

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta,  
Ústav pro životní prostředí**

Obor: Ochrana životního prostředí

Téma bakalářské práce:

Interakce mezi houbovými a bakteriálními organismy se  
zaměřením na tvorbu biofilmů na pevných nosičích

Interactions between fungal and bacterial organisms involved  
in formation of biofilms on solid carriers



Vypracovala: Martina Svobodová

Školitel: RNDr. Čeněk Novotný CSc.

srpen 2011

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a použila jsem přitom uvedenou literaturu.

V Praze dne 24. 6. 2011

.....  
Martina Svobodová

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Čeňkovi Novotnému CSc. za pomoc při vypracování této bakalářské práce a poskytnutí rad. Dále chci poděkovat rodičům za podporu při studiu.

# Osnova

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>4</b>
<b>2. BIOFILM.....</b>	<b>6</b>
2.1. VÝVOJ BIOFILMU .....	8
2.1.1. POČÁTEČNÍ PŘICHYCENÍ.....	9
2.1.2. VÝVOJ BIOFILMU .....	9
2.1.3. MATURACE (ZRÁNÍ) BIOFILMU .....	10
2.1.4. ODDĚLENÍ OD POVRCHU A NÁVRAT DO PLANKTONNÍ FORMY ŽIVOTA.....	10
2.2. KOMUNIKACE V BIOFILMU .....	10
2.3. STRUKTURA .....	11
2.4. VÝZNAM BIOFILMŮ.....	13
<b>3. BAKTERIÁLNÍ BIOFILM .....</b>	<b>14</b>
3.1. VÝVOJ BAKTERIÁLNÍHO BIOFILMU .....	15
<b>4. HOUBOVÝ BIOFILM .....</b>	<b>16</b>
4.1. VZNIK HOUBOVÉHO BIOFILMU .....	17
4.2. VLÁKNITÉ HOUBY .....	19
4.3. MYKORHIZNÍ HOUBY.....	19
4.4. LIGNINOLYTICKÉ HOUBY.....	20
<b>5. SMÍŠENÉ BIOFILMY.....</b>	<b>21</b>
5.1. DRUHY SMÍŠENÝCH BIOFILMŮ .....	21
5.1.1. BIOFILMY OBSAHUJÍCÍ AKTIVOVANÝ KAL.....	21
5.1.2. BIOFILMY OBSAHUJÍCÍ HOUBY A BAKTERIE .....	22
5.2. INTERAKCE VE SMÍŠENÝCH BIOFILMECH OBSAHUJÍCÍCH HOUBY A BAKTERIE .....	24
5.2.1. KOMPETICE.....	25
5.2.2. MUTUALISMUS (SYMBIÓZA) .....	27
5.2.3. KOOPERACE .....	29
<b>6. ZÁVĚR.....</b>	<b>29</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>31</b>

# Úvod

Do našeho životního prostředí vypouštíme velké množství chemických látek, které jsou extrémně rezistentní vůči rozkladu, a proto přetrvávají dlouhodobě v prostředí, kde se akumulují v biotických a abiotických složkách prostředí. Jsou dokonce odolné vůči rozkladu autochtonními organismy.

Mezi tyto látky můžeme řadit pesticidy, herbicidy, ropné látky, polychlorované bifenyly, polyaromatické uhlovodíky, chlorovaná rozpouštědla, dioxiny, textilní barviva, různé těžké kovy z průmyslové výroby, výbušniny, komunální a průmyslový odpad, léčiva, atd. Všechny tyto látky se dostávají ať již neúmyslně či úmyslně do ovzduší, půdy, vody a do potravního řetězce a nakonec zpět k člověku. To začíná být naším hlavním ekologickým problémem. Proto bychom se měli zaměřit na postupy a technologie, které budou řešit tyto problémy nebo pokud je to možné jim předcházet.

Jedním z řešení pro cílené dekontaminace se nabízejí remediační postupy – chemické, fyzikálně – chemické, biologické či přirozená atenuace (obnova). Postupy chemické a fyzikálně – chemické jsou finančně nákladné a navíc se do prostředí úmyslně vypouštějí další chemické látky. V případě, že necháme přírodu, aby si “s tím sama poradila“, je otázka zda vůbec dojde k nápravě a kdy. Jako jedno z možných řešení se nabízí biologická remediace – bioremediace, tj. odbourávání chemických látek pomocí (mikro)organismů. Mezi tyto organismy můžeme zařadit bakterie, rostliny (fytoremediace), houby (mykoremediace) nebo jejich kombinaci. Právě studium jejich kombinace ukazuje perspektivní oblasti využití. Ale k tomu, abychom uměli využít jejich kombinaci ve svůj prospěch, musíme se zaměřit na jejich vzájemné vztahy – interakce. Tyto interakce nejsou vždy pozitivní i negativní vztahy však jsou důležité pro poznání jejich využití.

Dnes se již běžně v praxi využívají rostliny, např. při dekontaminaci výsypek po těžbě uhlí, či bakterie, které jsou využívány např. v třetím stupni biologického čištění odpadních vod v ČOV. Ve fázi výzkumu je mykoremediace, která se ukazuje jako velmi perspektivní s velkým potenciálem pro oxidativní bioremediaci široké škály toxických chemických polutantů, pro její velkou schopnost degradovat takové látky jako jsou polychlorované bifenyly (PCB), polyaromatické uhlovodíky (PAU), výbušniny, textilní barviva (Pointing, 2001) a endokrinní disruptory (Cajthaml 2009). Pro rozklad těchto látek se využívají různé druhy hub, např. vláknité houby nebo houby ligninolytické.

Výzkum kombinace degradujících organismů je teprve na počátku, ale už se ukazují slibné výsledky, které zaručují zvýšení efektivity v těchto a dalších oblastech.

Tato práce je zaměřená na vztahy mezi bakteriemi a houbami v biofilmech a jejich následné využití v praxi.

# Biofilm

Některé organismy se mohou přichytit na plochu a tvořit komplexy multibuněčných komunit – biofilm. Biofilm se skládá z mikrobiálního organismu (řas, hub, bakterií a/nebo jiných organismů) a extracelulárních polymerních látek (EPL) produkovaných organismy, které poskytují strukturu a ochranu. V posledních třech desetiletích byly biofilmy uznány jako vysoce strukturalizované biotopy, které lze nalézt na každé fázi rozhraní, pokud je alespoň po nějaký čas vystavena vodě (Kefford, Kjelleberg a Marshall, 1982). Organismy tvořící biofilm žijí v mikrokoloniích rozptýlených mezi vodními kanály, které rozvádějí vodu a kyslík po biofilmu a naopak odvádějí odpadní produkty. První zmínky o tom, že tyto organismy žijí přisedle, pochází ze studie od Henriciho (1933, in O'Tool (2000)), který uvádí „je zcela evidentní, že z velké části vodní bakterie nejsou volně žijící organismy, ale rostou na ponořených plochách“. Kromě toho, znečištění trupu lodí mikroorganismy v mořském prostředí bylo považováno za závažný problém již několik let před Henriciho publikací (Henrici (1933) in O'Tool (2000)). Podrobnější výzkum organismů začal přibližně před třiceti lety, kdy Greesey a kol. (1977) objevili, že organismy (bakterie) v přírodním vodním prostředí se převážně nacházejí připevněné k povrchu. Je to proto, že představuje pro ně nejvhodnější růstové prostředí (Kefford, Kjelleberg a Marshall, 1982).

Biofilmy mají širokou škálu struktur. Mohou obsahovat organismy zahrnující jeden druh nebo více druhů a mohou se formovat v širokém rozmezí biotických a abiotických povrchů. Póry a heterogenita biofilmu jsou výsledkem substrátu, který utváří růst biofilmu. Heterogenita biofilmu je taktéž ovlivněna mikrobiální diverzitou a specifickými mikrobiálními procesy. Populační dynamika a celková výkonnost procesů biofilmu jsou ovlivněny kompeticí různých struktur organismů o substrát a prostor (Furumai a Rittmann, 1994). Kupříkladu v porovnání s rozptýleným aktivovaným kalem, umožní biofilm mnohem vyšší koncentraci biomasy. Podmínky prostředí pro mikroorganismy jsou v biofilmu závislé na umístění v rámci biofilmu, zatímco v aktivovaném kalu je prostorové rozmístění méně významné. Výhodou organismů uvnitř biofilmu je ochrana před oddělením, zatímco organismům na povrchu hrozí rychlejší oddělení ze systému (Furumai a Rittmann, 1994). Existují různé procesy, které jsou zodpovědné za oddělení biomasy z biofilmu, zejména čtyři

procesy: abraze (kolize s dalšími částmi biofilmu), eroze (způsobena otěrem média) opadávání a spasení predátory (viz níže Kapitola Bakteriální biofilm; Stewart, 1993).

Podrobný výzkum mikrosvěta byl umožněn sestrojením optických přístrojů. Díky nim máme prostředek jak zkoumat vztahy mikrobiálních společenství, které se váží k povrchu, např.: biofilmů (Wimpenny, Manz, Szewzyk, 2000). Rychlý vývoj nových molekulárních nástrojů v kombinaci s pokročilými mikroskopickými technikami poskytuje nejen detailní snímky 3D struktury biofilmu, ale také znalost aktivit a fyziologického stavu jednotlivých buněk v biofilmu. Studie biofilmu jsou prováděny buď na makroskopické úrovni (měření obecných vlastností biofilmu tvořených v reaktoru či systému) (Beun a kol., 1999) nebo mikroskopické (tj. pomocí mikroskopie (Palmer a Sternberg, 1999) a mikro – elektrod (Rasmussen a Lewandowski, 2000). Struktura biofilmů byla zkoumána pomocí mikroskopické, fyzikálně – chemické a molekulárně biologické techniky. Těmito technikami byla odhalena složitost 3D struktury (Noguera a kol., 1999). Souběžně s těmito technikami byly vyvíjeny matematické modely a simulace, které měly vysvětlit složitost vývoje, struktury a interakce v biofilmu (van Loosdrecht a kol., 2002). Tyto nové metody se jistě budou podílet na odhalení vývojových procesů podílejících se na tvorbě a chování biofilmů. V současnosti byla za pomoci těchto technik popsána struktura kanálků a široké spektrum povrchových struktur (Wimpenny, Manz, Szewzyk, 2000).

Vlastnosti buněk v biofilmu jsou odlišné od jejich volně žijících protějšků. Takovými funkčními změnami mohou být změny ve fyziologii, v buněčném povrchu, odolnosti vůči biocidům aj. (Henrici, 1933 in O'Tool, 2000; Wimpenny, Manz, Szewzyk 2000). Mikroorganismy rostoucí ve formě biofilmu se od svých planktonických forem odlišují transkripcí odlišných genů a tudíž i svými fyziologickými vlastnostmi a vzniká tak jakýsi „biofilmový“ fenotyp (O'Tool a kol. 2000, Costerton, 2002). Navíc prostředí v biofilmu není homogenní a organismy jsou vystaveny odlišným podmínkám, jako jsou různé koncentrace signálních molekul, živin, kyslíku a odpadních metabolitů v jednotlivých vrstvách biofilmu. To vede ke vzniku značné heterogenity i v rámci bakteriální populace v biofilmu. K heterogenitě přispívá i způsob vzniku mikrokolonií agregací, kdy dochází k agregaci buněk s „biofilmovým“ a „planktonickým“ fenotypem (Rickard a kol., 2003).

