K., Njine T., Bausenwein U., Monkiedje A., Munch J.C., Schloter M. (2006) Structural and functional diversity of soil microbial communities as a result of combined applications of copper and mefenoxam. *Soil Biol. Biochem.* 38:2381-2389

Denome, S.A., Olson E.S., Young, K.D. (1993) Identification and cloning of genes involved in specific desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus* sp. strain IGTS8. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2837-2843

Denome, S.A., Oldfield, C., Nash, L.J., Young, K.D. (1994) Characterization of the desulfurization genes from *Rhodococcus* sp. strain IGTS8. *J. Bacteriol.* 176:6707-6716

Donlan R.M., Costerton J.W. (2002) Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15:167-193

Dyballa N., Metzger S. (2009) Fast and sensitive Colloidal Coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels. *J. Vis. Exp.* 30:1431-1434

Edens W.A., Goins T.Q., Dooley D., Henson J.M. (1999) Purification and characterization of secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Appl Environ Microbiol* 65:3071-3074

El-Elimat T., Raja H.A., Figueroa M., Falkinham J.O., Oberlies N.H. (2014) Isochromenones, isobenzofuranone, and tetrahydronaphthalenes produced by *Paraphoma radicina*, a fungus isolated from a freshwater habitat. *Phytochemistry* 104: 114-120

Faraco V., Piscitelli A., Sannia G., Giardina P. (2007) Identification of a new member of the dye-decolorizing peroxidase family from *Pleurotus ostreatus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23:889-893

Field J.A., Jong E. de, Feijoo-Costa G., Bont J.A.M. de (1993) Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends Biotechnol.* 11:41-48

Finnerty W.M. (1994) Biosurfactants in environmental biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 5:291-295

- Fragner D., Zomorodi M., Kues U., Majcherczyk A. (2009) Optimized protocol for 2-DE of extracellular proteins from higher basidiomycetes inhabiting lignocellulose. *Electrophoresis* 30:2431-2441
- Gadd G.M. (1999) Fungal production of citric and oxalic acid: importance in metal speciation, physiology and biogeochemical processes. *Adv. Microb. Physiol.* 41:47-92
- Galloway W.R., Hodgkinson J.T., Bowden S.D., Welch M., Spring D.R. (2011) Quorum sensing in Gram-negative bacteria: small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways. *Chem. Rev.* 111:28–67
- Gao D., Zeng Y., Wen X., Qian Y. (2008) Competition strategies for the incubation of white rot fungi under non-sterile conditions. *Process Biochem.* 43:937-944
- Glenn J.K., Gold M.H. (1983) Decolorization of several polymeric dyes by the function of the extracellular Mn peroxidase from *Phanaerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys* 251:688-696
- Glenn J.K., Akileswara L., Gold M.H. (1986) Mn(II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn peroxidase from *Phanaerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys* 251:688-696
- Gogavekar S.S., Rokade S.A., Ranveer R.C., Ghosh J.S., Kalyani D.C., Sahoo A.K. (2014) Important nutritional constituents, flavour components, antioxidant and antibacterial properties of *Pleurotus sajor-caju*. *J. Food Sci. Tech. Mys.* 51:1483-1491
- González N., Simarro R., Molina M.C., Bautista L.F., Delgado L., Villa J.A. (2011) Effect of surfactants on PAH biodegradation by a bacterial consortium and on the dynamics of the bacterial community during the proces. *Bioresour. Technol.* 102:9438-9446
- Goodfellow M., Alderson, G. (1977) The actinomycete-genus *Rhodococcus*: a home for the „rhodochrous“ complex. *J. Gen. Microbiol.* 100:99-122
- Goodfellow M. (1989) Genus *Rhodococcus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 4* ed. Williams, S.T., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. pp. 2362-2371. Baltimore: Williams and Wilkins
- Gou M., Qu Y., Zhou J., Ma F., Liang T. (2009) Azo dye decolorization by a new fungal isolate, *Penicillium* sp. QQ and fungal-bacterial cocultures. *J. Hazard. Mater.* 170:314-319
- Gros M., Cruz-Morato C., Marco-Urrea E., Longree P., Singer H., Sarra M., Hollender J., Vicent T., Rodriguez-Mozaz S., Barcelo D. (2014) Biodegradation of the X-ray contrast agent iopromide and the fluoroquinolone antibiotic ofloxacin by the white rot fungus *Trametes versicolor* in hospital wastewaters and identification of degradation products. *Water Res.* 60:228-241
- Gulis V., Suberkropp K., Rosemond A.D. (2008) Comparison of fungal activities on wood and leaf litter in unaltered and nutrient-enriched headwater streams. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:1094-1101

