

**UNIVERZITA KARLOVA**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra parazitologie**

Studijní program Biologie

Studijní obor BBI



Aneta Kubánková

**Prokaryotičtí symbionti prvoků ze střev  
dřevokazných švábů a termitů**

Prokaryotic symbionts of protists living in the intestine of wood eating  
cockroaches and termites

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Školitel: doc. Mgr. Vladimír Hampl, Ph.D.

Praha 2017

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli, doc. Mgr. Vladimíru Hamplovi, Ph.D., za všechnen čas, který věnoval této práci, a především za jeho trpělivost.

## **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 dne 14. 5. 2017

.....

## **Abstrakt**

Termiti a dřevokazní švábi jsou celosvětově úspěšnými skupinami hmyzu především díky jejich schopnosti efektivně trávit lignocelulózu. V jejich střevě se v průběhu dlouhé evoluce vytvořil komplexní ekosystém, ve kterém je zapojena široká škála mikroorganismů. Mnohé skupiny prvoků i prokaryot nalézáme výhradně v tomto unikátním prostředí a v laboratorních podmínkách je není možné kultivovat. Stejně tak, jako nižší termiti nemohou přežít bez svých eukaryotických endosymbiontů, úzké vazby panují i mezi jednobuněčnými eukaryoty a prokaryotickými buňkami kolonizujícími jejich cytoplazmu i plazmatickou membránu. Početné kmeny bakterií se podílejí na fixaci a maximálním zužitkování dusíku, syntéze mnohých aminokyselin, kofaktorů a vitamínů i na degradaci lignocelulózy. Prokaryota z domény Archea sehrávají klíčovou roli při závěrečných fázích fermentace lignocelulózy zužitkováním koncových produktů při metanogenezi. K pochopení těchto dějů výrazně přispívají metagenomické studie.

**Klíčová slova:** Ektosymbionti, endosymbionti, Bacteria, Archea, švábi, termiti, trávení celulózy

## **Abstract**

Termites and wood-eating cockroaches are worldwide successful especially because of their ability to digest lignocellulose efficiently. After a long period of coevolution a complex ecosystem of diverse microorganisms was established in their hindgut. A lot of lineages of flagellates live solely within this unique environment and it is impossible to cultivate them *in vitro*. As termites are unable to survive without their eukaryotic endosymbionts, also protists are strongly linked to prokaryotes colonizing their cytoplasm and cytoplasmic membrane. Numerous phyla of bacteria participate in nitrogen fixation and efficient nitrogen utilization, synthesis of amino acids, cofactors and vitamins. Some of them take part in the degradation of lignocellulose. Representatives of another domain of prokaryotes, Archea, are important in the final stages of lignocellulose fermentation, because they utilize the produced hydrogen gas in a process of methanogenesis. Large part of our knowledge about the composition and function of the termite gut biota was acquired thanks to metagenomic studies.

**Key words:** Ectosymbionts, endosymbionts, Bacteria, Archea, cockroaches, termites, cellulose digestion

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>1</b>
1.1	Proč zkoumat termity a jejich endosymbionty .....	2
<b>2</b>	<b>Termiti a dřevokazní švábi</b> .....	<b>3</b>
2.1	Dřevokazní švábi .....	5
2.2	Nižší termiti .....	5
2.3	Vyšší termiti .....	6
<b>3</b>	<b>Trávicí ústrojí</b> .....	<b>7</b>
<b>4</b>	<b>Eukaryotičtí endosymbionti termitů a dřevokazných švábů</b> .....	<b>8</b>
4.1	Oxymonády .....	9
4.2	Parabasalia .....	9
<b>5</b>	<b>Prokaryotičtí endosymbionti termitů a dřevokazných švábů</b> .....	<b>10</b>
5.1	Významné skupiny prokaryot vyskytující se ve střevech termitů .....	11
5.1.1	Spirochéty .....	12
5.1.2	Elusimicrobia (TG1) .....	12
5.1.3	Firmicutes .....	13
5.1.4	Bacteroidetes .....	13
5.1.5	Euryarchaeota .....	14
5.2	Endosymbiotická prokaryota .....	14
5.2.1	Význam endosymbiontů .....	15
5.3	Ektosymbiotická prokaryota .....	17
5.3.1	Význam ektosymbiontů .....	18
5.3.2	Napojení bakterií na povrch hostitele .....	18
5.3.3	Vliv absence prokaryotických symbiontů na hostitelskou buňku .....	19
<b>6</b>	<b>Metabolické procesy zahrnující prokaryotické symbionty</b> .....	<b>21</b>
6.1	Fixace dusíku .....	21
6.2	Metanogeneze .....	22
<b>7</b>	<b>Metody výzkumu prokaryotických endosymbiontů</b> .....	<b>22</b>
<b>8</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>23</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použité literatury</b> .....	<b>25</b>

## 1 Úvod

Endosymbionti – organizmy, které žijí uvnitř těla jiného (hostitelského) organismu – hrají významnou roli v trávicím traktu naprosté většiny býložravců napříč celou živočišnou říší. Jsou nepostradatelní při zpracování přijímané potravy. Krásný příklad mutualistické symbiózy nacházíme u křečka Stephensova (*Neotoma stephensi*), který konzumuje výhradně semena či listy jalovce. Tyto části však obsahují velké množství toxinů, které by byly pro jeho játra příliš velikou zátěží. Vypořádat se s těmito sekundárními rostlinnými metabolity mu pomáhá právě specializovaná střevní mikrofóra (Sorensen, Turnbull a Dearing 2004).

Mikroorganizmy, přítomné ať už ve střevech či žaludku, se podílejí především na trávení obtížně zpracovatelných rostlinných polysacharidů (celulózy, hemicelulózy, pektinu) a ligninu. Z těchto látek má největší podíl na stavbě rostlinných pletiv celulóza. Ta vytváří obrovské struktury spojením stovek molekul D-glukózy  $\beta$  (1-4) glykosidovými vazbami do vláken (lineární polymer) a dále do mikrofibril – kompaktních svazků po 36 vláknecích. Jen málo organismů produkuje enzymy schopné provést energeticky vysoce náročnou hydrolyzu této odolné a ve vodě nerozpustné organické sloučeniny. Možnost stravovat se výhradně potravou rostlinného původu získává mnoho živočichů až po vytvoření asociace s celulolytickými organizmy, jako jsou nejrůznější typy bakterií, hub či prvoků, které disponují celulázami (rodinou enzymů schopných hydrolyzovat glykosidové vazby v celulóze).

Typickými živočichy hostícími ve svých útrokách mikroorganizmy s těmito schopnostmi jsou například přežvýkavci (Ruminantia). V jejich batoru (rumen) sídlí jak četné skupiny striktně anaerobních prokaryot (*Bacteroides*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Methanobacterium*), tak prvoků (Entodiniomorpha: *Ophryoscolex* a *Entodinium*, Vestibuliferida) nebo hub (Chytridiomycota: *Neocallimastix*). Jejich pomocí mohou hostitelé využít 30 – 40 % polysacharidů ze své stravy (Puniya, Singh a Kamra 2015).

Mnohem účinnější systém trávení však mají nižší termiti a dřevokazní švábi. Za pomoci endosymbiontů zužitkují téměř všechny složky své většinou nepřilíš pestré potravy. Zároveň se řadí mezi nevelkou skupinu živočichů, kteří disponují i vlastními celulázami. Ve své bakalářské práci bych ráda shrnula významné dosavadní poznatky o této skupině hmyzu s důrazem na diverzitu prokaryot žijících v symbióze se střevními prvoky a roli těchto organismů v ekosystému střev.

## 1.1 Proč zkoumat termity a jejich endosymbionty

Mikroorganismy nalézající se v trávicím ústrojí termitů spadají do všech tří domén – Eukaryota, Bakterie i Archea. Jejich více než 100 milionů let dlouhá koevoluce v těle termitů je doložena například fosilním nálezem termita z čeledi Kalotermitidae ze spodní křídy (Wier et al. 2002; Poinar 2009). Díky přítomnosti pestré mikrobioty se mohou odehrávat ve střevech tohoto hmyzu četné procesy včetně degradace lignocelulózy, fixace dusíku, recyklace dusíku z kyseliny močové, metanogeneze a udržování nízkého redukčního potenciálu (Breznak 2000). Přínos konkrétních převážně bakteriálních linií na mechanismy metabolismu je objasněn zatím jen v několika případech. Všechny další poznatky tak mohou být velmi prospěšné pro vývoj biotechnologií využívajících některé z výše uvedených procesů.

Vzhledem k tomu, že celulóza je nejhojnějším, avšak zároveň jedním z nejodolnějších biopolymerů v biosféře, jsou v hospodářství tendence k jejímu co nejlepšímu zužitkování. Proto se hledají cesty účinné biotechnologické degradace celulózy. Jednou z nich je například izolace celulolytických genů z bakterií, ale i z eukaryot, s následným začleněním do dalších organismů (např. *Saccharomyces cerevisiae*). Tyto organismy s účinnější celulázovou aktivitou se pak mohou podílet například na biokonverzi lignocelulóзовého odpadu (použitého papíru, přebytků dřevařství, zemědělství) na bioethanol (kapalné biopalivo vyráběné pomocí alkoholového kvašení), kdy dochází k využití celulóзовé složky biomasy (Balat 2008; Čalová 2015).

Přestože prokaryota ve střevech termitů nehrají konkrétně při trávení celulózy tak esenciální roli, jak se dlouhou dobu předpokládalo, celulolytické geny několik zástupců prokaryot z rodů *Clostridium*, *Fibrobacter* či *Bacillus* skutečně kóduje (Wenzel et al. 2002). Možnost uplatnění v biotechnologiích se naskýtá i dalším termitím endosymbiontům. Bakterie bývají katalyzátory mnoha metabolických reakcí a jejich geny mohou být potenciálním zdrojem průmyslově využitelných enzymů. Díky metagenomice a ostatním moderním metodám je možné geny získat, aniž by musel být organismus kultivován (Thomas, Gilbert a Meyer 2012). Některé linie metanogenních archeí se již využívají při čištění odpadních vod nebo při výrobě bioplynu (Tabatabaei et al. 2010).

Se schopností strávit prakticky cokoli, co je rostlinného původu, včetně pěstovaných plodin a stromů, a díky jejich kosmopolitnímu výskytu, jsou termiti obávaným nepřítelem zemědělců i lesníků. Svou činností ohrožují cenné dřevěné stavby

i knihy. Na boj s termity jsou proto ročně vynakládány desítky miliard dolarů. Za škůdce však může být považován jen zlomek z jinak druhově početné skupiny termitů (např.: *Reticulitermes* a *Coptotermes*). Celkový přínos tohoto hmyzu k fungování ekosystému je spíše pozitivní.