Přestože v přírodních podmínkách převládá v biofilmech směs druhů, v laboratorních podmínkách (v různých infekcích a na povrchu lékařských implantátů) byly studie prováděny na jednodruhových biofilmech (Adal a Farr, 1996). Tento výzkum nalézá praktické uplatnění

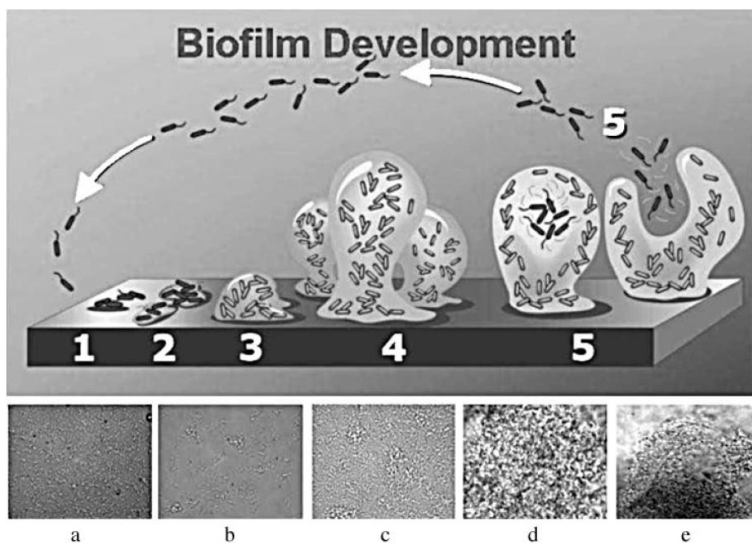


také ve stomatologii, v souvislosti se zubním plakem (Wood a kol., 2000) a infekcemi (Costerton, Stewart a Greenberg, 1999). Biofilm je využíván také pro různé biotechnologické aplikace a v průmyslu (Seneviratne, 2003).

## Vývoj biofilmu

Shimkets a Brun (1999) definují vývoj biofilmu jako změnu tvaru a funkce původně volně žijících organismů. Za zahájení tvorby biofilmu jsou zodpovědné specifické podmínky prostředí, jako je dostupnost živin. Studie Bright a kol. (1995) ukázala, že celková hydrofobicita a/nebo povrchový náboj bakterie slouží jako vstupní faktor, který rozhodne o kolonizaci povrchu organismy.

Vývoj bakteriálního biofilmu lze shrnout do pěti následujících kroků (1) počáteční reverzibilní přichycení organismu k substrátu, (2) ireverzibilní připevnění a tvorba mikrokolonií, (3) prvotní vývoj biofilmu, (4) maturace (zrání) biofilmu a (5) rozklad biofilmu (Costerton a kol., 2002). Tento vývoj je zobrazen na obrázku 1.



Obrázek 1. ukazuje vývoj biofilmu v pěti-fázovém procesu.

**1. fáze: počáteční přichycení buněk k povrchu. 2. fáze: produkce EPL, což vede k pevnějšímu "ireverzibilnímu" přichycení k povrchu. 3. fáze: časný vývoj stavby biofilmu. 4. fáze: maturace biofilmu. 5. fáze: rozklad buněk z biofilmu.**

Spodní panel (a – e) ukazuje jednotlivé fáze vývoje biofilmu reprezentované druhem bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, pěstované na skleněném substrátu (Stoodley a kol., 2002).

Přichycené buňky k podkladu se začnou dělit a jejich dceřiné buňky se šíří nahoru a ven směrem od připevňovací plochy a tvoří seskupení (Heydorn a kol., 2000). Prvotní kolonizace plochy bude probíhat zcela náhodně. Jakmile se organismy přichytí k povrchu, tak interakce přestanou být náhodné, ale stanou se souborem fyzikálně – chemických a biologických pravidel. Dvě mikrokolonie mohou spolupracovat, soutěžit či být nezávislé.

### 2.1.1. Počáteční přichycení

V roce 1997 Palmer a White navrhli model vývoje počáteční fáze biofilmu, což zahrnovalo interakce mezi povrchem-buňkou a buňkou-buňkou.

Počáteční interakce mezi povrchem a buňkou rozhodne, zdali se částice přichytí a nastane její depozice či nikoliv. Mezi povrchem a buňkou existují přitažlivé a odpudivé síly. Přitažlivou silou jsou van der Waalovy síly, ale jsou relativně slabé a působí na vzdálenost <50 nm. Na vzdálenost 10-20nm působí elektrostatické interakce. Ve vzdálenosti od 2-0,5nm začínají působit specifické interakce – hydrofobní. Všechny tyto interakce umožňují adhezi buňky k povrchu (Fletcher, 1996).

Poté co se buňky přichytí k povrchu, začnou produkovat extracelulární polysacharidy (polymery). Vlastnosti těchto látek jsou přímo ovlivněny faktory prostředí, jako jsou teplota, pH a kationty. A tyto fyzikální faktory mohou ovlivnit charakteristiku polymerů, což má za následek ovlivnění funkcí jako je adheze (Fletcher, 1996). Biologickými faktory, které ovlivňují adhezi je syntéza proteinů, extracelulárních polymerů, motilita, buněčná velikost, hydrofobicita, povrchový náboj buňky a fyziologie buněk (van Schie a Fletcher, 1999).

### 2.1.2. Vývoj biofilmu

Když se buňky přichytí k povrchu, začnou syntetizovat extracelulární polymery a začnou se rozvíjet do jedné tenké vrstvy buněk. Postupně se zvětšuje tloušťka s nárůstem buněk do tvaru houby nebo sloupce. A během toho vytváří mikrokolonie a kanály uvnitř biofilmu (Palmer a White, 1997).

### 2.1.3. Maturace (zrání) biofilmu

Organismy po přichycení k povrchu podstupují další adaptace na život v biofilmu. S tím jsou spojovány hlavně dvě vlastnosti, zvýšená syntéza extracelulárních polymerních látek a rozvoj rezistence vůči antibiotikům. Tento ochranný mechanismus způsobuje zejména v klinické praxi problém (např. v případě rozvoje nežádoucích bakteriálních kultur v cévkách či povrchu protéz může dojít k infekci u člověka). U bakterií v biofilmu se mohou vyvinout i další vlastnosti, například zvýšená odolnost vůči UV záření, zvýšení výměny genetické informace, změněné biodegradabilní schopnosti a zvýšená produkce sekundárních metabolitů (O'Toole a kol., 2000).

### 2.1.4. Oddělení od povrchu a návrat do planktonní formy života

Dosažením kritického množství buněk i masy biofilmu vede nakonec k fázi disperze, při které se uvolní jednotlivé buňky i jejich shluky obalené EPL z biofilmu, a tak dochází k jejich dalšímu šíření (Dohlan, 2001). Hlavní faktory, které se na této fázi podílejí, jsou vedle mechanických účinků prostředí (síla vodního proudu) a dostupnosti živin a kyslíku, koncentrace metabolitů i regulační systémy, především systém quorum sensing (Branding a kol. 1995, Davies a kol. 1998).

Možným signálem pro odpojení od kolonie může být i hladovění. Boyd a Chakrabarty (1994) zjistili, že za oddělení u bakterie *Pseudomona aeruginosa* je odpovědný především polysacharidový enzym lyáza (alginate lyase).

## **2.2. Komunikace v biofilmu**

V biofilmu probíhá vzájemná intenzivní komunikace mezi jednotlivými organismy i celými mikrokoloniemi. Mezibuněčná komunikace probíhá pomocí signálů. Tyto signály definujeme jako aktivně nebo pasivně přepravované produkty organismů, které mění stav okolních organismů. Například u bakterií to jsou proteiny, genetický materiál (RNA, DNA) a další produkty, které nejsou zatím známé. Tyto signální molekuly se podílí na regulaci procesu tvorby biofilmu, mění rozmístění jednotlivých druhů v biofilmu, zajišťují výměnu

genetického materiálu se sousedními organismy/buňkami, mění expresi proteinů v sousedních buňkách nebo lákají další organismy do biofilmu (Stoodley a kol., 2000).

## 2.3. Struktura

Struktura biofilmu se zdá být do značné míry produkcí “ slizové matrice“ - extracelulární polymerní látky, která poskytuje strukturální podporu pro biofilm (Flemming a kol., 2000). Biofilmové struktury mají rozsah 1-2 $\mu$ m a tloušťku několik stovek  $\mu$ m, a často i více. Extracelulární polymerní látky (EPL) jsou produkovány organismy v biofilmech. Jsou to metabolické produkty nahromaděné na povrchu buněk organismů (bakterií). EPL mohou měnit fyzikálně – chemické vlastnosti povrchu buněk, jako objem, hydrofobnost a jiné (Sunil a kol., 2008). EPL je lepkavý materiál, který je složen z proteinů, polysacharidů, huminových kyselin a lipidů.

Příkladem dobře prozkoumaného biofilmu je zubní plak, tzn. měkký nános na povrchu zubů či jiných pevných površích v dutině ústní. Složení plaku má složku organickou a anorganickou. Organickou složkou plaku jsou polysacharidy, v zastoupení převážně glukánů (dextransy) a fruktanů. Dále se tam vyskytuje malé procento albiminů a mutanů (ve vodě nerozpustné), které vytvářejí skelet plaku. V anorganické složce převažuje kalcium a fosfor, dále v menší míře se tam nachází sodík, draslík a fluoridy (Dřížhal, 1999).

EPL napomáhají buněčné adhezi, čímž prospívá k zahájení agregace. Extracelulární polymerní látky jsou odpovědné za strukturální integritu, určují strukturu a soudržné síly biofilmu (Flemming a kol., 2000).

Struktura a tvar biofilmu jsou značně proměnlivé a jsou ovlivněny jak mikrobiálními druhy tvořícími biofilm, tak podmínkami zevního prostředí, zvláště vlastnostmi povrchu, dostupností živin a kyslíku, pH, osmotickým tlakem nebo hydrodynamikou prostředí (Davey a O’Toole, 2000). V prostředí s vysokým obsahem živin se vytváří biofilm v silné, relativně homogenní vrstvě, často bez vytvořených kanálků. Naopak v prostředí chudém na živiny je biofilm tvořen buď nízkou mozaikovitou strukturou, nebo vytváří houbovité útvary s dobře vytvořenými kanálky a póry, pomocí kterých mohou být snadno hlubší vrstvy biofilmu zásobeny živinami, kyslíkem a zbavovány metabolitů (Costerton a kol., 1995; Costerton a kol., 1999, Stoodley a kol., 2002).

Existují dva pohledy na prostorové rozmístění biofilmu. První je čistě fyzikálně – chemický a je založen na modelu „difuzí limitované agregace“ (Diffusion-limited aggregation Models). Je to idealizovaný proces, který za určité rychlosti způsobí ireverzibilní spojení částic či organismů do agregátu (Witten a Sander, 1983). Druhý, který je experimentálně podložen, se zakládá na tom, že morfologie biofilmu je daná geneticky. Mutanti s defekty v signálním systému nemají schopnost produkovat systém komunikačních kanálků mezi organismy. Tento propojený systémem kanálků zajišťuje volný pohyb kapalná fáze s převažujícím tokem. Tyto kanály roznášejí kyslík a vodu a odvádějí odpadní produkty (de Beer, 1994). Tudíž tito mutanti s defekty nemohou vytvořit propojené komplexní komunity biofilmu. Proto je genom považován za nejdůležitější faktor při určování struktury.