- Hai F.H., Yamamoto K., Nakajima F., Fukushi K., Nghiem L.D., Price W.E., Jin B. (2013) Degradation of azo dye acid orange 7 in a membrane bioreactor by pellets and attached growth of *Coriolus versicolor*. *Biores. Technol.* 141: 29-34.
- Halecký M., Paca J., Stiborová M., Kozliak E.I., Maslanova I. (2013) Pollutant interactions during the biodegradation of phenolic mixtures with either 2- or 3-mononitrophenol in a continuously operated packed bed reactor. *J. Environ. Sci. Health., Part A* 48:1609-1618
- Hammel K.E. (1992) Oxidation of aromatic pollutants by lignin degrading fungi and their extracellular peroxidases. *Metal Ions Biol. Syst.* 28:41-60
- Hammel K.E., Gai W.Z., Green B., Moen M.A. (1992) Oxidative degradation of phenanthrene by the ligninolytic fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1832-1838
- Hannan S., Ready D., Jasni A.S., Rogers M., Pratten J., Roberts A.P. (2010) Transfer of antibiotic resistance by transformation with eDNA within oral biofilms. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 59:345-349
- Hansen S.K., Rainey P.B., Haagensen J.A.J., Molin S. (2007) Evolution of a species interactions in a biofilm community. *Nature* 445:533-536
- Harazono K., Watanabe Y., Nakamura K. (2003) Decolorization of azo dye by the white-rot fungi basidiomycete *Phanaerochaete sordida* and by its manganese peroxidase. *J. Biosci. Bioeng.* 95:455-459
- Harding M.W., Marques L.L.R., Howard R.J., Olson M.E. (2009) Can filamentous fungi form biofilms? *Trends Microbiol.* 17:475-480.
- Heinfling A., Martinez M.J., Martinez A.T., Bergbauer M., Szewzyk U. (1998) Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2788-2793
- Heinfling-Weidtmann A., Reemtsma T., Storm T., Szewzyk U. (2001) Sulfophthalimide as major metabolite formed from sulfonated phthalocyanine dyes by the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*. *FEMS Microbiol. Lett.* 203:179-183
- Heiss G.S., Gowan B., Dabbs E.R. (1992) Cloning of DNA from a *Rhodococcus* strain conferring the ability to decolorize sulfonated azo dyes. *FEMS Microbiol. Lett.* 99:221-226
- Hiscox J., Baldrian P., Rogers H.J., Boddy L. (2010) Changes in oxidative enzyme activity during interspecific mycelial interactions involving the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Fungal. Genet. Biol.* 47:562-571
- Ho K.L., Chen Y.Y., Lee D.J. (2010) Functional consortia for creosol-degrading activated sludges: toxicity-to-extinction approach. *Bioresour. Technol.* 23:9000-9005

Hulton C.S.J., Higgins C.F., Sharp P.M. (1991) ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.* 4:825-834

Imamura Y., Chandra J., Mukherjee P.K., Lattif A.A., Szczotka-Flynn L.B., Pearlman E., Lass J.H., O'Donnell K., Ghannoum M.A. (2008) *Fusarium* and *Candida albicans* on soft contact lenses: model development, influence of lens type and susceptibility to lens care solutions. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 52:171-182

Jass J. *et al.* (2002) Microbes and enzymes in biofilms. In *Enzymes in the environment. Activity, Ecology and Applications* (Burns R.G. and Dick R.D., eds), pp. 307-326, Marcel Dekker

Jho E.H., Shin D., Turner S.J., Singhal N. (2014) Effect of fenton reagent shock and recovery periods on anaerobic microbial community structure and degradation of chlorinated aliphatics. *Biodegradation* 25: 253-264.