Kolonie termitů výrazně přispívají k dekompozici odumřelého organického materiálu v různých fázích humifikace. Chemické látky získané z celulózy a rostlinného detritu se tak mohou dostat zpět do ekosystému převážně ve formě těl termitů. Termiti mají také pozitivní vliv na krajinu. Jejich rozsáhlý systém chodeb v půdě umožňuje dešťové vodě vsáknout se hlouběji a snižuje tak rychlost odtoku vody z krajiny a erozi půdy. Často diskutovaný je vliv termitů na globální oteplování vzhledem k jejich schopnosti produkovat skleníkové plyny CO<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub> (Sugimoto, Bignell a MacDonald 2000).

## 2 Termiti a dřevokazní švábi

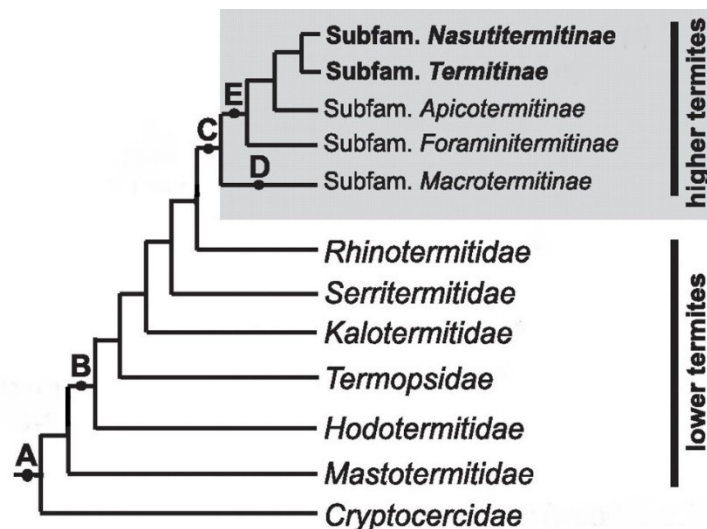
Teprve v nedávné době bylo prokázáno, že termiti jsou vnitřní skupina dřevokazných švábů (Inward, Beccaloni a Eggleton 2007). Prvními náznaky blízké příbuznosti byla morfologická podoba jejich nymf, pohlavních jedinců a zároveň eukaryotických i prokaryotických endosymbiontů. Pozornost vzbudilo především to, že dřevokazný šváb rodu *Cryptocercus* má stejně tak jako nejprimitivnější skupina termitů – Mastotermitidae – v buňkách tukového tělesa (mycetocytech nebo bacteriocytech) usídlené bakterie rodu *Blattabacterium* (Obr. 1 – B). K určení blízké příbuznosti mezi termity a dřevokaznými šváby rodu *Cryptocercus* došlo následně na základě molekulárně fylogenetických studií. Usuzuje se, že rod *Cryptocercus* je dokonce příbuznější termitům než ostatním druhům švábů (Eggleton 2001). K oddělení termitů došlo zhruba před 140 až 160 miliony let (Zhang a Leadbetter 2012).

Již prapředek dřevokazných švábů a termitů – zástupce skupiny Dictyoptera – získal výhodu oproti svým nejbližším příbuzným v podobě vytvoření mutualistické symbiózy s mikroorganismy schopnými nejen trávení lignocelulózy (Obr. 1 – A). Prapředek tak mohl využívat nové potravní zdroje, nebo ty dosavadní lépe zužitkovat. Stalo se tak pravděpodobně v důsledku koprofágie. Četným bakteriím a protistům, kteří již výkaly býložravců osidlovali a činili je tak pro hmyz stravitelnějšími, vyhovovaly stabilní podmínky uvnitř zadního střeva detritivorů. Především dvě hlavní skupiny prvoků (Parabasalia a Oxymonadida) se tak staly nedílnou součástí metabolismu tzv.

nižších termitů. Metanogenní archea, bakterie (převážně spirochéty) jsou od té doby typickou součástí intestinálního traktu všech později oddělených skupin hmyzu (Bandi et al. 1995).

V procesu následné koevoluce s mikroorganismy hrála významnou roli proktodeální trofolaxe, tj. konzumace exkrementů ostatních termitů. Pomocí tohoto procesu dochází k osídlení střeva mladých jedinců endosymbionty. Běžný jev je to i u dospělých jedinců, kteří tak ještě více zefektivňují příjem všech potřebných látek přítomných v jejich chudé stravě. U skupin švábů, které nejsou sociální, vytváří prvoci vycházející spolu s exkrementy z těla cysty. V nich přečkají nepříznivé období mimo svůj tradiční habitat, než se dostanou společně s potravou do těla nového hostitele (Nalepa, Bignell, a Bandi 2001).

Dalším významným bodem ve vývoji termitů byla ztráta bičíkatých eukaryotických endosymbiontů a s tím úzce související změna stravy. Původně převážně lignocelulózu (dřevo, suchá tráva) konzumující termiti rozšířili svůj jídelníček o výrazně pestřejší a stravitelnější půdní substrát (Obr. 1 - C). Před 50 až 80 miliony let tak vznikla nová skupina termitů – čeled' Termitinae, tradičně nazývaná též vyšší termiti (Xinning Zhang a Jared R. Leadbetter 2012). I vyšší termiti využívají mikroorganismy, které jim ulehčují zpracování potravy a umožňují fixaci dusíku (Gaku Tokuda, Lo a



Watanabe 2005).

**Obr. 1.** Znárodnění klíčových událostí v evoluci dřevokazných švábů a termitů

A Schopnost fermentace lignocelulózy v zadním střevě – vytvoření asociace s prvoky

B Ztráta bakterií rodu *Blattabacterium*

C Ztráta bičíkatých eukaryotických endosymbiontů



D Mutualismus s houbami rodu *Termitomyces*

E Vyšší variabilita ve stravování

Převzato z (Zhang a Leadbetter 2012)

## 2.1 Dřevokazní švábi

Poměrně známý rod *Cryptocercus* není jediným z řádu Blattodea, který využívá dřevo jako snadno dostupný zdroj potravy. Také vzdáleně příbuzné rody *Panesthia* a *Parasphaeria* hostí ve svém střevě několik druhů eukaryotických endosymbiontů, nápomocných při trávení lignocelulózy (Wang, Wang a Che 2014; Berlanga et al. 2016). Zajímavé je, že všechny tři rody žijí ve značně odlišných částech světa (*Cryptocercus* – Východní Asie, Severní Amerika; *Panesthia* – Austrálie, Severní Amerika; *Parasphaeria* – Jižní Amerika). Vliv na celosvětový úspěch dřevokazných švábů má bez pochyby nejen přítomnost eukaryotických, ale i četných prokaryotických organismů. Charakteristickými bakteriálními skupinami uvnitř jejich těl jsou spirochéty a kmene *Bacteroidetes* a *Deltaproteobacteria* vyskytující se převážně ve střevech (Berlanga et al. 2016). Zástupce kmene *Bacteroidetes* – již zmiňované *Blattabacterium* se nachází v tukovém tělesu (Brooks 1970).

Švábům rodu *Cryptocercus* je v mnohém podobný *Mastotermes darwiniensis*, poslední žijící zástupce bazální čeledi Mastotermitidae. Tato čeleď má jako jediná stále přítomné intracelulární symbionty – bakterie rodu *Blattabacterium*, které jim, stejně tak jako švábům, pravděpodobně napomáhají v hospodaření s dusíkem. Předávány jsou dalším generacím vertikálně z rodičů na potomky (Claudio Bandi a Sacchi 2000).

## 2.2 Nižší termiti

Nižší termiti je souhrnné označení šesti nejhluběji se větvících čeledí termitů (Mastotermitidae, Hodotermitidae, Termopsidae, Kalotermitidae, Serritermitidae a Rhinotermitidae) (Obr. 1). V dnešní době jsou snad nejlépe prozkoumaným hmyzem, co se symbiotických interakcí týče. Objev prvoků v jejich trávicím traktu roku 1877 byl chápán nejprve jako přítomnost parazitů (Leidy 1877). To, že jsou tyto eukaryotické organizmy nezbytné pro trávení celulózy, dokázal poprvé až v roce 1923 Cleveland pomocí několika pokusů, při kterých termiti po odstranění jejich eukaryotických endosymbiontů po několika týdnech vyhladověli i přes to, že se jejich strava nijak nezměnila. Naprostá většina těchto endosymbiontů spadá do dvou anaerobních linií – Oxymonadida a Parabasalia (viz kapitola 4) a žije v úzkém vztahu s episymbiotickými a endosymbiotickými prokaryoty.

## 2.3 Vyšší termity

Doposud bylo popsáno téměř 3000 druhů termitů. Dle různých zdrojů tvoří z tohoto počtu 60–80 % jediná čeleď Termitidae. Centrum diverzity této skupiny se nachází především v tropickém a subtropickém pásu, v tropických lesích a v savanách, kde se naskýtá široká nabídka potravních zdrojů. Typickou potravou je pro většinu vyšších termitů zemina v různých stádiích humifikace, ale některé skupiny se vrátily i k výhradní konzumaci dřeva (G. Tokuda et al. 1997). Vzhledem k absenci eukaryotických symbiontů a větší variabilitě potravy (Obr. 1 – E) musel jejich trávicí systém projít mnohými změnami. Působení pestré skladby prokaryot v metabolických procesech je pro vyšší termity ještě významnější než pro nižší termity. Obecně platí, že jejich zadní střevo je delší, členěné na mnoho komůrek a pH uvnitř se pohybuje okolo pH 12 (Bignell a Eggleton 1995). Jedinci musí spoléhat více na vlastní trávicí enzymy (endoglukanázy, exoglukanázy,  $\beta$ -glukosidázy) obsažené v sekretu slinných žláz a epitelu středního střeva (G. Tokuda et al. 1997). Každá skupina v rámci čeledi Termitidae má trávicí trakt specificky uzpůsobený. Výrazně odlišnou strategii při zpracování potravy používá Macrotermitinae.