Buňky v biofilmu spolu metabolicky spolupracují a dochází u nich k vyššímu stupni genetické výměny (Costerton a kol., 1995; O'Tooley a kol., 2000). Kromě toho zde dochází díky poměrně úzkému kontaktu mezi jednotlivými buňkami k intenzivní výměně genetické informace, hlavně jde o konjugaci a přenos plazmidů. Tímto způsobem se mohou mezi jednotlivými populacemi v biofilmu poměrně rychle šířit např. plazmidy nesoucí geny, které kódují rezistenci k antibiotikům (Hausner a kol., 1999).

Mezi jednotlivými druhy struktury existuje spojnice a to koncentrace substrátu. (Wimpenny, Manz, Szewzyk, 2000). Velikost kolonie závisí na koncentraci substrátu. První pozorování pochází ze studie Szewzyk a Schink (1987) na anaerobní bakterie, kde byl pozorován regulační účinek koncentrace substrátu. V této studii byla prokázána korelace mezi velikostí kolonie a koncentrací substrátu v tekutém médiu.

Růst ve formě biofilmu je pro mikroorganismy výhodný. Oproti bakteriím rostoucím v planktonické formě, biofilm poskytuje bakteriálním buňkám ochranu, udržuje určitý stupeň homeostázy a vytvořená biofilmová vrstva i EPL obklopující buňky představují bariéru, která izoluje bakterie od okolí. Buňky v biofilmu tak mají například vyšší odolnost vůči toxickým látkám, UV záření, mechanickému poškození, bakteriofágům či predátorům. V těle člověka nebo zvířete lépe odolávají působení imunitního systému nebo antibiotikům (Donlan a Costerton 2002).

Kromě lékařských aplikací mají biofilmy praktický význam v životním prostředí. Watnick a Kolter (2000) dokázali, že spojení organismů do biofilmu přináší několik výhod, a to zvýšenou odolnost vůči toxickým látkám jako jsou chlor, detergenty a antibiotika. Tato

rezistence je multifaktorální a je způsobena snížením difúze v biofilmu, snížením rychlosti růstu a snížením produkce látek (enzymů). Wimpenny, Manz a Szewzyk (2000) zase prokázali, že úzké prostorové uspořádání různých druhů organismů může být pro komunitu přínosné, například při degradaci (rozkladu) rekalcitrantních (těžko rozložitelných) organických molekul. Pro účinnou a úplnou degradaci těchto látek je nejlepší, pokud jsou bakterie prostorově blízko u sebe. V degradaci organických polutantů se počítá s jejich širokým uplatněním ve všech typech čištění odpadních vod a to díky jejich schopnosti tvořit společenství a agregáty, což je jejich velkou výhodou. V městské a průmyslové čistírně odpadních vod se využívají biofilmové reaktory, které jsou navrženy, tak aby podporovaly růst bakterií. Biofilmové reaktory jsou účinné při dekontaminaci odpadů, městské a průmyslové odpadní vody a znečištěné podzemní vody (Goel a kol., 2003).

Během posledních třech dekad jsme se naučili hodně o druzích organismů a jejich prostorovém rozmístění na biofilmu. Výzvou do budoucna zůstává porozumění vzorům genové exprese, základním fyziologickým vlastnostem a interakcím mezi buňkami v biofilmu (Wimpenny, Manz, Szewzyk, 2000).

## 2.4. Význam biofilmů

Biofilm představuje důležitou složku životního prostředí, která člověku přináší užitek nejen ve formě normální mikroflóry, ale také je součástí celé řady biotechnologií, včetně průmyslové výroby a technologií pro čištění odpadních vod (Lee a Newman, 2003) a také v potravinářství (fermentování potravin). Na druhé straně však přináší biofilm celou řadu problémů.

Z hlediska hygienického představují mikrobiální biofilmy závažný problém ve vodárenských a rozvodových zařízeních pro pitnou vodu, kde jsou biofilmy zdrojem oportunně patogenních bakterií (*Legionella*, *Mycobacterium* a *Aeromonas*) (Mittelman, 1995).

Společenství biofilmu také negativně ovlivňuje materiál, na kterém je přichyceno – mluvíme o biodeterioraci (biokorozi). V důsledku těchto interakcí jsou změny materiálu funkční (mechanické, elektrické, optické, chemické) a morfologické (barevné skvrny, důlková koroze – pitting, fibrilace (rozvlákňování)(Wasserbauer, 2000). Toto můžeme pozorovat na jakémkoliv materiálu vystaveném vlhkosti, např.: ve stavebnictví, průmyslu (konstrukce), na

trupech lodí. V potrubí rozvinutý biofilm způsobuje turbulenci protékající kapaliny a zmenšuje průsvit, v průmyslových výměnících tepla tvoří tepelnou izolační vrstvu.

V lékařském prostředí jsou biofilmy nepříznivé. Způsobují infekce, které jsou nebezpečné pro zdraví člověka. Rozmanitost těchto mikrobiálních infekcí, které jsou způsobeny biofilmy, jsou společné pro infekce v močových cestách, při použití intravaskulárních katetrů (cévek), při zánětech středního ucha u dětí, u zubního plaku, v případě endokarditidy nebo infekce srdeční chlopně. Jedním z hlavních představitelů šíření infekcí v nemocničním prostředí je biofilm z houby rodu *Candida*. Jako původci chronických infekcí byly bakterie rostoucí ve formě biofilmu označeny již v padesátých letech minulého století. Ukazuje se, že biofilm představuje podstatně větší problém, než se původně předpokládalo, a jeho význam stále vzrůstá, zvláště v souvislosti se stále častějším používáním katetrů a implantátů v medicíně (Dohlan a Costerton, 2002).

### **3. Bakteriální biofilm**

V přírodních vodních ekosystémech jsou samostatně žijící bakterie v planktonní formě spíše raritou, převážná část bakterií žije uspořádána v biofilmové společenství. Biofilmová společenství jsou komplexní populace bakterií, které se váží k povrchu a vytvářejí velká množství extracelulárního podkladového materiálu (Colvin a kol., 2011). Tento extracelulární podkladový materiál má dvě funkce a to strukturální a ochrannou (O'Toole, 2003, Parsek a Singh, 2003). Extracelulární podkladový materiál je tvořen exopolysacharidy, které se vyskytují v mnoha formách od strukturně jednoduchého lineárního homopolymeru po strukturně komplexní rozvětvený heteropolymer. Exopolysacharidy mají široké spektrum funkcí, zahrnující přilnavost k povrchu, strukturální podporu a podporu proti environmentálnímu stresu (Colvin a kol., 2011), zajišťují interakce mezi buňkami, obranyschopnost, ochranu proti antimikrobiálním látkám - antibiotikům (Stoodley a kol., 2002, Stewart a Costerton, 2001). Struktura biofilmu zajišťuje bakteriím několik výhod oproti samostatnému životu v planktonu, například ochranu před toxickými sloučeninami, hlavně před antibiotiky, která jsou přítomna v prostředí (Watnick a Kolter, 1999, Mah a

O'Toole, 2001). Dále mají bakterie v této struktuře zvýšenou odolnost proti vysychání (Jefferson, 2004) a spásání (Matz a Kjelleberg, 2005). (viz Kapitola Biofilm) Obranným mechanismem před spásáním prvoků a vnějšími vlivy z prostředí je vznik mikrokolonií a produkce toxinů (Matz a kol., 2004). Další výhodou biofilmu je zvýšená možnost genetického přenosu informací mezi jednotlivými bakteriemi, například horizontální přenos genů (Molin a Tolker-Nielsen, 2003) a kometabolismus (transformace organické sloučeniny organismy, které nejsou schopné tuto látku využívat jako zdroj energie).

V biofilmovém společenství probíhají mezi jednotlivými organismy interakce, které jsou pozitivní či negativní. Mezi prospěšné interakce v biofilmu řadíme ko-agregaci buněk, konjugaci, ochranu před vyhubením (eradication), když je biofilm vystaven antimikrobiálním látkám. Tato ochrana je způsobena komplementací enzymů jako ochranných bariér a organizovaným rozmístěním buněk v biofilmu. Tyto mechanismy jsou výsledkem spolupráce v biofilmu. Negativní mechanismy v biofilmu zahrnují produkci bakteriálních toxinů (Burmølle a kol., 2006).

### **3.1. Vývoj bakteriálního biofilmu**

Bakterie jsou v biofilmu prostorově uspořádány v jedné rozptýlené vrstvě přichycené k povrchu. Seskupují se do mikrokolonií a pak se organizují do trojrozměrného (3D) biofilmu.

Vývoj bakteriálního biofilmu probíhá v několika krocích. Prvním krokem je přiblížení bakterií k povrchu a přichycení se na něj, poté dochází k imobilizaci. Bakterie se hýbou podél povrchu a sdružují se s dalšími bakteriemi za účelem vytvoření mikrokolonií. Nakonec vznikne trojrozměrná struktura biofilmu. Takováto struktura je tvořena z pilířů bakterií obklopujících vodní kanály. Vodní kanály přivádějí živiny do bakteriálního biofilmu a odvádějí z něj odpadní látky (Watnick a Kolter, 1999).

Modelovým organismem ve studiích bakteriálních biofilmů je *Pseudomonas aeruginosa*. *P. aeruginosa* tvoří tři extracelulární produkty - alginát, Psl and Pel. Tyto extracelulární produkty se podílejí na tvorbě biofilmů (Colvin a kol., 2011).

**Alginát** je extracelulární polysacharid, který hraje klíčovou úlohu při vytváření stabilního biofilmu v různých podmínkách. Je důležitým prvkem, který se podílí na upevnění buňky k povrchu. Alginát je složený z uronové kyseliny. Bakterie produkuje velké množství



alginátu s rozdílnou blokovou strukturou a nulovým stupeň acylace (Gacesa, 1998). U *P. aeruginosa* se na biosyntéze alginátu podílí 24 genů.

Z analýzy extracelulárních polymerních látek je zřejmé, že enzym **Pel** je polymerní polysacharid bohatý na glukózu, ačkoliv přesná struktura není zatím známá (Friedman a Kolter, 2004). Pel je strukturální a ochranný faktor ve společenství biofilmu. Chrání před aminoglykosidovými antibiotiky během růstu biofilmu (Colvin a kol., 2011). Podílí na iniciaci a interakci typu buňka- buňka v tvořícím se biofilmu. To je zásadní mechanismus, kterým mateřské buňky udržují buňky dceřinné ve společenství biofilmu. Syntéza enzymu Pel je kódována sedmi operony.

**Psl** je polysacharid, který tvoří primární strukturu v zrajícím biofilmu (Colvin a kol., 2011).

## 4. Houbový biofilm

Vývoj houbového biofilmu je vysoce komplexní proces. Tvorba houbového biofilmu se vyznačuje dvěma specifickými procesy. Těmito procesy jsou adheze a následná diferencovaná genová exprese, která vede k vývoji nových a fenotypově odlišných jedinců od těch co se vyskytují ve volné přírodě (Wimpenny a kol., 2000). Pro tvorbu houbových biofilmů se využívají houby buď vláknité, mykorhizní nebo ligninolytické.