Jin D.F., Hu H., Liu D.F., Ding H.T., Jia X.M., Zhao Y.H. (2012) Optimization of a bacterial consortium for nitrobenzene degradation. *Water Sci. Technol.* 65:795-801

Jones J.B.G. (1994) Fungal adhesion. *Mycol. Res.* 98:961-981

Kadam A.A., Telke A.A., Jagtap A.S., Govindwar S.P. (2011) Decolorization of absorbed textile dyes by developer consortium of *Pseudomonas* sp SUK1 and *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146 under solid state fermentation. *J. Haz. Mat.* 189:486-494

Kasinath A., Novotný Č., Svobodová K., Patel K.C., Šašek V. (2003) Decolorization of synthetic dyes by *Irpex lacteus* in liquid cultures and packed-bed bioreactor. *Enzyme Microbiol. Technol.* 32:167-173

Kausar H., Sariah M., Saud H.M., Alam H.Z., Ismail M.R. (2010) Development of compatible lignocellulolytic fungal consortium for rapid composting of rice straw. *Int. Biodeter. Biodegr.* 64:594-600

Kimura Y., Asada Y., Kuwahara M. (1990) Screening of basidiomycetes for lignin peroxidase genes using a DNA probe. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32:436-442

Klayman B.J., Volden P.A., Stewart P.S., Camper A.K. (2009) *Escherichia coli* O157:H7 requires colonizing partner to adhere and persist in a capillary flow cell. *Environ. Sci. Technol.* 43:2105-2111

Kolenbrander P.E., Palmer R.J., Periasamy S., Jakubovics N.S. (2010) Oral multispecies biofilm development and the key role of cell–cell distance. *Nat. Rev. Microbiol.* 8:471-480

Krishnan A., Stathis P., Permuth S., Tokes L., Feldman D. (1993) An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 132:2279-2286

Kubátová A., Erbanová P., Eichlerová I., Homolka L., Nerud F., Šašek V. (2001) PCB congener selective degradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in contaminated soil. *Chemosphere* 43:207-215