Macrotermitinae je zvláštní skupinou z čeledi Termitidae žijící v subtropické a tropické části Asie a Afriky (Karun a Sridhar 2013). Zahrnuje 14 rodů a 330 druhů. Stejně jako všichni zástupci nižších termitů těží ze symbiózy s dalším eukaryotickým organizmem. Pro jednodušší získání živin ze dřeva využívají lignikolní houbu rodu *Termitomyces* (Basidiomycota) (Obr. 1 – D), které se snaží po celý rok vytvořit co nejlepší podmínky pro růst mycelia. Ve speciálních komůrkách s výkaly a s jiným zavlečeným celulóзовým a lignocelulóзовým substrátem je udržována konstantní teplota okolo 30° C a vyšší koncentrace oxidu uhličitého (Aanen et al. 2002). Díky tomu může mycelium vytvářet speciální útvary obalené konidiemi zvané gongylidia, která jsou bohatá na dusík, cukry a enzymy (celulázy a xylanázy) (Aanen et al. 2002). Tyto útvary termity konzumují a zdroj potravy tak mají k dispozici po celý rok. Houba dokonce napomáhá i se zpracováním substrátu, se kterým do styku vůbec nepřišla, a to svými exoenzymy. Ty jsou houbou vylučovány do substrátu, kterým prorůstá a obsahují je i gongylidia. Jakmile se dostanou enzymy spolu s kontaminovaným substrátem do kontaktu s nedotčeným dřevem v zaživacím traktu termita, umožňují trávit i jinak nestravitelnou čerstvou dřevní hmotu. Vzhledem k tomu, že vyšší termity nemají

jednobuněčné eukaryotické symbionty, nebudu se ve své práci této skupině více věnovat.

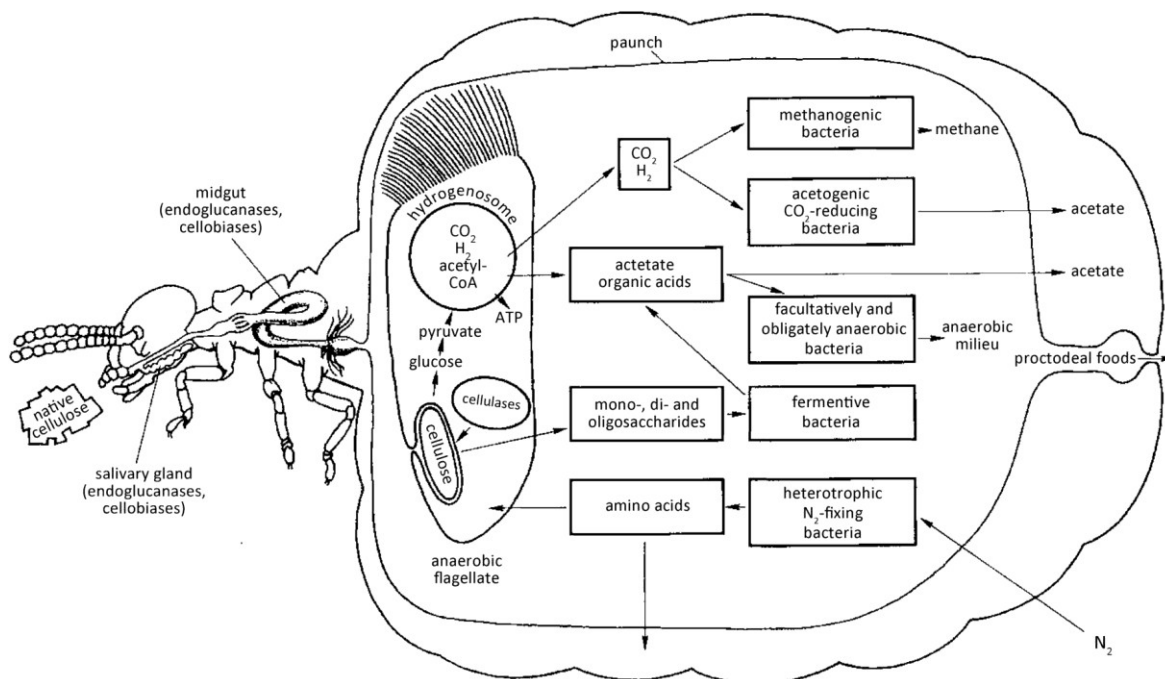
### 3 Trávicí ústrojí

Trávicí ústrojí termita je pro zpracování rostlinné, převážně lignocelulózové potravy, dobře uzpůsobeno (Obr. 2). Potrava je nejprve nadrcena za pomoci čelistí (mandibul) a proventrikulu (svalnatého předžaludku) na drobné části o velikosti 20–100  $\mu\text{m}$ , zároveň je dodáván ze slinných žláz sekret s endo- $\beta$ -1,4-glukanázou. Přítomnost tohoto enzymu štěpícího řetězce celulózy na náhodných místech uprostřed byla ve slinných žlázách nižších termitů poprvé prokázána u *Reticulitermes speratus* (Yamaoka a Nagatani 1975) a následně i u dalších skupin nižších termitů a dřevokazného švába rodu *Cryptocercus*. Trávenina dále prochází předním a středním střevem, kde se přidávají další z enzymů termita a dochází ke vstřebávání glukózy. Prostředí celého trávicího traktu je pH neutrální až mírně zásadité (Noirot 2001).

Nejdůležitější částí trávicího traktu je proctodeum (zadní střevo). Je výrazně rozšířené, což zapříčiňuje pomalejší průchod tráveniny, a tak i její delší vystavení trávicím enzymům (endoglukanázám, exoglukanázám). Právě zde se do procesu trávení zapojují četné anaerobní (metanogeni), ve značné míře ale i aerobní (někteří zástupci bakteriálního kmene Proteobacteria) a mikroaerofilní organizmy (např. řád bakterií Lactobacillales) (Schultz a Breznak 1978; Bauer et al. 2000; M. Wenzel et al. 2002). Zadní střevo je totiž skutečně anaerobní pouze v centru, okrajové části střeva jsou aerobní nebo mikroaerobní (Brune, Emerson a Breznak 1995). Proto se i mikrobiální skladba v různých jeho částech liší a mnohé procesy jsou neustálým přísunem kyslíku ovlivněny.

Naprostá většina dřevních částic je již v anteriorní části proctodea pozřena prvoky. Ti částice zabudují do svých potravních vakuol, kde působením silných celuláz zbylé polysacharidy depolymerizují na jednodušší cukry. Soli odvozené od krátkých mastných kyselin (acetát, butyrát a propionát) – hlavní produkty mikrobiální fermentace a energetické zdroje hostitele – jsou vstřebávány. Zbývající na lignin bohaté látky odchází z těla termita jakožto exkrementy. Při fermentaci lignocelulózy dochází také k uvolňování metanu.

Kromě pozřených dřevních částic využívá termít jako potravní zdroj i odumřelé buňky endosymbiontů – mikrobiální biomasu, která je mimo jiné bohatá na nedostatkový prvek dusík (Brune 2014).



**Obr. 2.** Znárodnění trávicího traktu nižších termitů, biochemických dějů v něm probíhajících a přítomných endosymbiontů  
Převzato z (Radek 1999)

#### 4 Eukaryotičtí endosymbionti termitů a dřevokazných švábů

Všichni zástupci nižších termitů a dřevokazných švábů hostí ve svém trávicím traktu jednotky až desítky druhů anaerobních nebo mikroaerofilních eukaryotických symbiontů. Prapředek termitů a dřevokazných švábů rodu *Cryptocercus* pravděpodobně získal několik druhů eukaryotických endosymbiontů, kteří se dále v průběhu dlouhé evoluce sekundárně ztráceli, vyvíjeli a štěpili na nové druhy. Doposud bylo popsáno cca 500 druhů s termity asociovaných protistů náležících do říše Excavata, konkrétněji do skupin Oxymonadida a Parabasalia, a jejich počet může dále narůstat (König 2006). Žádného zástupce se zatím nepodařilo kultivovat.

Každý druh těchto protistů má odlišnou roli při trávení lignocelulózové potravy. Větší a středně veliká protista (*Trichonympha*) se podílejí především na trávení lignocelulózy, jelikož jsou schopna pojmout do svých potravních vakuol termity již nadrcené a natrávené dřevní částice. Některé celulázy, které se podílejí na degradaci pozřetých částic, měla protista již v počátečních stádiích asociace s termity, jiné získala v průběhu evoluce laterálním genovým přenosem od okolních bakterií (Todaka et al. 2010). Menší protista využívají k získání potřebných živin rozpustných látek obsažených ve střevním fluidu, konzumují i bakteriální buňky (Brune 2014).

Prvoci se vyskytují v zadním střevě termitů ve velkých počtech, tvoří tak i více než polovinu váhy svého hostitele (Katzin a Kirby 1939). Vzhledem k velikosti termitů a délce jejich střev trvá průchod tráveniny celým systémem pouhých 24 hodin (Tokuda et al. 2014). Aby se v tomto dynamickém prostředí snáze udrželi, mají některé druhy vyvinuté mikrotubulární rostellum nebo mikrofibrilární „holdfast“, které slouží buňce k přichycení ke střevní stěně hmyzího hostitele, jiné druhy se brání vyplavením z těla hostitele aktivním pohybem vyvolaným aktivitou početných bičíků (Lee, Leedale a Bradbury 2000).

Kromě již zmíněných dvou převládajících skupin jednobuněčných eukaryot se v pestrém ekosystému termitího střeva vyskytují také kvasinky (např.: *Candida*, *Debaryomyces*, *Sporothrix*, *Cryptococcus*), které mají také podíl na degradaci celulózy a hemicelulózy (Prillinger et al. 1996).

#### 4.1 Oxymonády

Jsou stále jednou z nejzáhadnějších a nejméně prozkoumaných skupin exkavátních protist. Doposud bylo popsáno cca 150 druhů oxymonád z pěti rodin Polymastigidae, Saccinobaculidae, Pyrsonymphidae, Streblomastigidae, a Oxymonadidae z nichž někteří zástupci osidlují i jiné prostředí než trávicí trakt termitů a dřevokazných švábů. Přítomnost oxymonády *Monocercomonoides* byla prokázána i u nejrůznějších skupin obratlovců (Hampl 2016).

Ačkoliv se předpokládá, že větší druhy (*Pyrsonympha*) pomáhají trávit lignocelulózu, role oxymonád v celém ekosystému termitího střeva není zcela objasněna. Jejich buňky nebývají příliš pohyblivé, často bývají přichycené ke stěně střeva.

Zajímavostí je, že u některých oxymonád došlo k naprosté ztrátě mitochondriální organely, což nebylo popsáno ještě u žádného jiného organismu (Karnkowska et al. 2016). Prokázán nebyl ani výskyt hydrogenozómů, peroxizómů a Golgiho komplexu.