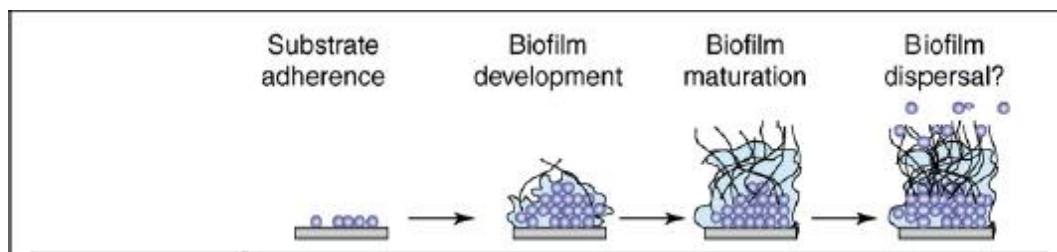
Struktura houbových biofilmů připomíná jejich protějšek – bakteriální biofilm (Baillie a Douglas, 1999). Stejně tak jako bakteriální biofilm, tak i biofilm houbový má heterogenní strukturu. Baillie a Douglas (1999) použili skenovací elektronovou mikroskopii a pozorovali přechod mezi kvasinkovou a hyfovou formou, která hraje důležitou roli ve vývoji biofilmu. Kvasinky totiž ovlivňují strukturu biofilmu. Vznik houbového biofilmu zahrnuje produkci specifických celulárních látek a má speciální funkce (Chandra a kol., 2001).

Přilnavost hub k povrchu je přirozený proces, který byl dobře prostudován u patogenních druhů, ale zatím nebyl popsán u druhů hub pro průmyslové využití. Buněčná adheze a růstu na povrchu jsou potřebné k dosažení dostatečné produktivity v ponořených submerzních průmyslových procesech (Villena a Gutie' rrez-Correa, 2007).

## 4.1. Vznik houbového biofilmu

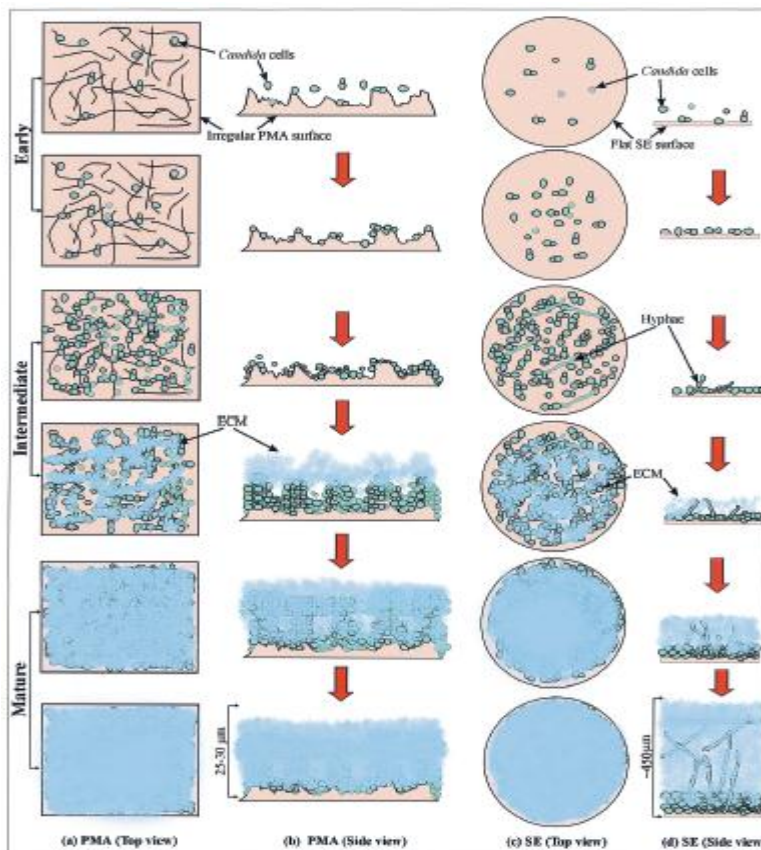
Na rozdíl od bakteriálních biofilmů, jsou houbové biofilmy závislé na podmínkách, při kterých se tvoří (Kumamoto, 2002). Na vývoji houbového biofilmu se podílí řada faktorů, například povrch materiálu, růstové médium, podmínky inkubace a morfologie buněk uvnitř biofilmu.

Vývoj biofilmu má tři fáze (Chandra kol., 2001). První počáteční fází je přichycení blastospor (kvasinková forma) k podkladu, následované připojením buněk k sobě, což umožní navrstvení biomasy v biofilmu. Na přichycení buněk se podílí protein aglutinin (Als) (glykosylfosfatidiol - inositol), který spojuje povrchy buněk. Prostřední fáze je charakteristická vznikem nebuněčného materiálu pokrývajícím vzniklé mikrokolonie s kanály a póry. Následuje proliferace (bujení) kvasinkových buněk na povrchu až do vzniku a vývoje hyf, které jsou obklopeny extracelulárními látkami. Hyfy se rozrůstají za vzniku mycelia, a tím se biofilm stává viditelným. Závěrečným krokem je maturace (zrání), tzn. růst kvasinek je zastaven, pokračuje růst hyf a produkce extracelulárních látek obklopujících biofilm. Další krok v životním cyklu je fáze, v níž dceřinné buňky klíčí jako nepřichycené kvasinkové buňky (Sheldon a Small, 2005).



Obr. 2 Popis vývoje houbového biofilmu (Blankenship a Mitchell, 2006).

Houbové biofilmy jsou morfologicky účinnější systém pro tvorbu enzymů v porovnání s bakteriálními biofilmy. Extracelulární polymerní látky (EPL) obsahují sacharidy, bílkoviny, fosfor, glukózu a další látky, které zatím nejsou charakterizovány. Extracelulární polymerní látky, které produkují jak houby, tak bakterie jsou charakteristické pro udržení integrity v biofilmu, omezují šíření toxických látek v biofilmu a tvoří ochranu proti patogenním buňkám (Villena a Gutie' rez-Correa, 2007).



**Obr. 3** Schéma ukazuje vývoj biofilmu *Candidy albicans*. (a i b) biofilm roste na proužcích z polymethylmetakrylátu (PMA). (c a d) biofilm roste na silikonovém elastomerovém disku (SE). Panely a a c reprezentují pohled na vývoj biofilmu ze shora, zatímco panel b a d ukazují pohled ze strany. ECM, extracelulární materiál (Chandra a kol., 2001).

Biofilm dodává houbám vyšší rezistenci proti antimykotickým látkám v porovnání s volně žijícími jedinci. A tato rezistence vzrůstá ve vyvíjejícím se houbovém biofilmu. Schopnost rezistence se projevuje již od první fáze přichycení buněk k povrchu. (Blankenship a Mitchell, 2006). Stejně jako bakteriální biofilm, tak houbový je rezistentní vůči antimikrobiálním látkám (antibiotikům). Vývoj houbového biofilmu je spojován s vysokou produkcí EPL. U bakteriálních biofilmů hraje EPL roli jako bariéra, která brání antibiotikům v průniku. Zatím zůstává nejasné, zda i houbových biofilmů je rezistence vůči léčivům způsobena EPL či geneticky nebo biochemicky. Alternativním vysvětlením rezistence proti antimykotickým látkám je metabolická nečinnost houbových buněk. Avšak tato alternativa není velmi pravděpodobná, protože buňky se podílejí na metabolizaci substrátu (Chandra a kol., 2001).

Vznik rezistence vůči antimykotickým látkám se liší u jednotlivých druhů hub. Například u *Saccharomyces cerevisiae* nedochází k nárůstu rezistence v průběhu vývoje biofilmu. Zatímco u organismu *Candida albicans* bylo pozorováno výrazné narůstání rezistence během vývoje biofilmu (Chandra a kol., 2001).

Mikroorganismy jako půdní bakterie a houby produkují velké množství nízkomolekulárních látek, které jsou důležité pro výrobu léčiv. Tyto sloučeniny, tzv. antibiotika, jsou syntetizovány jako chemické signály nebo slouží k ochraně přírodních stanovišť, na nichž produkční organismy žijí. (Yim, Wang a Davies, 2007, Goh a kol., 2002). Houbové biofilmy jsou zkoumané pro jejich antibakteriální činnost, pro vývoj nových léčiv.

Zde jsou ve zkratce představeny druhy hub, které se využívají pro přípravu houbových biofilmů. Těmito druhy jsou houby vláknité, mykorrhizní a ligninolytické.

## 4.2. Vlákňité houby

Růst po povrchu je společný znak vláknitých hub. V přirozených podmínkách je kontakt s povrchem důležitý pro příjem živin, vylučování enzymů a apikální růst hyfy (Villena a Gutierrez-Correa, 2007).

Vlákňité houby mají své využití v biotechnologických procesech a to díky své metabolické všestrannosti a schopnosti vylučovat enzymy a další bílkoviny (Ferret a kol., 1999; Papagianni, 2004).

Villena a M. Gutierrez-Correa (2007) studovali morfologické a strukturální modely růstu *Aspergillus niger* u vývoje houbového biofilmu. V iniciační fázi pozorovali důležitost toho, aby měla spora drsný povrch a tím se fyzicky přichytila k podkladu. Poté začne spora klíčit a vytvářet extracelulární matrix, na které se začne vyvíjet hyfa společně s vytvořením mikrokolonií s kanály a póry. Morfologie růstu vláknitých hub je důležitým parametrem určujícím produktivitu průmyslových procesů.

## 4.3. Mykorrhizní houby

Některé druhy hub žijí v symbióze s kořeny některých rostlin, což nazýváme mykorrhiza. Houba přijímá od rostlin různé organické látky, které sama nevytváří, a pomáhá

rostlině přijímat vodu s rozpuštěnými minerálními látkami. **Mykorhizní symbióza** je jednou z nejvýznamnějších symbióz v rostlinné říši. Uvádí se, že je rozšířena mezi 70 až 90 % vyšších rostlin. Většina vyšších rostlin tedy nečerpá živiny z půdy samotnými kořeny, ale specifickými sorpčními orgány - mykorhizami, vzniklými asociací kořenů a symbiotických hub (Gryndler a kol., 2004).

**Arbuskulární mykorhizní symbióza** je pravděpodobně nejstarší typ mykorhizní symbiózy. V přírodě je velmi rozšířená (zhruba u 95% druhů mykotrofních rostlin). Je velmi významná i pro člověka, neboť se vyskytuje u většiny kulturních plodin. Arbuskulární mykorhizní houby se vyskytují ve většině agrosystémů, kde dodávají prospěšné sloučeniny jejich hostitelů, což zahrnuje lepší dostupnost fosforu a zvýšenou toleranci proti suchu a nemocem. Mnoho rhizosfér kolonizují bakterie mezi které řadíme rody *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Clostridium*, a *Pseudomonas* produkující látky, které stimulují růst rostlin nebo inhibují kořenové patogeny (Glick, 1995).

Houbové hyfy prorůstají mezibuněčnými prostory a vnitrobuněčné kolonizují zejména kořenovou kůru, kde tvoří charakteristické bohatě větvené útvary – arbuskuly (arbuskula – z lat. stromeček). Arbuskulární mykorhizní houby žijí obligátně biotrofně a při průniku do buňky nepoškozují plazmatickou membránu hostitele, ta se vchlipuje a vytváří spolu s houbovou hyfou specifickou strukturu, kde dochází k intenzivní výměně metabolitů i informací mezi houbou a hostitelskou rostlinou. Kromě arbuskul tvoří houba v kořeni rostlin kulovité nebo soudečkovité útvary – vezikuly (Peterson a kol., 2004).