- Kurane R., Tomizuka N. (1992) Towards new biomaterial produced by microorganism – bioflocculant and bioabsorbent. *Nippon Kagaku Kaishi* 5:453-463
- Kurane R., Hatamochi K., Kakuno T. *et al.* (1994) Purification and characterization of lipid bioflocculant produced by *Rhodococcus erythropolis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58:1977-1982
- Kurane R., Hatamochi K., Kakuno T., Kiyohara H., Tajima T., Taniguchi Y. (1995) Chemical structure of lipid bioflocculant produced by *Rhodococcus erythropolis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59:1652-1656
- Kwack S.J., Kwon O., Kim H.S., Kim S.S., Kim S.H., Sohn K.H., Lee D.R., Park C.H., Jeung E.B., An B.S., Park K.L. (2011) Comparative evaluation of alkylphenolic compounds on estrogenic activity in vitro and in vivo. *J. Toxicol. Environ. Health A* 65:419-431
- Kwak H.I., Bae M.O., Lee M.H., Lee Y.S., Lee B.J., Kang K.S., Chae C.H., Sung H.J., Shin J.S., Kim J.H., Mar W.C., Sheen Y.Y., Cho M.H. (2001) Effects of nonylphenol, bisphenol A, and their mixture on the viviparous swordtail fish (*Xiphophorus helleri*). *Environ. Toxicol. Chem.* 20:787-795
- Larcher S., Yargeau V. (2011) Biodegradation of sulfamethoxazole by individual and mixed bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91:211-218
- Larkin M.J., Kulakov L.A., Allen C.C. (2006) Biodegradation by members of the genus *Rhodococcus*: biochemistry, physiology, and genetic adaptation. *Adv. Appl. Microbiol.* 59:1-29
- Lechevalier H.A. (1989) Nocardioform actinomycetes. *In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 4* ed. Williams, S.T., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. pp. 2348-2350. Baltimore: Williams and Wilkins
- Leonowicz A., Cho N.S., Luterek J., Wilkolazka A., Wojtas-Wasilewska D., Matuszewska A., Hofrichter M., Wesenberg D., Rogalski J. (2001) Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J. Basic Microbiol.* 41:185-227
- Li G., Peng L., Ding Z., Liu Y., Gu Z., Zhang L., Shi G. (2014) Decolorization and biodegradation of triphenylmethane dyes by a novel *Rhodococcus qingshengii* JB301 isolated from sawdust. *Ann. Microbiol.* 64:1575-1586
- Li X.Q., de Toledo R.A., Wang S.P., Shim H. (2015) Removal of carbamazepine and naproxen by immobilized *Phanerochaete chrysosporium* under non-sterile condition. *New Biotechnol.* 32: 282-289
- Lopez C., Mielgo I., Moreira M.T., Feijoo G., Lema J.M. (2002) Enzymatic membrane reactors for biodegradation of recalcitrant compounds. Application to dye decolourisation. *J. Biotechnol.* 99:249-257

Lu X.M., Ma L.H., Wang Z.H., Huang M.S. (2010) Application of polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis to resolve taxonomic diversity in white rot fungus reactors. *Environ. Eng. Sci.* 27:493-503.

Martinez A.T. (2002) *Enzyme Microb. Technol.* 30:425-444

Martínková L., Uhnáková B., Pátek M., Nešvera J., Křen V. (2009) Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environ. Int.* 35:162-177

Masaphy S., Henis Y., Levanon D. (1996) Manganese-enhanced biotransformation of atrazine by the white rot fungus *Pleurotus pulmonarium* and its correlation with oxidation activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3587-3593

McMullan G., Meehan C., Conneely A., Kirby N., Robinson T., Nigam P., Banat I.M., Marchant R., Smyth W.F. (2001) Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56:81-87

Mielgo I., Moreira M.T., Feijoo G., Lema J.M. (2002) Biodegradation of a polymeric dye in a pulsed bed bioreactor by immobilised *Phanerochaete chrysosporium* 36:1896-1901

Mikesková H., Novotný Č., Svobodová K. (2012) Interspecific interactions in mixed microbial cultures in a biodegradation perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95:861-870

Mohorcic M., Friedrich J., Pavko A. (2004) Decolorization of the diazo dye Reactive Black 5 by immobilised *Bjerkandera adusta* in a stirred tank bioreactor. *Acta Chimica Slovenia* 51:619-629

Moilanen U., Winquist E., Mattila T., Hatakka A., Eerikäinen T. (2015) *Bioprocess Biosyst. Eng.* 38:57-68

Mowat E., Butcher J., Lang S., Williams C., Ramage G. (2007) Development of a simple model for studying the effects of antifungal agents on multicellular communities of *Aspergillus fumigatus*. *J. Med. Microbiol.* 56:1205-1212

Mowat E., Williams C., Jones B., Mchclery S., Ramage G. (2008) The characteristics of *Aspergillus fumigatus* mycetoma development: is this a biofilm? *Med. Mycol.* 47:S120-S126

Muyzer G., de Waal E.C., Uitterlinden A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis by polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S ribosomal RNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:659-700

Nascimento C., Magalhaes D.P., Brandao M., Santos A.B., Chame M., Baptista D., Nishikawa M., da Silva M. (2011) Degradation and detoxification of three textile azo dyes by mixed fungal cultures from semi-arid region of Brazilian northeast. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 54:621-628