#### 4.2 Parabasalia

Skupina parabasalia v trávicím traktu termitů nad oxymonádami početně převládá. Je také více prozkoumaná převážně proto, že zahrnuje významné lidské patogeny (např. *Trichomonas vaginalis*). Buňky nepostradatelných termitích endosymbiontů, kteří prokazatelně napomáhají s trávením jejich lignocelulózové potravy, jsou často obrovské a dobře pohyblivé. Charakteristické zmnožené bičíky v

pohybu napomáhají, parabasalia jsou tak úspěšná v kompetici o potravní zdroje. Další typickou organelou parabasálií jsou hydrogeozómy (Lee, Leedale a Bradbury 2000).

## 5 Prokaryotičtí endosymbionti termitů a dřevokazných švábů

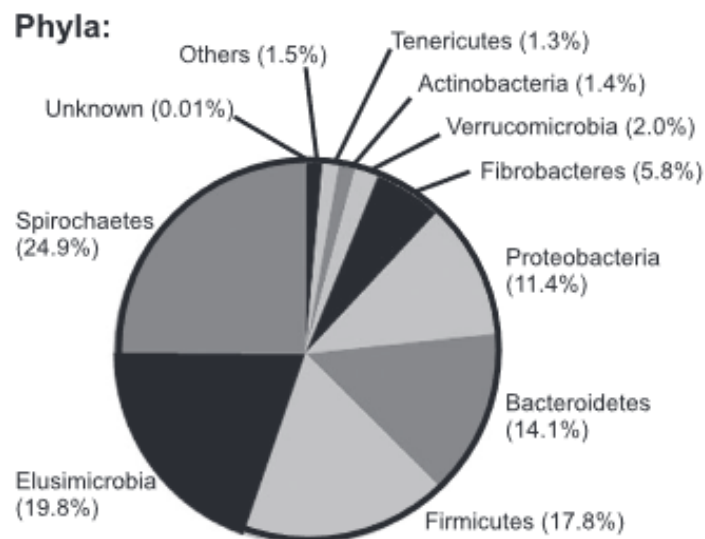
Prokaryotické buňky uvnitř trávicího ústrojí nižších termitů se vyskytují napojené na střevní epitel i volně ve fluidu střeva, většina (cca 85 %) je ale asociována s prvky – kolonizují jejich plazmatickou membránu, cytoplazmu i jádro (Berchtold et al. 1999). Eukaryotické buňky bývají zpravidla osídleny i několika různými hostitelsky specifickými prokaryotickými liniemi. Vzhledem k jejich úzce vyhraněným nárokům na vlastnosti prostředí, které je téměř nemožné v laboratorním prostředí simulovat, bylo značně složité tyto organizmy studovat.

S příchodem moderních metod výzkumu prokaryotických organizmů se mnohonásobně rozšířily obzory studia diverzity i funkce bakterií a archeí obývajících trávicí trakt termitů. Rozložení bakteriálních skupin se v různých částech trávicího traktu liší (Ebert a Brune 1997). Díky metagenomice je teoreticky možné získat téměř kompletní sekvence všech organizmů vyskytujících se v celém termitím střevě a tím pádem i komplexnější náhled na celý ekosystém zahrnující termita a jeho endosymbionty. Významnou výhodou je, že není nezbytná kultivace těchto organizmů (Riesenfeld, Schloss a Handelsman 2004). I přes intenzivní výzkum však zbývá objasnit identitu a funkci mnoha termitích prokaryot (Tai et al. 2015).

Přínosem metagenomiky jsou četné studie zaměřené na zjištění poměrného zastoupení jednotlivých skupin prokaryot. Přestože mikrobiální skladba se druh od druhu termita liší, níže zmíněné dominantní skupiny bakterií se vyskytují téměř u všech zástupců termitů a dřevokazných švábů. Například v lumen střeva *R. flavipes* bylo popsáno 4761 fylogentypů prokaryotických symbiontů, z nichž 99 % spadá do domény Bacteria a pouhé 1 % do domény Archea. Pyrosekvenování odhalilo přítomnost bakterií z 19 různých kmenů včetně významných skupin Spirochaetes (24.9 %), Elusimicrobia (dříve TG1) (19.8 %), Firmicutes (17.8 %), Bacteroidetes (14.1 %), Proteobacteria (11.4 %), Fibrobacteres (5.8 %) a další (Obr. 3) (Boucias et al. 2013). Záhadou stále zůstává, zda a jak se změní druhová skladba endosymbiontů při změně potravy. Dosavadní výzkumy naznačují, že ekosystém uvnitř termitů je spíše stabilní a že k žádným výrazným změnám nedochází (Boucias et al. 2013).

Ze studia genomů mnohých zástupců prokaryot vyplývá, že syntetizují mnohé

aminokyseliny, vitamíny a kofaktory a napomáhají s fixací dusíku, v jisté míře i degradací lignocelulózy (celodextrinu) (Gaku Tokuda et al. 2014; Strassert et al. 2016). Zároveň se podílejí na ochraně termita před ostatními patogenními bakteriemi a invazivními houbami (např. *Metarhizium anisopilae*) (Chouvenc, Su a Robert 2009; Sen et al. 2015).



**Obr. 3.** Grafické znázornění druhového složení prokaryotických symbiontů v *R. flavipes* na úrovni kmenů

Převzato z (Boucias et al. 2013)

### 5.1 Významné skupiny prokaryot vyskytující se ve střevech termitů

V této kapitole se pokusím přinést základní informace o několika v termitím střevě často se vyskytujících prokaryotických kmenech. V každé skupině obvykle převládá některý z možných druhů lokalizace – na povrchu nebo uvnitř buněk protist, či volně ve střevě. Není ovšem výjimkou, že se zástupci převážně ektosymbiotické skupiny v některých případech nacházejí intracelulárně a naopak. Podrobnější popisy ekto- a endosymbiotických vztahů prokaryot s protisty i s konkrétními příklady jsou dále uvedeny v kapitolách 5.2 a 5.3.

V termitím střevě se vyskytuje velké množství prokaryot (4761 fylogentypů v *R. flavipes*). S prvky jich je asociovaná většina, přesto je pravděpodobně vyšší diverzita mezi prokaryoty vyskytujícími se volně ve střevě a to v důsledku většího množství potenciálních nik vytvořených v důsledku gradientu kyslíku, vodíku a

metabolitů (Yang et al. 2005).

### 5.1.1 Spirochéty

Významnou skupinu bakterií uvnitř trávicího ústrojí termitů tvoří spirochéty. Jedná se o širokou skupinu gramnegativních bakterií, která zahrnuje rody od aerobních (*Leptospira*) přes mikroaerofilní (*Borellia*) po striktně anaerobní rod *Treponema*, jehož nejbližší příbuzní se vyskytují právě i v zadním střevě xylofágního hmyzu (Breznak 2002). Předpokládá se, že první zástupci tohoto kmene v termitím střevě byly volně pohyblivé buňky, které až druhotně přisedly a v mnoha případech utvořily asociaci s prvky. Ukázalo se, že rod *Treponema* se vyskytuje pětikrát častěji ve frakci střeva obsahující prvky než ve frakci proctodeální stěny termita *Reticulitermes flavipes* (Yang et al. 2005). Některé skupiny spirochét jsou hostitelsky specifické, jiné kolonizují větší počet různých druhů prvků.

Buňky spirochét jsou výrazně protáhlé (3 až 100  $\mu\text{m}$  dlouhé a jen 0,2 až 1  $\mu\text{m}$  široké), spirálovité, pohyblivé a ve většině případů napojené na povrch prvka. Od ostatních bakterií jsou rozlišitelné téměř na první pohled, oproti tomu však mohou být v jistých případech snadno zaměněny za vlastní součásti buněk eukaryotických, jako jsou bičíky a brvy. Některé spirochéty pohybovou funkci těchto eukaryotických struktur skutečně suplují. Nejznámějším příkladem jsou ektosymbiontní spirochéty *Mixotricha paradoxa*, prvka nalézajícího se pouze v australském termitovi *M. darwininensis* (Cleveland a Grimstone 1964; Marika Wenzel et al. 2003). Kromě této ne příliš obvyklé role se především endosymbiotické spirochéty podílejí na acetogenezi a fixaci dusíku (Ohkuma et al. 2015).

### 5.1.2 *Elusimicrobia* (TG1)

První zástupce striktně anaerobní bakteriální skupiny *Elusimicrobia* byl získán ze střeva *R. speratus*, kde žil v mutualistickém vztahu s celulózu fermentujícími protisty (Hongoh, Ohkuma a Kudo 2003). Další zástupci byli následně objeveni u většiny nižších termitů i u dřevokazných švábů rodu *Cryptocercus*. Dlouhý čas byli považováni za skupinu žijící výhradně uvnitř buněk větších eukaryotických endosymbiontů termitů, proto také nesli dnes již zastaralé označení Termite group 1 (TG1). To se však změnilo s objevem zástupců téhož kmene v intestinálních traktech jiného hmyzu a dokonce i v dalších anoxických prostředích (sedimenty, bahno) (Herlemann, Geissinger a Brune 2007).

Existence nového gramnegativního kmene, ostatním bakteriálním liniím



vzdáleně příbuzného, byla dlouhou dobu podložena jen sekvencemi 16S rRNA genů, jelikož všichni zástupci *Elusimicrobia* vzdorovali kultivaci. První úspěšný pokus byl uskutečněn v roce 2009 (Herlemann). *Elusimicrobium minutum* strain Pei191<sup>T</sup> bylo kultivováno z larvy *Pachnoda ephippiata*, brouka z čeledi Scarabeidae. *E. minutum* vykazuje typický fermentativní metabolismus – k získání energie využívá cukry, které dále přetváří převážně na acetát, H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, alanin a ethanol (Herlemann et al. 2009).

Zástupci ze střev termitů spadající do třídy *Endomicrobia* jsou většinou malé vřetenovité buňky (v průměru 0,6 μm dlouhé a 0,3 μm široké) nalézající se intracelulárně ve velkých počtech v cytoplazmě oxymonád i parabasalíí, kde jsou obklopeni dvěma membránami pravděpodobně bakteriálního původu (obr. 4) (Ikeda-Ohtsubo et al. 2007; Stingl et al. 2005). Jedni z prvních popsanych zástupců jsou například *Candidatus Endomicrobium pyrsonymphae* rovnoměrně se vyskytující v cytoplazmě *Pyrsonympha vertens* a *Ca. Endomicrobium trichonymphae* vytvářející cylindrický límec kolem jádra *Trichonympha agilis* (Stingl et al. 2005). Na základě četnosti těchto hostitelů ve střevě *R. flavipes* se uvádí, že zástupci kmene *Elusimicrobia* tvoří více než polovinu všech prokaryot v tomto druhu termita, tj.  $3 \cdot 10^6$  až  $4 \cdot 10^6$  buněk z kmene *Elusimicrobia* v celém střevě (Stingl et al. 2005).