## 4.4. Ligninolytické houby

Houby bílé hniloby či ligninolytické houby jsou dřevokazné organismy. Dřevo se skládá ze tří složek celulózy, hemicelulózy a ligninu. Jejich jméno pochází z toho, že přednostně rozkládají tmavé ligninové složky dřeva, které poté zůstává bílé. Tyto houby jsou schopné degradovat lignin, který je odolný vůči rozkladu a v běžných aerobních oxidačních procesech je rozkládán téměř výlučně dřevokaznými houbami. Za rozklad ligninu je zodpovědný extracelulárně enzymatický systém, který produkují ligninolytické houby. Právě ligninolytické enzymy mají širokou substrátovou specifitu, a proto mohou být využívány pro přeměnu a mineralizaci organických polutantů s podobnou strukturou jako má lignin (Pointing, 2001). Tyto druhy hub byly zkoumány z hlediska schopnosti rozkládat obtížně

rozložitelné chemické látky, např. polyaromatické uhlovodíky (PAU), polychlorované bifenyly (PCB), syntetická barviva, endokrinní disruptory, výbušniny, atd. (Novotný a kol., 2001).

Během posledních několika let se řada studií zabývá vývojem a zlepšením bioremediačních postupů za přítomnosti hub bílé hniloby a jejich enzymů, které jsou zkoumány pro jejich schopnost biodegradace průmyslových škodlivin (Singh, 2006).

## 5. Smíšené biofilmy

U přírodních biofilmů existují vícedruhová společenství. Multidruhové biofilmy mívají větší tloušťku a jsou stabilnější v porovnání s jednodruhovými biofilmy. Zatímco jednodruhové biofilmy byly laboratorně zkoumány, o vícedruhových biofilmech a jejich interakcích zatím víme velmi málo, proto je jim nyní věnována pozornost. Ukazují se totiž být velmi účinnými nástroji v eliminaci organických polutantů (Elvers a kol. 2002).

### 5.1. Druhy smíšených biofilmů

#### 5.1.1. Biofilmy obsahující Aktivovaný kal

Nejběžnějším typem smíšených biofilmů je aktivovaný kal, který se používá v mechanicko-biologických čistírnách odpadních vod v biologickém aerobním stupni již od roku 1913, kdy byl poprvé použit v Manchesteru ve Velké Británii. Aktivovaný kal dokáže z odpadní vody odstranit značné množství organického znečištění i sloučenin dusíku a fosforu.

Aktivovaný kal je směs vloček obalených a prostoupených mikroorganismy. Díky aerobnímu metabolismu těchto mikroorganismů dochází k odstranění organického znečištění vody a tyto vločky posléze sedimentují v usazovací nádrži. V aktivním kalu se vyskytují bakterie (např.: rody *Comomonas*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Cytophaga* či *Parococcus*) a prvoci (převážně nálevníci –kruhobrví rodu *Peritricha*, dále *Vorticella*, *Opercularia*, *Carchesium*).

Biologické čištění probíhá v biologickém reaktoru. Zde je z odpadní vody odstraňováno znečištění pomocí mikroorganismů nazývaných aktivovaný kal. V biologickém

reaktoru je aktivovaný kal kultivován jako suspenze (tzv. aktivační systémy) nebo na pevném nosiči (tzv. biofilmové reaktory). Těchto reaktorů existuje řada typů.

Zvláštní formou aktivovaného kalu je aerobně aktivovaný granulovaný kal. Granule tohoto typu se dají popsat jako kulaté kompaktní agregáty (zrna) mikroorganismů a extracelulárních polymerních látek (EPL). Na rozdíl od konvenčního aktivovaného kalu jsou tyto granule mnohem hustší a kompaktnější. Organismy využívané v těchto agregátech jsou bakterie, protozoa a houby. U všech byla prokázána vysoká schopnost čištění vody.

Výhody využití granulí jsou výborná usazovací schopnost, vysoká a stabilní rychlost metabolismu, rezistence vůči šokům a toxinům díky extracelulárním polymerním látkám, dlouhá doba zdržení biomasy, imobilizace biomasy uvnitř agregátů. Formulace aerobních granulí se jeví jako slibná technika pro svoji vysokou pevnost a odolnost vůči toxickým látkám v ČOV. Tyto zrnitostní systémy dovolují stabilnější provoz, zacházení s větší zátěží, odstranění více toxických látek a produkci lepší odpadní vody než konvenční systémy (Sunil a kol., 2008).

### 5.1.2. Biofilmy obsahující houby a bakterie

Biofilmy obsahující houby a bakterie (HBB) jsou odlišné od čistě houbových nebo bakteriálních biofilmů. U těchto biofilmů bylo pozorováno, že lépe rostou a mají lepší schopnost kolonizace a zlepšenou metabolickou aktivitu v porovnání s monokulturou. Například, interakce mezi houbami a bakteriemi v průmyslových vodních systémech zvyšují míru kolonizace a růst více než v monokultuře (Elvers a kol., 1998). Tato skutečnost může být uplatněna při čištění odpadních vod.

Tvorba HBB začíná bakteriální kolonizací na biotickém povrchu. Ve studii Elverse a kol. (2002) zkoumali vývoj duálního biofilmu. Pro tuto studii si vybrali dva modelové organismy bakterii *Stenotrophomonas maltophilia* (Gram negativní bakterie) a houbu *Fusarium oxysporum* (vláknitá houba). Počáteční fáze, přichycení k substrátu byla pozorována jen u bakterií. Bylo pozorováno, že houba *F. oxysporum* se přichytává častěji na spodní část substrátu než na horní část biofilmu. V případě smíšené kultury biofilmů se ukázala bakterie odolnější vůči biocidním látkám než houba. Mimoto tato studie dokazuje, že

smíšené kultury biofilmů jsou odolnější vůči biocidům než pěstované buňky v planktonní fázi (Elvers a kol. 2002).

Smíšené biofilmy se vyskytují přirozeně nejenom ve vodním prostředí, ale také v půdě, kde dochází k vzájemné interakci s okolím. Vývoj hub v terestrickém prostředí má za následek ztrátu potenciálních nik pro bakterie, ale také vytváří nové příležitosti ke vzniku nových bakteriálních nik. De Boer a kol. (2005) dokázali, že nové bakteriální niky v půdě jsou tvořeny v přítomnosti hub. Toto se opírá o myšlenku rozdílného rozmístění stanovišť, která se odlišuje zvýšenou nebo změněnou mikrobiální aktivitou v půdě kolem houbové struktury. To může přinést nový koncept v půdní ekologii (de Boer a kol., 2005). Základ těchto nově vytvořených bakteriálních nik je získaný substrát od hub. Předpokládá se, že houbové výměšky jsou hlavním nebo výhradním zdrojem živin pro bakterie. Bakterie se přichytí k houbě a spotřebovávají látky, které houby vyměšují (Christensen a kol., 2002). Z výše uvedených studií vyplývá, že výběr bakterií do smíšených biofilmů by měl být zajištěn dle produkce houbových substrátů/výměšků (Barea a kol., 2002).

Některé saprotrofní druhy basidiomycetních hub jsou známy tvorbou antibiotik v přítomnosti bakterií (Sidorova a Velikanov, 2000). Spouštěcím mechanismem pro tvorbu antibiotik je právě přítomnost bakterií. U některých bakterií byla pozorována rezistence na houbová antibiotika (Seigle-Murandi a kol., 1996). Větší produkce antibiotik bude přítomna ve smíšených HBB v porovnání s čistou houbovou kulturou.

Arbuskulární mykorhizní (AM) houbová kolonizace má vliv na druhové složení půdního mikrobiálního společenství v rhizosféře, tím že zvyšují či snižují počty bakterií. Do HBB biofilmů se začleňují  $N_2$  – fixující rhizobiální druhy bakterií a vytvářejí rhizobně – bakteriální biofilmy (RBB). Činnost  $N_2$ -fixujících bakterií zvyšuje dostupnost dusíku pro růst hub (Hendrickson, 1991). Zavahir a Seneviratne (2007) testovali RBB na produkci aktivních látek a pozorovali zvýšenou sekreci sloučenin a to přibližně 12-krát ve srovnání s monokulturami, ať už houbovými či bakteriálními. RBB mají potenciál k využití v široké sféře biologických aplikací, např. biohnojiva v zemědělství, rozpuštění fosforu a vývoj léčiv. Ale stále je tu velké pole působnosti k novému využití. Příkladem je inokulace jedlé houby *Pleurotus ostreatus* spolu s rhizobiálním kmenem bakterie, která ukázala, že toto spojení zajišťující fixaci vzdušného  $N_2$  u biofilmu zvyšuje obsah bílkovin v houbě o 148% (Jayasinghearachchi a Seneviratne 2004a). To je výhodné pro zvyšování nutriční hodnoty u



hub. Tého inokulace lze využít k efektivní biosolubilizaci (biologickému rozpouštění) fosfátu ze substrátu. To bylo prokázáno u vyvíjejícího se biofilmu u *Penicillium* spp., *Pleurotus ostreatus* a *Xanthoparmelia mexicana* - lišejníkové houby, která zvyšuje solubilizaci fosforu o 230% v porovnání s monofungální kulturou (Jayasinghearachchi a Seneviratne 2006).

Hodnota pH kolonizovaného substrátu určuje typ organismu, který dominuje v půdním prostředí. V prostředí, kde je vyšší pH než 7, dominují bakterie, zatímco když je pH nižší než 6, dominují houby (Lang, Kleeberg a Zadražil, 1997).

Studium HBB může mít ekonomický význam, např. využití bakterií při biokontrolách, léčení houbových chorob, zlepšení pěstebních houbových postupů, zvýšená stimulace mykorhizní inokulace. HBB jsou jednou z nejslibnějších technologií pro mnoho aplikací. Jejich aplikace jsou zkoumány v zemědělství a životním prostředí, enzymových technologiích a ve studiu léčiv (Elvers a kol., 1998). Například v životním prostředí mají velký potenciál v bioremediacích a ČOV. Boonchan a kol. (2000) zaočkovali HBB do zeminy kontaminované polyaromatickými uhlovodíky a tím zvýšili degradaci těchto látek v porovnání s autochtonními organismy v půdě. Dalším příkladem je výzkum provedený Seneviratne a kol. (2006), kteří zkombinovali *Penicillium frequentans* a *Bacillus mycoides* do biofilmu a zvýšili biodegradabilitu (biologickou rozložitelnost) polyetyleny.

## **5.2. Interakce ve smíšených biofilmech obsahujících houby a bakterie**

V přírodě běžně dochází k řadě interakcí mezi jednotlivými organismy a populacemi. Existuje několik typů interakcí: negativní, pozitivní nebo neutrální (Wheatly, 2002). V posledních letech se zaměřil výzkum na interakce mezi bakteriemi a houbami (Wargo a Hogan, 2006). Takovéto interakce mohou mít dramatický dopad na přežití, kolonizaci a patogenezu interagujících partnerů. Tyto interakce jsou druhově specifické (species-specific) (Wheatly, 2002).