Neu T.R. (1996) Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol. Rev.* 60:151-166

- Novotný Č., Dias N., Kapanen A., Malachová K., Vándrovcová M., Itävaara M., Lima N. (2006) Comparative use of bacterial, algal and protozoan tests to study toxicity of azo- and anthraquinone dyes. *Chemosphere* 63:1436-1442
- Novotný Č., Svobodová K., Benada O., Kofroňová O., Heissenberger A., Fuchs W. (2011) Potential of combined fungal and bacterial treatment for color removal in textile wastewater. *Bioresour. Technol.* 102:879-888
- Olivieri G., Russo M.E., Giardina P., Marzocchella A., Sannia G., Salatino P. (2012) Strategies for dephenolization of raw olive mill wastewater by means of *Pleurotus ostreatus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39:719-729
- Olson M.E., Ceri H., Morck D.W., Buret A.G., Read R.R. (2002) Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can. J. Vet. Res.*
- Pastar I., Nusbaum A.G., Gil J., Patel S.B., Chen J., Valdes J., Stojadinovic O., Plano L.R., Tomic-Canic M., Davis S.C. (2013) Interactions of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* USA300 and *Pseudomonas aeruginosa* in polymicrobial wound infection. *PLoS ONE* 8, e56846 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0056846>
- Pasti-Grigsby M.B., Paszczynski A., Goszczynski S., Crawford D.L., Crawford R.L. (1992) Influence of aromatic substitution pattern on azo dye degradability by *Streptomyces* spp. and *Phanaerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3605-3613
- Patel V., Jain S., Madamwar D. (2012) Naphtalene degradation by bacterial consortium (DV-AL) developed from Alang-Sosiya ship breaking yard, Gujarat, India. *Bioresour. Technol.* 107:122-130
- Pechanová O., Pechan T., Rodriguez J.M., Williams W.P., Brown A.E. (2013) A two-dimensional proteome map of the aflatoxigenic fungus *Aspergillus flavus*. *Proteomics* 13:1513-1518
- Peng L., Yang C., Zeng G., Wang L., Dai C., Long Z., Liu H., Zhong Y. (2014) Characterization and application of bioflocculant prepared by *Rhodococcus erythropolis* using sludge and livestock wastewater as cheap culture media. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98:6847-6858
- Pesciaroli L., Petruccioli M., Fedi S., Firrincieli A., Federici F., D'Annibale A. (2013) Characterization of *Pleurotus ostreatus* biofilms by using the Calgary Biofilm device. *Appl. Environ. Microbiol.* 79: 6083-6092
- Peters B.M., Jabra-Rizk M.A., Scheper M.A., Leid J.G., Costerton J.W., Shirtliff M.E. (2010) Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus*-*Candida albicans* dual-species biofilms. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 59:493-503
- Petráčková D., Buriánková K., Tesařová E., Bobková Š., Bezoušková S., Benada O., Kofroňová O., Janeček J., Halada P., Weiser J. (2013) Surface hydrophobicity and roughness influences the morphology and biochemistry of streptomycetes during attached growth and differentiation. *FEMS Microbiol. Lett.* 342:147-156