### 5.1.3 Firmicutes

Ze všech bakteriálních skupin mají firmicuta největší podíl na trávení dřevní hmoty. Tento grampozitivní kmen je velice diverzifikovaný a zahrnuje významné celulolytické skupiny včetně Bacilli a Clostridiales, které se hojně vyskytují i v trávicích traktech přežvýkavců, kde plní stejnou funkci jako u termitů (Leschine 1995; König 2006). Ve střevech termitů se vyskytují například lignocelulolytické *Clostridium jejuense*, *C. populeti* a *C. saccharolyticum* (Wenzel et al. 2002). Bacilli se podílí na degradaci polysacharidů (hemicelulózy i celulózy) a aromatických složek stravy termitů (König 2006). Termití zástupci, kteří žijí převážně přichyceni k epitelu jejich trávicího traktu, jsou na rozdíl od striktně anaerobních příbuzných v batoru přežvýkavců fakultativně anaerobní, mikroaerofilní a někteří dokonce i aerobní.

### 5.1.4 Bacteroidetes

Další skupinou bakterií je gramnegativní kmen Bacteroidetes, konkrétněji řád Bacteroidales. Tyto prokaryotické buňky se často napojují na povrch bičíkovců, ale vyskytují se i intracelulárně. Mají protáhlý tvar a snad proto byly na úkor studia spirochét dlouho přehlíženy. V termitovi *R. speratus* (Rhinotermitidae) žijícím v

Japonsku tvoří tento řád dominantní bakteriální skupinu. V domnění, že se jedná o spirochéty, nebo o buněčné struktury prvoka, byly na jejich základě rozlišovány jednotlivé druhy rodu *Dinenympha* (Iida et al. 2000). Až moderními metodami (FISH) bylo prokázáno, že signál pocházející z přívěšků na povrchu buňky tohoto prvoka značí přítomnost ektosymbiotické bakterie zcela jiného kmene – *Ca. Symbiothrix dinenymphae* (Hongoh et al. 2007). Výskyt dalších zástupců řádu Bacteroidales a jejich asociace jak s oxymonádami tak s parabasalidy byla prokázána i v mnoha dalších termitech. Existuje několik poměrně vzdálených linií (klastrů) tohoto řádu s podobnou ultrastrukturou i morfologií.

Klastr V řádu Bacteroidales se vyskytuje pouze v termitech. Společně se spirochétami osidluje povrch *M. paradoxa* obývající střevo australského termita *Mastotermes darwiniensis* (Mastotermitidae) (Wenzel et al. 2003), parabasalida *Devescovina* z termita *Neotermes koshunensis* (Kalotermitidae) i již zmíněnou oxymonádu *Dinenympha* (Noda et al. 2005). Zástupci tohoto klastru osidlují povrch vždy jen jednoho druhu prvoka. Oproti tomu poměrně samostatná linie zahrnující zástupce z povrchu *Streblomastix* (Oxymonadida) zdaleka tak hostitelsky specifická není (Noda et al. 2006).

### 5.1.5 Euryarchaeota

Tento velice diverzifikovaný kmen z domény Archea je v trávicím traktu termitů zastoupen převážně metanogeny, mezi nimiž výrazně převládá řád Methanobacteriales (Hackstein 2010). Fylogeneticky vzdálené skupiny tohoto řádu bývají připojeny buď k epitelu zadního střeva, nebo žijí v asociaci s prvoky (Tokura, Ohkuma a Kudo 2000). Velmi často žijí uvnitř jejich buněk jako endosymbionti – chránění před možným vyplavením z těla hostitelského hmyzu a zároveň blízko zdroje vodíku. Ten je ve velké míře přítomnými protisty při trávení lignocelulózy produkován a následně metanogeními archei metabolizován (viz kapitola 6.2).

Buňky metanogenů mohou mít nejrůznější tvary od krátkých rovných tyčinek po vláknité formy. Bývají snadno pozorovatelné díky přítomnosti autofluorescenčního kofaktoru F<sub>420</sub> (Doddema a Vogels 1978).

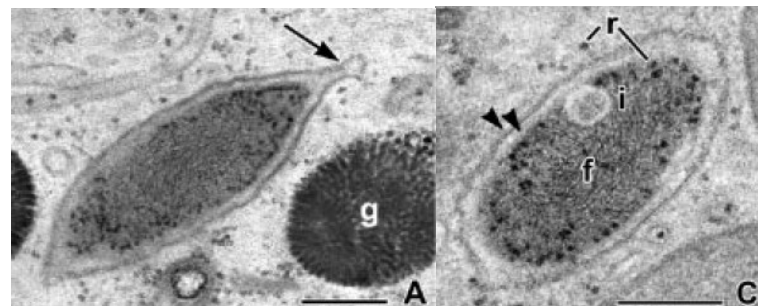
Nejčastějším zástupcem je rod *Methanobrevibacter*.

## 5.2 Endosymbiotická prokaryota

Buňky oxymonád i parabasálií často obsahují ve své cytoplazmě i v jádře veliké množství prokaryotických symbiontů (Smith a Arnott 1974). Není neobvyklé, že v jedné

buňce eukaryotické žije i 800 buněk prokaryotických. V některých případech je ale obtížné odlišit skutečné endosymbionty od pouhé potravy ve vakuole prvoků. Endosymbiotická prokaryota bývají obalená více membránami (Obr. 4 – C). Jejich počet se různí podle toho, zda je bakterie grampozitivní nebo gramnegativní. Na některých buňkách bývají patrné trubičkovité výběžky, které mohou být pozůstatkem po endocytóze (Obr. 4 – A).

Některé hostitelsky specifické skupiny endosymbiotických prokaryot vyskytující se napříč všemi druhy termitů byly pravděpodobně získány již předky dnešních druhů prvoků v počátcích jejich evoluční radiace (Ikeda-Ohtsubo et al. 2016). Příkladem je *Ca. Endomicrobium trichonymphae* (*Elusimicrobia*) nalézající se výhradně v *Trichonympha* klastru I a *Ca. Ancillula trichonymphae* (Actinobacteria) osidlující *Trichonympha* klastr II (Stingl et al. 2005; Strassert et al. 2012). Oproti těmto plošně rozšířeným prvotním kolonizátorům v mnoha případech stojí nezávisle získaná recentní endosymbióza v užší skupině hostitelů, která i přes svou nepříbuznost plní stejnou roli v metabolismu prvoků (Strassert et al. 2012).



**Obr. 4.** Průřez buňkou *Trichonympha agilis* a jejími endosymbionty z kmene *Elusimicrobia*

(TEM; měřítko 0,2  $\mu\text{m}$ )

A Trubičkovitý výběžek vnější membrány, C Dobře patrné dvě membrány endosymbiotické buňky – označeny černými šipkami

Převzato z (Stingl et al. 2005)

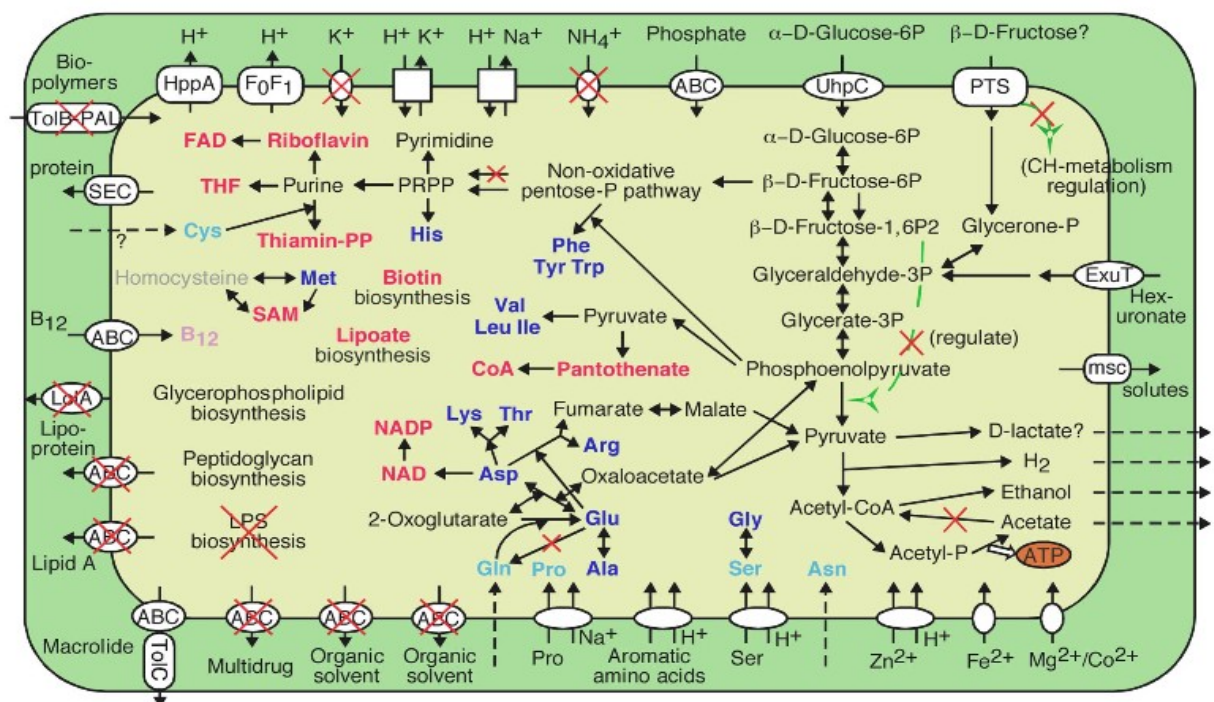
### 5.2.1 Význam endosymbiontů

První dohady o vlivu endosymbiotických bakterií na funkci celého ekosystému střev předpokládaly jejich celulolytické schopnosti, ty byly však částečně vyvráceny objevením vlastních celulolytických genů prvoků (Watanabe et al. 1998). Ačkoliv mnohé bakterie schopnost trávení lignocelulózy mají, výrazný podíl na degradaci tohoto

odolného polymeru nenesou. Význam těchto ve veliké míře přítomných endosymbiontů zůstával nadále nejasný.

V posledních letech bylo zrekonstruováno několik genomů intracelulárních bakterií z fylogeneticky vzdálených kmenů, například *Ca. Ancillula trichonymphae* (Actinobacteria), fylotyp Rs-D17 (*Elusimicrobia*), fylotyp CfPtl-2 (Bacteroidetes) (Scharf 2015). Rekonstrukce metabolismu založené na genomových sekvencích ukázaly, že tyto vzdáleně příbuzné kmeny mají podobné metabolické schopnosti. I přes četné redukce genomu, které bývají pro endobionty typické, zůstaly zachovány metabolické dráhy pro hospodaření s dusíkem, částečnou biosyntézu aminokyselin, nukleových kyselin, kofaktorů a vitamínů (Hongoh et al. 2008a; Hongoh et al. 2008b; Ikeda-Ohtsubo et al. 2016). To svědčí o konvergentní evoluci při obsazování velice podobných nik (Brune a Dietrich 2015).