Negativními interakcemi jsou kompetice, amenzálismus, parazitismus a predace. Kompetice je vnitrodruhový nebo mezidruhový vztah, při kterém mezi nimi dochází k soutěži o zdroje potravy, úkrytu, prostor apod. Amenzálismus znamená, že produkty jednoho druhu ovlivňují negativně druhý druh (např. zánik bylinného patra v jehličnatém lese). Parazitismus

je situace, kdy jeden organismus využívá druhý (vnější, vnitřní parazit). Predace (kořistnictví) je okamžité usmrcení jiných organismů (šelmy, dravci) (Pivnička, 2004).

Pozitivní vztahy jsou vzájemně prospěšné, nebo prospívají alespoň jedné straně a druhé neškodí. Těmito vztahy jsou komenzálismus, kooperace a mutualismus. Komenzálismus je jednostranná prospěšnost, při které není druhý partner poškozován. Protokooperace je vzájemná prospěšnost, ale soužití není bezpodmínečně nutné (např. smečka). Mutualismus představuje vzájemnou prospěšnost, partneři nemohou bez sebe žít (např. individua vyššího řádu, lišejníky, kořenová mykorrhiza) (Pivnička, 2004).

### 5.2.1. Kompetice

Nejčastějším typem interakce pozorovaným mezi bakteriemi a houbami je kompetice, tedy soutěž o zdroje a životní prostor.

V přítomnosti **vláknitých hub** je vyvíjen kompetiční tlak na bakterie o živiny při degradaci snadno rozložitelných organických sloučenin. Proto se u bakterií rozvinuly různé strategie ochrany jako tvorba inhibičních faktorů. Příkladem těchto faktorů je tvorba kyanovodíku (HCN), antibiotik, lytických enzymů, těkavých látek (tj. přerušeni kompetice), stejně tak izolace živin ve formě komplexu chelátů (tzv. substrátová kompetice) (Wheatley, 2002). Povahu a regulaci těchto interakcí zkoumali Heeb a Haas (2001) s cílem zvýšit možnosti biologické kontroly kořenových infekcí a houbových patogenů. Tyto strategie se uplatňují i v kompetici mezi jednotlivými druhy bakterií navzájem (Raaijmakers, 2002; in de Boer a kol., (2005)).

Také houby vyvinuly ochranné strategie proti bakteriím. Produkují sloučeniny s antibakteriální aktivitou (antibiotika) a tím inaktivují bakterie. Dále vyvinuly různé strategie rušící účinek bakteriálního antagonismu zahrnující rezistenci vůči antibiotikům (inaktivace a následné vyloučení bakteriální látky pomocí enzymatických mechanismů, která pronikla do houby) a modifikaci genové exprese bakterií (Duffy, Schouten a Raaijmakers, 2003).

**Ektomykorrhizní houby** zvětšují plochu pro příjem živin rostlinami. Aktivita ektomykorrhizního mycelia umožňuje zachycení živin a vyměšování organických sloučenin, čímž ovlivňuje své okolí a tím i komunitu bakterií, které se tam nacházejí (Olsson a Wallander, 1998). Mycelium může přijímat organický fosfor a dusík i minerály z hornin, jež nejsou pro rostlinu přímo dostupné. Ektomykorrhizní houby působí zvětrání hornin pomocí organických kyselin, které vylučují. Organická kyselina mění pH horniny, proto se zvyšuje

dostupnost minerálů. Olsson a kol. (1996) ukázali, že mycelium houby *Paxillus involutus* snižuje bakteriální aktivitu průměrně o 30%.

**Aerobní celulólytické houby** společně s bakteriemi produkují extracelulární enzymatický systém, který působí synergicky při degradaci celulózy na glukózu. V půdě však probíhá kompetice o získání produktů z rozkladu celulózy. Na rozkladu celulózy v půdě se podílejí převážně houby, v menší míře bakterie. To je dáno chemickou nepřístupností celulózy. Vlákna celulózy bývají uložena v hemicelulóze a ligninu (složky dřeva). Za rozklad ligninu jsou převážně zodpovědné houby skupiny *Basidiomycetes* a *Ascomycetes*, rovněž známé pod názvem **houby bílé hniloby (HBH)**. Tyto houby mají enzymatický systém, pomocí něhož degradují lignin. Kromě toho HBH mají velký potenciál ke změně prostředí prostřednictvím vylučovaných extracelulárních enzymů a organických kyselin; díky tomu mohou vyvolávat změnu v bakteriální komunitě nejen v blízkosti hyf, ale v celém okolí půdy (Tornberg, Bååth, Olsson, 2003). A to přímým působením na bakteriální membrány nebo nepřímým, uvolňováním živin při rozkladu organického materiálu. Tyto živiny zahrnují cukry a fenolové sloučeniny, které jsou zdrojem živin pro ostatní mikroorganismy (Lang, Kleeberg a Zadražil, 2000). Avšak na rozkladu ligninu se malou měrou podílejí i bakterie, a tak dochází i při rozkladu ligninu k interakci.

Výsledek interakce je silně závislý na obou organismech. Dokonce stejné kmeny různého druhu se liší v úspěšnosti, s níž konkurují jinému organismu (Lang a Zadražil, 1997). Dřevokazné houby mají různé kompetiční schopnosti, a proto se chovají v interakcích jinak nejen s houbami, ale také s autochtonními půdními organismy (Lang a Zadražil, 1997). Lang, Kleeberg a Zadražil (1997) ve své studii poukázali na to, že je nutné posoudit degradační aktivitu a přežití hub v interakci s půdními organismy, protože stupeň degradace v půdě podléhá značné variaci v závislosti na přítomných druzích. Tato variabilní degradace je vysvětlována tím, že v půdě probíhá kompetice mezi autochtonní mikroflórou a houbami. Tato interakce může přinést rozšíření o synergický účinek nebo může být degradační činnost negativně ovlivněna půdními organismy.

Lang a kol. (2000) ukazují, že houby jsou ve větší kompetici s půdními bakteriemi než s ostatními houbovými rody. Lang, Kleeberg a Zadražil (1997) poukázali na to, že ligninolytické houby jsou oslabeny ve své degradační činnosti a nemohou zabránit růstu konkurenčních bakterií. Dále pozorovali při degradaci pšeničné slámy kompetici mezi houbou *Dichomitus squalens* a HBH, což mělo za následek pokles lignocelulosové degradace. Tato

studie dále ukazuje, že u houby *Pleurotus* sp. nebyla v přítomnosti bakterie pozorována snížená degradační schopnost v půdě. A to v důsledku obranného mechanismu houby, která začala vylučovat baktericidní látky, jak dokazuje studie od Anderssona a kol. (2003). Lang a kol. (1997) pozorovali i jiné obranné mechanismy a to hydrofobní charakter podhoubí *Pleurotus* sp. zabráňující pronikání bakterií do podkladu slámy.

Již studie Barrona (1988) sledující interakci dřevokazných hub a bakterií na dřevu a agaru ukázala, že dřevokazné houby mají na kolonii bakterií nepříznivý vliv. Barron (1988) pěstoval bazidiomycetní houby v podmínkách nízké koncentrace živin. Ukázalo se, že houby rostly na povrchu kolonie bakterií, lyzovaly je a využívaly je jako zdroj živin pro svůj růst.

Tornberg, Bååth, Olsson (2003) prokázali u dřevokazných hub vysokou toleranci k polutantům a také proti mikrobiální kompetici. HBH jsou dnes navrhovány jako účinný biologický nástroj remediace půdy u těžko rozložitelných organických polutantů (například: PAU, PCB, atd.), avšak většina studií se zaměřuje na schopnost degradovat a mineralizovat tyto látky v tekutém médiu (Vays a kol., 1994).

### 5.2.2. Mutualismus (symbióza)

Na základě půdních podmínek a početnosti bakterií v komunitách si houby vybírají druhy bakterií, protože přidružené bakterie mohou mít negativní, neutrální nebo pozitivní vliv na zdatnost houbových organismů (de Boer a kol., 2005). Existuje několik mutualistických vztahů mezi houbami a jejich přidruženými bakteriemi. Houby z tohoto vztahu získávají energii nebo některé látky (de Bor a kol., 2005). Příkladem mohou být cyanobakterie, tj. sinice, které poutají dusík a část dodávají houbám.

Ačkoli výše uvedené studie ukazují v případě HBH kompetici o zdroje mezi bakteriemi a houbami, při degradaci obtížně rozložitelných (rekalcitrantních) látek byly pozorovány pozitivní interakce. Studie jasně prokázaly, že interakce hub a bakterií umožňují větší biodegradaci ve srovnání s jejich monokulturami (Jayasinghearachchi a Seneviratne, 2004; Seneviratne a kol., 2006). Bakterie zvyšují sekreci houbových enzymů a tím zvyšují dostupnost růstového substrátu. Ve studii Murraye a Woodwarda (2003) o účincích současné inokulace smrkového dřeva bakteriemi a HBH probíhala degradace lépe než jen u samotných hub. Tato stimulace u hub je připisována bakteriální produkci růstových faktorů, např. vitamínů, jež vede ke zvýšení aktivity enzymatického systému u hub a následně k vyššímu rozkladu dřevní hmoty, kterou mohou využívat bakterie ke svému růstu.

Na základě výzkumu degradace PAU pomocí smíšeného HBB biofilmu, Boochman a kol. (2000) popsali oboustranné vztahy mezi houbou a bakterií. Houbové produkty rozkladu slouží jako substrát pro bakteriální metabolismus. Zjistili, že ani jeden z druhů, *Penicillium janthinellum* (askomykotická houba) či *Stenotrophomonas maltophilia* (bakterie), nemohou růst na benzo(a)pyrenu a mineralizovat jej bez vzájemné závislosti. Pozorovali, že smíšená HBB kultura provádí rychlejší a rozsáhlejší degradaci PAU v porovnání s monokulturním inokulem nebo s autochtonními organismy (Boochman a kol., 2000).

To je v souladu s prací Kotterman, Vis a Field (1998) o degradaci PAU v přírodě, která ukazuje, že degradace je důsledkem sekvenčního působení hub a bakterií, kdy je počáteční fáze oxidace zahájena houbovým organismem. Laboratorním důkazem bylo podstatné zvýšení mineralizace PAU v kontaminovaném kalu pomocí hub bílé hniloby po zaočkování autochtonními bakteriemi (Kotterman, Vis a Field, 1998).

Tento výzkum umožňuje rozvoj praktických aplikací v lokalitách kontaminovaných PAU. Nevýhodou použití je, že půdní prostředí zahrnuje heterogenní směs mikroorganismů, což může vést k destabilizaci kultury a snížení degradační schopnosti PAU a/nebo k tvorbě toxických ve vodě rozpustných meziproductů (Boochman a kol., 2000).

Arbuskulární mykorhizní houby (AM) obývají kořeny a okolní půdu a je známo, že tyto houby zvyšují růst rostlin a potlačují jejich choroby. Tuto klíčovou úlohu má externí mycelium, které dopravuje fosfor z půdy k rostlině a také potlačuje rostlinné patogeny (Mansfeld-Giese, Larsen, Bødker, 2002). Na tyto funkce externího mycelia AM mohou mít vliv bakterie. Bakterie přilehlé k myceliu se živí výměškou z hyf a/nebo používají mycelium jako prostředek ke kolonizaci rhizosféry. Také mykorhizní houby nepřímo ovlivňují bakteriální komunitu stimulací růstu kořenů tak, že mění chemické složení kořenového výměšku a strukturu okolní zeminy a ty se pak stávají zdrojem živin pro bakterie (Gryndler, 2000). Tyto faktory působí na volně žijící bakterie i na ty zapojené do kořenového uzlu (root node). To znamená, že složení bakteriální populace v rhizosféře je silně ovlivněno přítomností AM hub. Tento synergický vztah mezi mykorhizními houbami a bakteriemi vede k ovlivnění růstu rostlin pomocí mechanismů, které zahrnují efektivnější získávání živin (Barea a kol., 2002 in Artursson, Finlay a Jansson, 2006), posílení kořenového větvení a inhibici plísňových patogenů (Artursson, Finlay a Jansson, 2006). Příkladem takové bakterie je *Paenibacillus*, který působí antagonisticky (protichůdně) na širokou škálu kořenových patogenů a stimuluje mykorhizní kolonizaci (Mansfeld-Giese, Larsen, Bødker, 2002).