- Pezzella C., Russo M.E., Marzochella A., Salatino P., Sannia G. (2014) Immobilization of a *Pleurotus ostreatus* laccase mixture on perlite and its application to dye decolourisation. *Biomed Res. Int.* 2014:308613
- Plačková M., Svobodová K., Cajthaml T. (2012): Laccase activity profiling and gene expression in PCBs degrading cultures of *Trametes versicolor*. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 71:22-28
- Phugare S.S., Kalyani D.C., Patil A.V., Jadhav J.P. (2011) Textile dye degradation by bacterial consortium and subsequent toxicological analysis of dye and dye metabolites using cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress studies. *J. Haz. Mat.* 186:713-723
- Přenosilová L., Křesinová Z., Slavíková Amemori A., Cajthaml T., Svobodová K. (2013) Transcriptional response of lignin-degrading enzymes to 17 α -ethinylestradiol in two white rots. *Microbial Biotech.* 6:300–306
- Radtke C., Cook W.S., Anderson A. (1994) Factors affecting antagonism of the growth of *Phanerochaete chrysosporium* by bacteria isolated from soils. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41:274-280
- Reddy C.A. (1995) The potential for the white-rot fungi in the treatments of pollutants. *Curr Opin Biotechnol* 6:320-328
- Reemtsma T., Jakobs J. (2001) Concerted chemical and microbial degradation of sulfophthalimides formed from sulfophthalocyanine dyes by white-rot fungi. *Environ. Sci. Technol.* 35:4655-4659
- Riedel K., Hentzer M., Geisenberger O., Huber B., Steidle A., Wu H., Hoiby N., Givskov M., Molin S., Eberl L. (2001) N-acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiol.* 147:3249-3262
- Roberts J.N., Singh R., Grigg J.C., Murphy M.E.P., Bugg T.D.H., Eltis L.D. (2011) Characterization of dye-decolorizing peroxidases from *Rhodococcus jostii* RHA1. *Biochemistry* 50:5108-5119
- Rose J., Holbech H., Lindholst C., Norum U., Povlsen A., Korsgaard B., Bjerregaard P. (2002) Vitellogenin induction by 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 131:531-539
- Rousk J., Brookes P.C., Bååth E. (2009) Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:1589-1596
- Ruiz-Duenas F.J., Camarero S., Perez-Boada M., Martinez M.J., Martinez A.T. (2001) A new versatile peroxidase from *Pleurotus*. *Biochem. Soc. Trans.* 29:116-122
- Saito Y., Fujii R., Nakagawa K.I., Kuramitsu H.K., Okuda K., Ishihara K. (2008) Stimulation of *Fusobacterium nucleatum* biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol. Immunol.* 23:1-6

Salehizadeh H., Shojaosadati S.A. (2001) Extracellular biopolymeric flocculants - Recent trends and biotechnological importance. *Biotech. Adv.* 19:371-385

Salvachua D., Martinez A.T., Tien M., Lopez-Lucendo M.F., Garcia F., de los Rios V., Martinez M.J., Prieto A. (2013) Differential proteomic analysis of the secretome of *Irpex lacteus* and other white-rot fungi during wheat straw pretreatment. *Biotechnol. Biofuels* 6:115

Salvachua D., Prieto A., Martinez A.T., Martinez M.J. (2013) Characterization of a novel dye-decolorizing peroxidase (DyP)-type enzyme from *Irpex lacteus* and its application in enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:4316-4324

Sannia P., Limongi P., Cocca E., Buonocore F., Nitti G., Giardina P. (1991) Purification and characterization of veratryl alcohol oxidase enzyme from the lignin degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1073:114-119

Sasikala C., Jiwal S., Rout P., Ramya M. (2012) Biodegradation of chlorpyrifos by bacterial consortium isolated from agriculture soil. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28:1301-1308

Shin K.S., Oh I.K., Kim C.J. (1997) Production and purification of Remazol brilliant blue R decolorizing peroxidase from the culture filtrate of *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1744-1748

Soto A.M., Justicia H., Wray J.W., Sonneschein C. (1991) P-nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from modified polystyrene. *Environ. Health Persp.* 92:167-173

Stach J.E.M., Burns R.G. (2002) Enrichment versus biofilm culture: a functional and phylogenetic comparison of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading microbial communities. *Environ. Microbiol.* 4:169-182

Sutcliffe I.C. (1998) Cell envelope composition and organisation in the genus *Rhodococcus*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 74:49-58

Šušla M., Svobodová K. (2008): Effect of various synthetic dyes on the production of manganese peroxidase isoenzymes by immobilized *Irpex lacteus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 225-230