Jako první byl kompletně osekvenovaný genom nekultivovatelného zástupce Rs-D17 řadíciho se do kmene *Elusimicrobia*. Celý jeho kruhový chromozóm se sestává z 1,125,857 bp, obsahuje 761 protein-kódujících genů a 121 pseudogenů podílejících se na výstavbě buněčné stěny, regulacích, transportu a obraných mechanismech. I přes mnohé redukce si zachoval dráhy pro syntézu 15 aminokyselin a kofaktorů (Obr. 5)

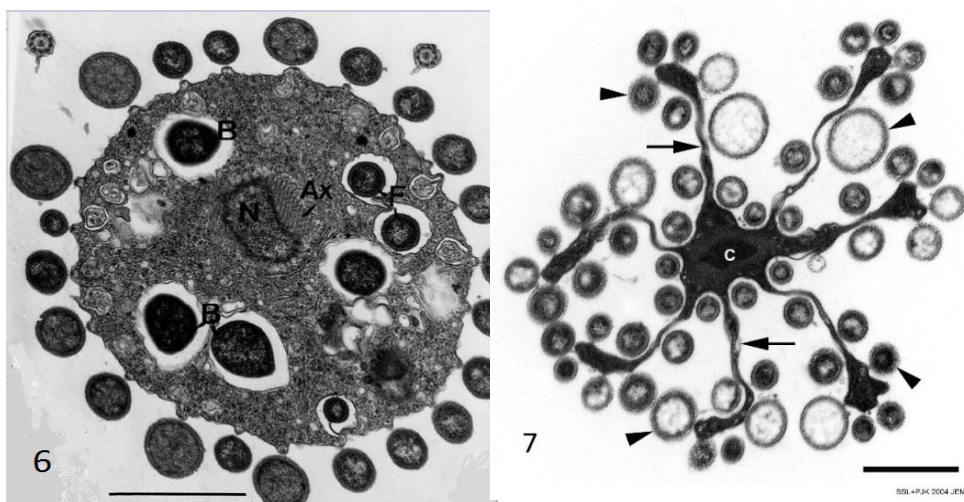


(Hongoh et al. 2008).

Obr. 5. Metabolické dráhy fylotypu Rs-D17 z kmene *Elusimicrobia*

### 5.3 Ektosymbiotická prokaryota

Na jedné eukaryotické buňce se mohou vyskytovat až stovky prokaryotických ektosymbiontů. Speciální tvar buňky *Streblomastix strix* (Oxymonadida) ze střeva termita *Zootermopsis angusticollis* je adaptací na napojení co největšího počtu bakterií. Od anteriorní po posteriorní části buňky se táhne 6 až 7 žebér, která se směrem od centrálních po distální části rozšiřují. Povrch *S. strix* se tak mnohonásobně zvětšuje. V příčném průřezu vytváří hvězdovitý útvar (Obr. 7). Žebra nejsou překvapivě vyztužena zevnitř pomocí mikrotubulů, ale z vnější strany buňky vlivem strukturální nebo osmotické podpory přichycených bakterií (Leander a Keeling 2004). Dodnes však není vznik extracelulárního skeletu, který podélné žebrované struktury vytváří, zcela objasněný. Podobné strukturální adaptace můžeme nalézt i u dalších nepříbuzných prvoků hostících jiné linie bakterií, například u *Lophomonas striata* (Parabasalia) ze střeva všežravého švába *Periplaneta americana* nebo u *Hoplonympha* (Parabasalia) sídlící v *Hodotermopsis sjoestedti* (Termopsidae) (Marika Wenzel et al. 2003). Lze proto usuzovat, že i zde došlo ke konvergentní evoluci. Naopak příbuzný rod *Polymastix* žijící ve střevě četných druhů hmyzu a mnohonožek podélná žebra postrádá, ačkoliv má podobně jako *S. strix* na svém povrchu napojené ektosymbionty – bakterie rodu *Fusiformis* (Obr. 6) (Brugerolle et al. 2003).



**Obr. 6.** Příčný průřez buňkou zástupce rodu *Polymastix* s napojenými bakteriemi rodu *Fusiformis*; viditelné jsou potravní vakuoly obsahující buď koky (B) nebo bakterie *Fusiformis* (F) stále připojené k membráně vakuoly (TEM; měřítko 1  $\mu$ m). Převzato z (Brugerolle et al. 2003)

**Obr. 7.** Příčný průřez buňkou hvězdovitého tvaru *S. strix* s napojenými ektosymbiotickými bakteriemi (TEM; měřítko 1  $\mu$ m) Převzato z (Leander a Keeling 2004)

### 5.3.1 Význam ektosymbiontů

Některé bakterie jsou pouhými komenzály připojenými k povrchu hostitelské buňky, jiné bakterie však mohou mít pro svého hostitele esenciální význam, mohou být jeho obligátně-mutualistickými symbionty. Je možné, že svou přítomností a udržováním bezkyslíkatého prostředí v nejbližším okolí chrání striktně anaerobní prvky před kontaktem s tímto pro anaerobní organizmy toxickým plynem (Baughn a Malamy 2004). Spekulovalo se také, že ektosymbionti bakterie slouží svému hostiteli jako chemoreceptory, pomocí změny potenciálu na membráně přenáší informace o koncentraci látek v okolí, včetně potravních zdrojů. Od této hypotézy se ale spíše upustilo a dnes je ektosymbiontům připisován spíše oboustranně výhodný výživový mutualismus (Leander a Keeling 2004). S tím souvisí fagocytóza ektosymbiontů hostitelskou buňkou pravděpodobně za účelem využití prokaryotických buněk jako doplňkového zdroje energie a dusíku. Jiné vzájemné výhody zatím stále nebyly blíže určeny, přestože většina protist přítomnost ektosymbiontů vykazuje.

To, že bakterie na hostitelských buňkách prosperují a jsou také jejich stálými kolonizátory, naznačují místy dobře pozorovatelná septa mezi dělicími se buňkami a pilusy (spojovací můstky) mezi sousedními buňkami stejného morfortypu (Leander a Keeling 2004). Význam ektosymbiontů pro hostitele značí také výrazné změny morfologie buňky prvoka a značný pokles jedinců v populaci při absenci symbiontů (viz kapitola 5.3.3).

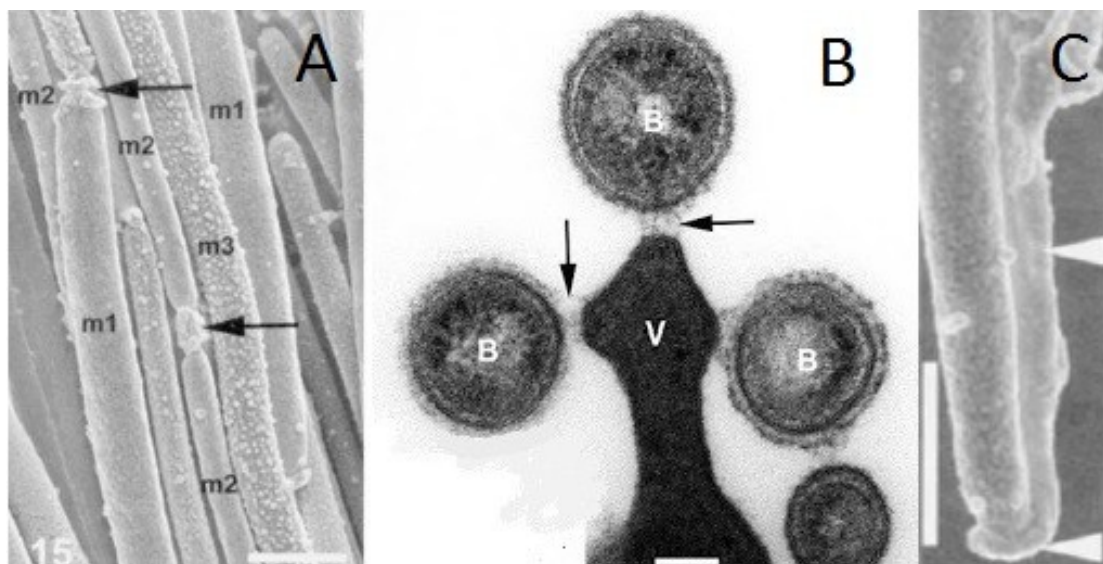
### 5.3.2 Napojení bakterií na povrch hostitele

Důležitým předpokladem pro kvalitní uchycení bakterií na hostitelskou buňku je, aby byl zachován její stálý tvar. Protista s ektobiotickými bakteriemi toho dosahují díky úpravě ultrastruktury. Axostyl oxymonád bývá pohyblivý a pelta přítomná jen v nejpřednější části (Lee, Leedale a Bradbury 2000). Někteří zástupci (např. *S. strix*) ale získali adaptaci ke stabilizaci ektosymbiontů na svém povrchu v podobě výrazně tužšího axostylu a pelty dosahující až do ¼ těla (vliv pelty může být diskutabilní – oxymonáda rodu *Polymastix* ji má naopak redukovanou a bakterie se přesto na jejím povrchu udrží) (Leander and Keeling 2004). Buňka tak ztrácí na pohyblivosti. Aby nebyla pohyblivost hostitelské buňky omezována ještě více, nezasahuje téměř všudypřítomný „obal“ z bakterií až do těsné blízkosti bičíků, ale s odstupem kolem nich vytváří jasně definovatelný lem (Leander a Keeling 2004).

K lepšímu napojení symbiontů slouží výčnělky hostitelské buňky. U *S. strix*,

jsou jedním z mála míst, kde je pozorovatelný vlastní povrch této atypické oxymonády. Nezvykle protažené bakteriální buňky několika morfotypů se svými konci napojují k výstupkům pomocí materiálu připomínajícího glykokalyx (Obr. 8 – A, B) (Leander a Keeling 2004). Glykokalyx bývá přítomen na povrchu některých bakteriálních buněk, kde plní adhezní funkci, ale slouží i k ochraně před mechanickým a chemickým poškozením. Může se skládat z mnoha různých typů proteinů, polysacharidů, polyalkoholů a aminosacharidů. Některé prokaryotické buňky (převážně z řádu Bacteroidales) mají na svém povrchu S-vrstvu, která může plnit obdobnou funkci.