Ukazuje se i vysoká míra specifčnosti některých druhů bakterií vzhledem k některým skupinám AM hub. Barea (1997) ukázal, že symbiotické působení AM hub je závislé na interakci s určitou skupinou rhizosférických bakterií známých jako rhizobakterie podporující rostliny. Meyer a Linderman (1986) nepozorovali žádný vliv AM hub na celkové počty bakterií, ale zjistili posun skupin bakterií ve směru k více fakultativním anaerobním bakteriím. U AM hub se prokázala vyšší fixace dusíku v luštěninách. V případě spojení těchto hub s bakteriálními symbionty, které je prospěšné pro fungování enzymatického systému, se zvyšuje příjem fosforu rostlinami, což je žádoucí zejména u pěstování zemědělských plodin (Johansson a kol., 2004).

Takovéto interakce mají význam v trvale udržitelném zemědělství, které se spoléhá na biologické postupy (udržovat úrodnost půdy a zdraví rostlin) více než na agrochemické.

### 5.2.3. Kooperace

Christensen a kol. (2002) pozorovali kooperace (spolupráce) v biofilmech a zjistili, že jsou důležité pro metabolické interakce mezi organismy a tím zvyšují ochranu v biofilmu (Elvers a kol., 2002).

## **6. Závěr**

Biofilmy se přirozeně vyskytují v přírodě. Dávají jednotlivým organismům větší šanci na přežití a reprodukci. Toho je využíváno nejen v medicíně (boj proti infekcím), ale také v různých technologiích, např.: při degradaci organických polutantů v půdách či ČOV. Další výzkum ukazuje nové možnosti zvýšení efektivity těchto technologií. Abychom však správně využili těchto nových technologií, jako jsou smíšené biofilmy, musíme věnovat pozornost vzájemným interakcím mikroorganismů. Znalost těchto interakcí je důležitá pro pochopení mechanismů, které je nezbytné pro správné zavádění těchto technologií do praxe. Všechny pozorované interakce, ať už pozitivní či negativní, nám přinášejí důležité informace, které lze využít v mnoha odvětvích prospěšných pro lidskou činnost. Příkladem je využívání kompetičních vztahů ve vývoji léčiv – antibiotik či mutualistické vztahy, které přinášejí v zemědělství vyšší výnosy zemědělských plodin, či to může být zavádění nových remediačních technologií (dekontaminace půd a vod). V remediacích lze využít kombinace

konkrétních druhů bakterií a hub zvyšujících schopnost biofilmu degradovat velké množství organických polutantů, které člověk vyrábí a vypouští do přírody.

V budoucnosti, bychom se měli zaměřit právě na takové technologie, které jsou levné, jednoduché a především, které účinně odstraňují znečištění, abychom aplikací zásad trvale udržitelného rozvoje po sobě zanechali planetu dalším generacím v pokud možno nepoškozeném stavu.

## 7. Literatura

- Adal K.A., Farr B.M. (1996), Central venous catheter-related infections: a review. *Nutrition* 12(3):208–13.
- Andersson B.E., Lunderstedt S., Tornberg K., Schnurer Y., Oberg L.G. a Mattiasson B. (2003), Incomplete degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil inoculated with wood-rotting fungi and their effect on indigenous soil bacteria. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 1238–1243.
- Artursson V., Finlay R. D. a Jansson J. K. (2006), Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth, *Environmental Microbiology* 8(1): 1–10.
- Baillie, G. S., and L. J. Douglas (1999), Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *J. Med. Microbiol.* 48:671–679.
- Barea J.-M., Azcón R. a Azcón-Aguilar C. (2002), Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 343–351.
- In Artursson V., Finlay R. D. a Jansson J. K. (2006), Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth, *Environmental Microbiology* 8(1): 1–10.
- Barea J.M. (1997), Mycorrhiza-bacteria interactions on plant growth promotion. In: Ogoshi A., Kobayashi K., Homma Y., Kodama F., Kondo N. and Akino S. (eds), *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*. OECD Press, Paris :50–158.
- Barron G.L. (1988). Microcolonies of bacteria as a nutrient source for lignicolous and other fungi. *Canadian Journal of Botany*, 1988, 66:(12) 2505-2510.
- Beun J.J., H.M.C., Morgenroth E., Wilderer P.A. a Heijnen J.J. (1999), Aerobic granulation in a sequencing batch reactor, *Water Research*, p. 2283-2290.
- Blankenship a Mitchell (2006), How to build a biofilm: a fungal perspective. *Current Opinion in Microbiology*. 9:588–594.
- Boonchan S., Britz M. L., Stanley G.A. (2000), Degradation and Mineralization of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Defined Fungal-Bacterial Cocultures, *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, p. 1007–1019.
- Boyd A., Chakrabarty A.M. (1994), Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2355–59.
- Branding M. G., Jass J., Lappin-Scott H. M. (1995), Dynamics of bacterial biofilm formation in Scot, Costerton (1995), *Microbial biofilms*. Cambridge: Cambridge University Press: 310.
- Bright B.D., Arora S.K., Phipps P.V. Jr, Prince A. (1995), Involvement of the *crc* locus in the regulation of the expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Pediatr. Pulmonol.* 12S:244–45.
- Burmölle M., Webb J.S., Dhana Rao, Hansen L.H., Sørensen S.J. a Kjelleberg S. (2006), Enhanced Biofilm Formation and Increased Resistance to Antimicrobial Agents and Bacterial Invasion Are Caused by Synergistic Interactions in Multispecies Biofilms, *Applied and environmental microbiology*, p. 3916–3923.
- Colvin Kelly M., Gordon Vernita D., Murakami Keiji, Borlee Bradley R., Wozniak Daniel J., Wong Gerard C. L., Parsek Matthew R. (2011), The Pel Polysaccharide Can Serve a Structural and Protective Role in the Biofilm Matrix of *Pseudomonas aeruginosa*, *Molecular Microbiology*, pages 933–946.
- Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E., Korber D. R., Lappin-Scott H. M. (1995), *Microbial biofilms*; *Annu. Rev. Microbiol.*; 49: 711-745.
- Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P. (1999), Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections; *Science*; 284; 5418: 1318-1322.
- Costerton J. W.: *Microbial biofilms*. (1995) 1. ed; Cambridge: Cambridge University Pres.: 310.
- Costerton J.W., Davies D.G., Stoodley P. (2002), Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 56:187–209.
- Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. (1999), Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318–1322.
- Davey M. E., O'Toole G. A., 2000: *Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics*; *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*; 64; 4: 847-867.
- Davis D. G., Parsek M.R., Pearson J.P., Iglewski B.H., Costerton J.W., Greenberg E.P. (1998), The involvement of cell-to cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*. 280: 295-298.
- De Beer D., Stoodley P., Roe F. a Lewandowski Z. (1994), Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol. Bioeng.* 43: 1131-1138.
- de Boer, Larissa B. Folman, Richard C. Summerbell, Lynne Boddy (2005), Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development, *FEMS Microbiology Reviews* 29: 795–811.
- Dohlan R.M. (2001), Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin. Infect. Dis.* 33 (8): 1387-1392.
- Donlan R. M., Costerton J. W., 2002: Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms; *Clin. Microbiol. Rev.*; 15; 2: 167-193.
- Dřizhal I. (1999), *Dentální mikrobiální povlak*, Progressent
- Duffy B., Schouten A. a Raaijmakers J.M. (2003), Pathogen self-defence: mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41, 501–538.
- Elvers K.T., Leening K., Moore C.P. a kol. (1998), Bacterial-fungal biofilms in flowing water photo-processing tanks. *J Appl Microbiol.* 84:607–618.
- Elversa K.T., Leemingb K. a Lappin-Scott H.M. (2002), Binary and mixed population biofilms: Time-lapse image analysis and disinfection with biocides. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 29, 331 –338.
- Ferret E., Simeon J.H., Molin P., Jorquera H., Acuña G. a Giral R. (1999), Macroscopic growth of filamentous fungi on solid substrate explained by a microscopic approach. *Biotechnol Bioeng* 65, 512–522.
- Flemming H.C., Wingender J., Mayer C., Korstgens V., Borchard W. (2000), Cohesiveness in biofilm matrix