Terada A., Hibiya K., Nagai J., Tsuneda S., Hirata A. (2003) Nitrogen removal characteristics and biofilm analysis of a membrane-aerated biofilm reactor applicable to high-strength nitrogenous wastewater treatment. *J. Biosci. Bioeng.* 95:170-178

Tomasz A. (1965) Control of the competent state in *Pneumococcus* by a hormone-like cell product: an example for a new type of regulatory mechanism in bacteria. *Nature.* 208:155–159

Tomioka N., Uchiyama H., Yagi O. (1994) Cesium accumulation and growth characteristics of *Rhodococcus erythropolis* CS98 and *Rhodococcus* sp. strain CS402. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2227-2231

- Tornberg K., Bååth E., Olsson S. (2003) Fungal growth and effects of different wood decomposing fungi on the indigenous bacterial community of polluted and unpolluted soils. *Biol. Fertil. Soils* 37:190-197
- Trzesicka-Mlynarz D., Ward O.P. (1995) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a mixed culture and its component pure cultures, obtained from PAH-contaminated soil. *Can. J. Microbiol.* 41:470-476
- Vasina D.V., Loginov D.S., Koroleva O.V. (2013) Comparative proteomic study of the basidiomycete *Trametes hirsuta* grown on different substrates. *Biochemistry-Moscow* 78: 477-484
- Villena G.K., Gutierrez-Correa M. (2003) Production of cellulase by *Aspergillus niger* biofilms developed on polyester cloth. *Lett. Appl. Microbiol.* 43:262-268
- Vyas B.R.M., Molitoris H.P. (1995) Involvement of an extracellular H₂O₂-dependent ligninolytic activity of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolourisation of Remazol Brilliant Blue R. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3919-2927
- Walters M.C., Roe F., Bugnicourt A., Franklin M.J., Stewart P.S. (2003) Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:317-323
- Wang W., Yan L., Cui Z., Gao Y., Wang Y., Jing R. (2011) Characterization of a microbial consortium capable of degrading lignocellulose. *Bioresour. Technol.* 102:9321-9324
- Wang C.F., Tian Y. (2015) Reproductive endocrine-disrupting effects of triclosan: Population exposure, present evidence and potential mechanisms. *Environ. Pollut.* 206:195-201
- Warhust A.V., Fewson C.A. (1994) Biotransformation catalysed by the genus *Rhodococcus*. *Critic. Rev. Biochem.* 14:29-73
- White N.A., Boddy L. (1992) Extracellular enzyme localization during interspecific fungal interactions. *FEMS Microbiol. Lett.* 98:75-79
- White C.R., Jobling S., Hoare S.A., Sumpter J.P., Parker M.G. (1994) Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* 135:175-182
- Williams M.A., Taylor E.B., Mula H.P. (2010) Metaproteomic characterization of a soil microbial community following carbon amendment. *Soil Biol. Biochem.* 42:1148-1156
- Wong Y.X., Yu J. (1999) Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Water Res.* 33:3512-3520
- Yadav M., Singh S.K., Yadava S., Yadav K.D.S. (2015) Ligninolytic enzymes for water depollution, coal breakdown, and paper industry. *Environmental Chemistry for a Sustainable World.* 5:359-386
- Yang G., Yan L., Qing K. (2004) Effect of environment factors on dye decolorization

by *P. sordida* ATCC90872 in a aerated reactor. *Process Biochem.* 39:1401-1405

Yuan W., Chai T.J., Miao Z.M. (2010) ERIC-PCR identification of the spread of airborne *Escherichia coli* in pig houses. *Sci. Total. Environ.* 408:1446-1450

Zhang F., Knapp J.S., Tapley K.N. (1999) Development of bioreactor systems for decolorization of Orange II using white rot fungus. *Enzyme Microbiol. Technol.* 24:48-53

Zhang B.B., Chen L., Cheung P.C.K. (2012) Proteomic insights into the stimulatory effect of Tween 80 on mycelial growth and exopolysaccharide production of an edible mushroom *Pleurotus tuber-regium*. *Biotechnol. Lett.* 34:1863-1867