Pro ještě dokonalejší fixaci bývá poslední napojená bakterie obklopena hostitelskou cytoplazmou (Obr. 8 – C) (Leander a Keeling 2004).



**Obr. 8.** Ektosymbiotické bakterie napojené na *S. strix*

A Podélně napojené bakterie tří morfotypů (m1, m2, m3). Výčnělky hostitelské buňky, které slouží k přichycení episymbiontů, označeny šipkami. (SEM; měřítko 0,5  $\mu\text{m}$ ); B Napojené bakterie díky glykokalyxu připomínajícímu materiálu na konci jednoho z žeber buňky. (TEM; měřítko 0,1  $\mu\text{m}$ ); C Poslední napojená bakterie obklopená cytoplazmou hostitelské buňky (cytoplazma označena bílými trojúhelníky) (SEM; měřítko 0,5  $\mu\text{m}$ )

Převzato z (Leander a Keeling 2004)

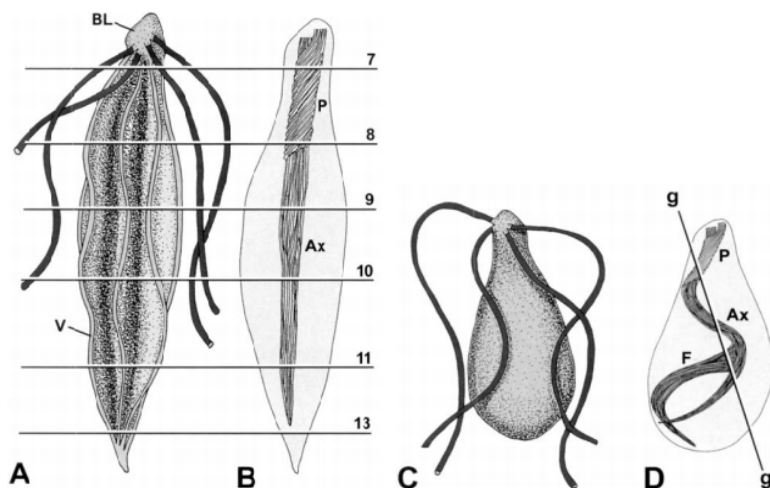
### 5.3.3 Vliv absence prokaryotických symbiontů na hostitelskou buňku

Buňka již zmiňovaného prvoka *S. strix* je dlouhá a protáhlá. Jejím příčným průřezem vznikne šesti až sedmi ramenný hvězdovitý útvar (Obr. 7). Tento popis však odpovídá pouze, jedná-li se o buňku z populace bez zásahu antibiotik. Přidají-li se antibiotika do stravy termita, ve kterém *S. strix* žije, dochází ke ztrátě ektosymbiotických bakterií a tím i k razantní změně morfologie (Leander a Keeling

2004).

V přechodném stádiu při postupné ztrátě ektosymbiontů vlivem antibiotika carbenicillinu pravděpodobně dochází ke změně osmoregulace a objem buňky se výrazně zvětšuje. Podobná změna morfologie (buňka nabobtnala) nastala při podobném pokusu i u *Devescovina* sp. (Parabasalia) ze střeva termita *Neotermes koshunensis* (Kalotermitidae) (Noda et al. 2005). Bakterie jsou přichyceny už jen jedním koncem k výstupkům hostitelské buňky, mnoho struktur je již dokonce neobsazených a větší část povrchu odkrytá. Vlivem dalšího působení carbenicillinu se udržel na *S. strix* jen jeden z původních tří bakteriálních morfotypů a to také v menším počtu. Adaptace pro napojení co největšího počtu bakterií vymizely. Eukaryotická buňka se výrazně zmenšila a nabyla kapkovitého tvaru (Obr. 9 – C), její příčný průřez již také nebyl hvězdovitý. Stalo se tak v důsledku změněné vnitřní ultrastruktury - mikrotubulů axostylu (Obr. 9 – D). *S. strix* se začal tvarem podobat ostatním oxymonádám *Monocercomonoides* a *Polymastix* (Leander a Keeling 2004).

Po několika dnech, kdy bylo prostředí trávicí soustavy termita *Z. angusticollis* nadále vystaveno působení antibiotik, bylo pozorováno z původně početné populace již jen několik zbylých buněk *S. strix* s několika bakteriálními buňkami na povrchu. Ostatní protista (*Trichonympha*, *Trichomitopsis*) vyskytující se také v *Z. angusticollis*, nebyla znatelně působením antibiotik a ztrátou bakteriální komunity ovlivněna. Bakterie vyskytující se v cytoplazmě hostitelských buněk zůstaly nedotčeny. (Leander a Keeling 2004)



**Obr. 9.** Nákras buněk *S. strix* před (A; B) a po delším působení antibiotik (C; D); pro názornost bez ektobiotických bakterií. A – Protáhlá, vřetenovitá buňka s nápadnými žebry, kde bývají uchycení ektosymbionti. B - Rovný, kompaktní axostyl (Ax); výrazná pelta (P), C – Kapkovitý tvar buňky, bez žeber, D – Zakřivený, rozvětvený axostyl (Ax). Převzato z (Leander a Keeling 2004)



## 6 Metabolické procesy zahrnující prokaryotické symbionty

### 6.1 Fixace dusíku

Dřevo je substrát bohatý na uhlík, avšak velmi chudý na dusík. Pro termita, který se ničím jiným neživí, je tak velmi důležité zužitkovat tento biogenní prvek co nejdůkladněji. Dusík je nedílnou součástí těla každého organismu, neboť je jednou ze základních komponent aminokyselin, a tím i bílkovin, dále se podílí na stavbě nukleových kyselin (dusíkaté báze).

Termitovi *Coptotermes formosanus*, zástupci podzemní skupiny Rhinotermitidae, velkou měrou napomáhá v hospodaření s dusíkem prokaryotický endosymbiont nekultivovatelné celulólytické *Pseudotrichonympha grassii* (Parabasalia) (Noda et al. 2005). Snad právě proto patří tento druh termita mezi ty, které napáchají v mírném a subtropickém pásmu největší škody (Su 2003). Fylotyp CfPtl-2 bakterie vyskytující se výhradně uvnitř buňky tohoto prvoka je na základě fylogenetické analýzy konkatenovaných sekvencí ribozomálních proteinů řazen do řádu Bacteroidales (Hongoh, Sharma, Prakash, Noda, Toh, et al. 2008). Což je poněkud nečekané, vzhledem k jeho schopnosti nitrogenázové aktivity, která nebyla doposud ani v celém kmeni Bacteroidetes pozorována. Jelikož tento fylotyp tvoří 70 % ze všech bakteriálních buněk ve střevě *Coptotermes formosanus*, není jeho vliv na fixaci atmosférického dusíku zanedbatelný (Noda et al. 2005). Genom bakterie fylotypu CfPtl-2 ale obsahuje i geny odpovědné za transport amoniaku a transport i syntézu močoviny, což naznačuje, že je bakterie schopna nejen fixace atmosférického dusíku, ale i recyklace takového dusíku, který je zabudován v primárních odpadních produktech prvoka (Noda et al. 2005).

Fixace  $N_2$  je energeticky náročný proces, a proto je dobré, aby docházelo k jeho regulaci. Je-li v hostitelské cytoplazmě dostatek močoviny či amoniaku, fylotyp CfPtl-2 dokáže proces fixace  $N_2$  potlačit a věnovat se recyklaci (Breznak et al. 1973; Hongoh, Sharma, Prakash, Noda, Toh, et al. 2008).

Dalším pravděpodobným přínosem této bakterie do procesu fixace  $N_2$  je její schopnost vázat vodík (Inoue et al. 2007). Ten je významně produkován při procesu trávení lignocelulózy a fixace  $N_2$ . Je také důležitým intermediátem metanogeneze a acetogeneze. Odstraněním přebytku  $H_2$  teoreticky podporuje jak trávení, tak i fixaci  $N_2$  (Hongoh, Sharma, Prakash, Noda, Toh, et al. 2008).

## 6.2 Metanogeneze

Metan vzniká jakožto produkt metabolismu v závěrečné fázi anaerobního rozkladu rostlinné biomasy. Substrátem pro vytvoření molekuly CH<sub>4</sub> jsou především kyselina octová, molekuly H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, ale i další malé uhlíkaté sloučeniny. K procesu metanogeneze dochází za pomoci četných mikroorganismů převážně ze skupin *Methanobacteriales* – metanogenů z domény Archaea. Ti se vyskytují i v zadním střevě termitů, kde žijí v asociaci s prvoky a přispívají k rozložení zbytků lignocelulózy (Hackstein 2010). Zajímavé je, že metanogeni žijí v symbióze spíše s menšími druhy prvoků, nikoliv s druhy většími, které jsou větším zdrojem vodíku (Tokura, Ohkuma a Kudo 2000). Patrné je to například ve střevě termita *Z. angusticollis* (Messer a Lee 1989). Využíváním a současným odstraňováním přebytku H<sub>2</sub> z prostoru střeva zvyšují metanogeni efektivitu celého systému.

Je pozoruhodné, že u termitů konzumujících dřevo nebo trávu acetogeneze v zadním střevě převažuje nad metanogenezí. Ve většině ostatních anoxických prostředích a také v trávících traktech termitů trávících půdní substrát nebo pěstujících houby je tomu totiž naopak (Brauman et al. 1992). Tato anomálie je v případě *R. flavipes* vysvětlena odlišným rozmístěním mikrobiálních populací a přítomností gradientu parciálního tlaku vodíku (Ebert a Brune 1997).

Termiti jsou často, především kvůli svému počtu, označováni za význačné producenty tohoto skleníkového plynu. Finální množství nižšími termity vyprodukovaného metanu je ale mnohem nižší, než by se dalo vzhledem k míře produkce H<sub>2</sub> prvoky očekávat (Sugimoto, Bignell a MacDonald 2000). Metanogeni totiž nemohou využívat všechny vodík pro vlastní spotřebu, pravděpodobně o něj musí kompetovat s druhou prokaryotickou doménou – s acetogenickými bakteriemi (Brauman et al. 1992).