- polymers. In *Community Structure and Cooperation in Biofilms*. Cambridge: SGM Symposium Series 59, ed. D Allison, P Gilbert, HM Lappin-Scott, M Wilson, pp. 87–105. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press
- Fletcher M. 1996. Bacterial attachment in aquatic environments: a diversity of surfaces and adhesion strategies. In *Bacterial Adhesion: Molecular and Ecological Diversity*, ed. M. Fletcher, pp. 1–24. New York: Wiley & Sons
- Friedman L., Kolter R. (2004), Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol Microbiol* 51: 675–690.
- Furumai H. a Rittmann B. E. (1994), Evaluation of multiple-species biofilm and floc processes under a simplified aggregate model. *Water Sci. Technol.* 29(10-11): 439-446.
- Gacesa P. (1998), Bacterial Progress alginate biosynthesis – recent and future prospects, *MicrObiology*.144, 1 1 33-1 143
- Geesey G.G., Richardson W.T., Yeomans H.G., Irvin R.T., Costerton J.W. (1977), Microscopic examination of natural sessile bacterial populations from an alpine stream. *Can. J. Microbiol.* 23(12):1733–36.
- Glick B.R. (1995), The enhancement of plant growth by free-living acteria. *Can. J. Microbiol.* 41, 109–117.
- Goel A., Müller M.B., Sharma M. a kol. (2003), Biodegradation of nonylphenol ethoxylate surfactants in biofilm reactors. *Acta Hydroch Hydrob* 31:108–119.
- Goh E.B., a kol. (2002), Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:17025–17030.
- Gryndler M. (2000), Interactions of arbuscular mycorrhizal fungi with other soil organisms. In *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Kapulnik, Y., and Douds, D.D.J. (eds). Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 239–262.
- Gryndler M., et.al.. (2004), Mykorhizní symbióza - O soužití hub s kořeny rostlin. *Academia*.
- Gulis V. a Suberkropp K. (2003), Interactions between stream fungi and bacteria associated with decomposing litter at different levels of nutrient availability. *Aquat. Microb. Ecol.* 30, 149–157.
- Hausner M., Wuertz S., 1999: High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*; 65; p. 3710-3713.
- Hawser S.P., Douglas L.J. (2002), Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect Immun* 1994, 62:915-921.
- Heeb S. a Haas D. (2001), Regulatory roles of the GacS/GacA two-component systems in plant-associated and other Gram-negative bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14, 1351–1363.
- Hendrickson O.Q. (1991), Abundance and activity of N<sub>2</sub>-fixing bacteria in decaying wood. *Can. J. For. Res.* 21, 1299–1304.
- Henrici A.T. (1933), Studies of freshwater bacteria. I. Adirect microscopic technique. *J. Bacteriol.* 25:277–87.
- in O'Tool a kol. (2000) Palmer R. Jr., White D.C. (1997), Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control. *Trends Microbiol.* 5(11):435–40.
- Heydorn A., Nielsen A.T., Hentzer M., Sternberg C., Givskov M., a kol. (2000), Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology* 146: 2395–407.
- Chandra J., Kuhn D.M., Mukherjee P.K., Lois L. Hoyer, T. McCormick, A. A. Ghannoum (2001), Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance, *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. p. 5385–5394.
- Chandra J., Mukherjee P. K., Leidich S. D., Faddoul F. F., Hoyer L. L., Douglas L.J. a Ghannoum M. A. (2001), Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J. Dent. Res.* 80:903–908.
- Christensen B.B., Haagenen J.A.J., Heydorn A. a kol. (2002), Metabolic commensalism and competition in a two-species microbial consortium. *Appl Environ Microbiol* 68:2495–2502.
- Jabra-Rizk M., W. A. Falkler a T. F. Meiller (2004), Fungal Biofilms and Drug Resistance. *Emerging Infectious Diseases* 10.
- Jayasinghearachchi H.S. a Seneviratne G. (2004), A bradyrhizobial- *Penicillium* spp. biofilm with nitrogenase activity improves N<sub>2</sub> fixing symbiosis of soybean; *Biol. Fertil. Soils* 40 432–434.
- Jayasinghearachchi H.S., Seneviratne G. (2004a), Can mushrooms fix atmospheric nitrogen? *J Biosci* 23:293–296.
- Jayasinghearachchi H.S., Seneviratne G. (2006), Fungal solubilization of rock phosphate is enhanced by forming fungal-rhizobia biofilms. *Soil Biol Biochem* 38:405–408.
- Jefferson K. K. (2004), What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol. Lett.* 236:163–173.
- Johansson J.F., Paul L.R. a Finlay, R.D. (2004), Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48, 1–13.
- Kefford B., Kjelleberg S. a Marshall K.C. (1982), Bacterial scavenging: utilization of fatty acids localized at a solid-liquid interface. *Arch. Microbiol.* 133: 257-260.
- Kotterman M. J. J., E. H. Vis, a J. A. Field (1998), Successive mineralization and detoxification of benzo[a]pyrene by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55 and indigenous microflora. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2853–2858.
- Kumamoto C.A. (2002), *Candida* biofilms. *Current Opinion in Microbiology.* 5:608–611.
- Lang E., Kleeberg I. a Zadrazil F. (1997), Competition of *Pleurotus* sp. and *Dichomitus squalens* with soil microorganisms during lignocellulose decomposition. *Biores. Technol.* 60, 95–99.
- Lang E., Kleeberg I., Zadrazil F., (2000), Extractable organic carbon and counts of bacteria near the Lignocellulose-soil interface during the interaction of soil microbiota and white rot fungi, *Bioresource Technology* 75, 57-65.
- Lang E., Zadrazil F. (1997), Lignocellulose decomposition and production of ligninolytic enzymes during interaction of white rot fungi with soil microorganisms. *Microb Ecol* 34:1–10.
- Lee A. K., Newman D. K. (2003), Microbial iron respiration: impacts on corrosion processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*; 62: 134-139.
- Lee A. K., Newman D. K., 2003: Microbial iron respiration: impacts on corrosion processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*; 62: 134-139.
- lignicolous and other fungi. *Can J Bot* 66:2505–2510.

- Mah T. F., a O'Toole G. A. (2001), Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 9:34–39.
- Mansfeld-Giese K., Larsen J., Bødker L. (2002), Bacterial populations associated with mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*, *FEMS Microbiology Ecology* 41, 133–140.
- Matz C., a S. Kjelleberg (2005), Off the hook—how bacteria survive protozoan grazing. *Trends Microbiol.* 13:302–307.
- Matz C., Bergfeld T., Rice S.A. a kol. (2004), Microcolonies, quorum sensing and cytotoxicity determine the survival of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to protozoan grazing. *Environ Microbiol* 6:218–226.
- Meyer J.R. a Linderman R.G. (1986), Selective influence on populations of rhizosphere or rhizoplane bacteria and actinomycetes by mycorrhizas formed by *Glomus fasciculatum*. *Soil Biol. Biochem.* 18, 191–196.
- Mittelman M. W., (1995), Biofilm development in purified water system; in Lappin-Scot H. M., Molin S., a T. Tolker-Nielsen (2003), Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14:255–261.
- Murray A.C. a Woodward S. (2003), In vitro interactions between bacteria isolated from Sitka spruce stumps and *Heterobasidion annosum*. *Forest Pathol.* 33, 53–67.
- Noguera, Pizarro, Stahl a Rittmann, 1999, Simulation of multispecies biofilm development in three dimensions, *Water Science and Technology Volume 39, Issue 7: 123–130.*
- Novotný Č., Rawald B., Bhatt M., Pavel M., Šašek V., Molitorish H.P. (2001), Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. *J. Biotechnol.* 89, 113–122.
- O'Toole G., Kaplan H.B., a Kolter R. (2000), Biofilm formation as microbial development, *Annu. Rev. Microbiol.* 54:49–79.
- O'Toole G.A. (2003), To build a biofilm. *J Bacteriol* 185: 2687–2689.
- Olsson P.A., Chalot M., Bååth E., Finlay R.D. a Söderström B. (1996), Ectomycorrhizal mycelia reduce bacterial activity in a sandy soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 21: 77–86.
- Olsson P. A. , Wallander H. (1998), Interactions between ectomycorrhizal fungi and the bacterial community in soils amended with various primary minerals, *FEMS Microbiology Ecology* 27: 195–205.
- Palmer R Jr, White DC. (1997), Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control. *Trends Microbiol.* 5(11):435–40.
- Palmer R.J. a Sternberg C. (1999), Modern microscopy in biofilm research: confocal microscopy and other approaches, *Current Opinion in Biotechnology*: 263–268.
- Papagianni M. (2004), Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol Adv* 22: 189–259.
- Parsek M.R., Singh P.K. (2003), Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* 57: 677–701.
- Peterson L., a kol. (2004), *Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology*. NRC Research Press.
- Pivnička a kol. (2004), *Výkladový slovník vybraných termínů z oblasti ochrany životního prostředí a ekologie.*
- Pointing S.B. (2001), Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 20–33.
- Raaijmakers J.M., Vlami M. a de Souza J.T. (2002), Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek* 81, 537–547. In de Boer, Larissa B. Folman, Richard C. Summerbell, Lynne Boddy (2005), Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development, *FEMS Microbiology Reviews* 29: 795–811.
- Rasmussen K. a Lewandowski Z. (2000), Microelectrode measurements of local mass transport rates in heterogeneous biofilms, *Biotechnology and Bioengineering*, 5, p. 302–309.
- Rickard A. H., McBain A. J., Ledder R. G., Handley P. S., Gilbert P. (2003), Coaggregation between freshwater bacteria within biofilm and planktonic communities. *FEMS Microbiol. Lett.*; 220; 1 133– 140.
- Seigle-Murandi F., Guiraud P., Croize' J., Falsen E. a Eriksso K.-E.L. (1996), Bacteria are omnipresent on *Phanerochaete chrysosporium* Burdsall. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 281–2477.
- Seneviratne G. (2003), Development of eco-friendly, beneficial microbial biofilms. *Curr Sci* 85:1395–1396.
- Seneviratne G., Tennakoon N.S., Weerasekara M. a kol. (2006), Polyethylene biodegradation by a developed *Penicillium-Bacillus* biofilm. *Curr Sci* 90:20–21.
- Sheldon a Small (2005), Immobilisation and biofilm development of *Phanerochaete chrysosporium* on polysulphone and ceramic membranes, *Journal of Membrane Science* 263, 30–37.
- Shimkets L.J., Brun Y.V. (1999), Prokaryotic development: strategies to enhance survival. In. LJ Shimkets, YV Brun Washington, DC. *Prokaryotic Development. Am. Soc. Microbiol.*, p. 1–7.
- Sidorova I.I. and Velikanov L.L. (2000), Bioactive substances of agaricoid basidiomycetes and their possible role in soils of forest ecosystems. I. Antibiotic activity of water extracts from basidiomes of several dominant agaricoid Basidiomycetes. *Mikol. Fitopatol.* 34: 11–17.
- SINGH H. (2006) *Mycoremediation: Fungal Bioremediation*. Wiley Interscience–John Wiley and Sons, Inc., Hoboken (NJ, USA)
- Stewart P. S. (1993), A Model of Biofilm Detachment. *Biotech. Bioeng.* 41(1): 111–117.
- Stewart P.S., Costerton J.W. (2001), Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358: 135–138.
- Stoodley P., Sauer K., Davies D.G., Costerton J.W. (2002), Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 56: 187–209.
- Sunil S. Adav, Duu-Jong Lee, Kuan-Yeow Show, Joo-Hwa Tay (2008), Aerobic granular sludge: Recent advances. *Biotechnology Advances* 26 (2008): 411–423.
- Szewzyk U. a Schink B. (1987), Surface colonization by and life cycle of *Pelobacter acidigallici* studied in a continuous flow microchamber. *J. Gen. Microbiol.* 134: 183–190.
- 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.

van Loosdrecht M.C.M., Heijnen J.J., Eberl H., Kreft J. a Picioreanu C. (2002), Mathematical modelling of biofilm structures, *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 245–256: 2002.

Van Schie P. a M. Fletcher (1999), Adhesion of biodegradative anaerobic bacteria to solid surfaces. *Applied and environmental mikrobiology* 12: 5082-5088.

Villena G.K. a Gutierrez-Correa M.(2007),Morphological patterns of *Aspergillus niger* biofilms and pellets related to lignocellulolytic enzyme productivities, *Letters in Applied Microbiology*. p.0266-8254.

Vyas B. R. M., Bakowski S., Šašek, V. a Matucha M. (1994), Degradation of anthracene by selected white rot fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 14: 65-70.

Wargo M.J., Hogan D.A. (2006), Fungal-bacterial interactions: A mixed bag of mingling microbes. *Curr Opin Microbiol* 9:359–364.

Wasserbauer R. (2000), Biologické znehodnocení staveb. *Nakladatelství ARCH*: 280.

Watnick P. a Kolter R. (2000), Biofilm, *City of Microbes*, *Journal of bacteriology*, p. 2675–2679.

Watnick P.I. a Kolter R. (1999), Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Molecular Microbiology*. 586-595.

Wheatley R.E. (2002), The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions, *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 357–364.

Wimpenny J., Manz W. a Szewzyk U. (2000), Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol Lett* 24: 661–671.

Witten T. A. a Sander L. M. (1983), Diffusion-limited aggregation, *Phys. Rev. B* 27: 5686–5697.

Wood, S. R., Kirkham J., Marsh P. D., Shore R. C., B. Nattress, a C. Robinson (2000), Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. *J. Dent. Res.* **79**:21–27.

Yim G., Wang H.H., Davies J. (2007), Antibiotics as signalling molecules. *Philos Trans R Soc London B* 362:1195–1200.

Zavahir J.S., Seneviratne G. (2007), Potential of developed microbial biofilms in generating bioactive compounds. *Res J Microbiol* 2:397–401.