## 7 Metody výzkumu prokaryotických endosymbiontů

Největším problémem studia prokaryotických endosymbiontů bývá jejich obtížná kultivace. Obecně platí, že více než 90 % fylogentypů nebylo nikdy kultivováno a tím pádem nemohlo být ani publikováno jako plnohodnotný nový taxon. Nově objevené a poměrně dobře charakterizované skupiny bakterií, které stále odolávají všem pokusům o kultivaci, musí být na začátku svého vědeckého pojmenování označeny slovem „*Candidatus*“ (např.: *Candidatus* Symbiothrix dinenymphae nebo jen *Ca.* S.

dinenymphae). S určením diverzity těchto organismů ve veliké míře napomáhá molekulární fylogenetika. Molekulárně fylogenetické stromy, určující příbuznost a zařazení prokaryot do systému, bývají založené obvykle na variabilní oblasti V4 nebo V6 malé podjednotky (16S) rRNA. Tyto úseky jsou poměrně krátké (méně než 500 bp), a proto bývá často (při shodě menší nežli 85 %) rekonstrukce příbuzenských vztahů a zařazení do skupin u těchto sekvencí obtížné (Yarza et al. 2014). Při určování diverzity se však nelze spoléhat jen na celkové osekvenování obsahu střeva, je potřeba také rozpoznat kontaminace vzorku. Ačkoliv se počet různých skupin prokaryot popsanych a prokázaných ve vzorcích pocházejících ze střev termitů neustále zvyšuje, dostatečně kompletní data byla do roku 2006 pouze u *R. speratus* (Eggleton 2006). Zařazování nových sekvencí do metagenomických knihoven (katalogizace) a zároveň vyhledávání z obsáhlých databází je podstatnou částí studia prokaryotických endosymbiontů.

Nenahraditelnou součástí výzkumu buněk a jejich struktur jsou zobrazovací techniky. Na úrovni jednobuněčných eukaryotických či prokaryotických organismů je využívána především transmisní elektronová mikroskopie (TEM) a skenovací elektronová mikroskopie (SEM). Pro lokalizaci konkrétních buněk, o jejichž přítomnosti ve vzorku vypovídá například jen sekvenace, bývá často využívána metoda FISH (fluorescence in situ hybridization), která odpovídající objekt označí oligonukleotidovou či polynukleotidovou sondou (Hongoh et al. 2007).

V mnohých studiích pro zjištění vlivu prokaryot na fungování celého systému bylo potřeba porovnat přirozené prostředí s prostředím bez přítomných prokaryotických buněk. Elegantním postupem, jak toho dosáhnout, je přidání antibiotik (např.: carbenicillinu) do stravy termitům (Leander a Keeling 2004).

## 8 Závěr

Nekultivovatelnost drtivé většiny prokaryotických endosymbiontů ze střev termitů a dřevokazných švábů má za následek nekompletnost a zkreslenost mnoha prvotních studií tohoto pestrého ekosystému. Početnost některých skupin prokaryot ve stejném druhu termita se podle různých zdrojů významně liší. Například v trávicím traktu *R. flavipes* dle studie Tholen et al. 1997, založené z velké části na kultivačních metodách, tvořila doména Archea 10 % ze všech přítomných prokaryot. K výrazně odlišnému číslu došli za pomoci metagenomiky Boucias et al. 2013. Poměr archeí vyskytujících se ve střevě téhož druhu termita dosahoval stěží jednoho procenta. Problémy spojené s

určením mikrobiální skladby v termitím střevě ovlivňují odhady role těchto prokaryot v metabolismu svých eukaryotických hostitelů. Díky celkovému přehledu mikrobiální skladby a na základě získání kompletní nebo částečné genomové sekvence několika zástupců je nyní možné usuzovat, že prokaryota hrají hlavní roli při biochemických dějích jako je biosyntéza mnohých aminokyselin, kofaktorů a vitamínů, fixace dusíku, metanogeneze a v určité míře i degradace lignocelulózy.

Přestože zbývá objasnit konkrétní funkci většiny prokaryotických zástupců, je dnes jejich pozice v ekosystému střev jasnější. Důkazem velikého významu prokaryot především ve výše zmíněných procesech je jejich kospeciace s prvočími hostiteli. Několik vysoce hostitelsky specifických zástupců z fylogeneticky vzdálených linií zaplňuje podobné niky. Rekonstrukce koevoluce prokaryotických a eukaryotických organismů uvnitř trávicího traktu termitů je z důvodu horizontálních přenosů prokaryotických i eukaryotických linií i mezi nepříbuznými druhy termitů poměrně složitá.

## 9 Seznam použité literatury

- Aanen, Duur K., Paul Eggleton, Corinne Rouland-Lefevre, Tobias Guldberg-Froslev, Soren Rosendahl, a Jacobus J. Boomsma. 2002. „The Evolution of Fungus-Growing Termites and Their Mutualistic Fungal Symbionts". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (23): 14887–92. doi:10.1073/pnas.222313099.
- Balat Mustafa, Havva Balat, a Cahide Öz. 2008. „Progress in bioethanol processing. Prog Energy Combust Sci". *ResearchGate*, říjen. [https://www.researchgate.net/publication/223451269\\_Progress\\_in\\_bioethanol\\_processing\\_Prog\\_Energy\\_Combust\\_Sci](https://www.researchgate.net/publication/223451269_Progress_in_bioethanol_processing_Prog_Energy_Combust_Sci).
- Bandi, C., M. Sironi, G. Damiani, L. Magrassi, C. A. Nalepa, U. Laudani, a L. Sacchi. 1995. „The Establishment of Intracellular Symbiosis in an Ancestor of Cockroaches and Termites". *Proceedings. Biological Sciences* 259 (1356): 293–99. doi:10.1098/rspb.1995.0043.
- Bandi, Claudio, a Luciano Sacchi. 2000. „Intracellular Symbiosis in Termites". In *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*, editoval Takuya Abe, David Edward Bignell, a Masahiko Higashi, 261–73. Springer Netherlands. doi:10.1007/978-94-017-3223-9\_12.
- Bauer, S., A. Tholen, J. Overmann, a A. Brune. 2000. „Characterization of Abundance and Diversity of Lactic Acid Bacteria in the Hindgut of Wood- and Soil-Feeding Termites by Molecular and Culture-Dependent Techniques". *Archives of Microbiology* 173 (2): 126–37.
- Baughn, Anthony D., a Michael H. Malamy. 2004. „The Strict Anaerobe *Bacteroides Fragilis* Grows in and Benefits from Nanomolar Concentrations of Oxygen". *Nature* 427 (6973): 441–44. doi:10.1038/nature02285.
- Berchtold, Chatzinotas, Schonhuber, Brune, Amann, Hahn, a Konig. 1999. „Differential Enumeration and in Situ Localization of Microorganisms in the Hindgut of the Lower Termite *Mastotermes Darwiniensis* by Hybridization with rRNA-Targeted Probes". *Archives of Microbiology* 172 (6): 407–16.
- Berlanga, Mercedes, Carlos Llorens, Jaume Comas, a Ricardo Guerrero. 2016. „Gut Bacterial Community of the Xylophagous Cockroaches *Cryptocercus Punctulatus* and *Parasphaeria Boleiriana*". *PloS One* 11 (4): e0152400. doi:10.1371/journal.pone.0152400.
- Bignell, D. E., a P. Eggleton. 1995. „On the Elevated Intestinal pH of Higher Termites (Isoptera: Termitidae)". *Insectes Sociaux* 42 (1): 57–69. doi:10.1007/BF01245699.
- Boucias, Drion G., Yunpeng Cai, Yijun Sun, Verena-Ulrike Lietze, Ruchira Sen, Rhitoban Raychoudhury, a Michael E. Scharf. 2013. „The Hindgut Lumen Prokaryotic Microbiota of the Termite *Reticulitermes Flavipes* and Its Responses to Dietary Lignocellulose Composition". *Molecular Ecology* 22 (7): 1836–53. doi:10.1111/mec.12230.
- Brauman, A., M. D. Kane, M. Labat, a J. A. Breznak. 1992. „Genesis of Acetate and Methane by Gut Bacteria of Nutritionally Diverse Termites". *Science (New York, N.Y.)* 257 (5075): 1384–87. doi:10.1126/science.257.5075.1384.
- Breznak, John A. 2000. „Ecology of Prokaryotic Microbes in the Guts of Wood- and Litter-Feeding Termites". In *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*, editoval Takuya Abe, David Edward Bignell, a Masahiko Higashi, 209–31. Springer Netherlands. doi:10.1007/978-94-017-3223-9\_10.
- Breznak, 2002. „Phylogenetic Diversity and Physiology of Termite Gut Spirochetes". *Integrative and Comparative Biology* 42 (2): 313–18. doi:10.1093/icb/42.2.313.

- Breznak, John A., Winston J. Brill, James W. Mertins, a Harry C. Coppel. 1973. „Nitrogen Fixation in Termites". *Nature* 244 (5418): 577–80. doi:10.1038/244577a0.
- Brooks, Marion A. 1970. „Comments on the classification of intracellular symbiotes of cockroaches and a description of the species". *Journal of Invertebrate Pathology* 16 (2): 249–58. doi:10.1016/0022-2011(70)90066-2.
- Brugerolle, G., I. D. Silva-Neto, R. Pellens, a P. Grandcolas. 2003. „Electron Microscopic Identification of the Intestinal Protozoan Flagellates of the Xylophagous Cockroach *Parasphaeria Boleiriana* from Brazil". *Parasitology Research* 90 (3): 249–56. doi:10.1007/s00436-003-0832-7.
- Brune, A., D. Emerson, a J. A. Breznak. 1995. „The Termite Gut Microflora as an Oxygen Sink: Microelectrode Determination of Oxygen and pH Gradients in Guts of Lower and Higher Termites". *Applied and Environmental Microbiology* 61 (7): 2681–87.
- Brune, Andreas. 2014. „Symbiotic Digestion of Lignocellulose in Termite Guts". *Nature Reviews Microbiology* 12 (3): 168–80. doi:10.1038/nrmicro3182.
- Brune, Andreas, a Carsten Dietrich. 2015. „The Gut Microbiota of Termites: Digesting the Diversity in the Light of Ecology and Evolution". *Annual Review of Microbiology* 69: 145–66. doi:10.1146/annurev-micro-092412-155715.
- Cleveland, L. R. 1923. „Symbiosis between Termites and Their Intestinal Protozoa". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 9 (12): 424–28.
- Cleveland, L. R., a A. V. Grimstone. 1964. „The Fine Structure of the Flagellate *Mixotricha Paradoxa* and Its Associated Micro-Organisms". *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 159 (977): 668–86. doi:10.1098/rspb.1964.0025.
- Čalová, Iveta. 2015. „Studium biokonverze celulosového odpadu na ethanol s využitím kvasinkových systémů", červen. <http://dspace.lib.vutbr.cz/xmlui/handle/11012/38261>.
- Doddema, H J, a G D Vogels. 1978. „Improved identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy." *Applied and Environmental Microbiology* 36 (5): 752–54.
- Ebert, A., a A. Brune. 1997. „Hydrogen Concentration Profiles at the Oxidic-Anoxic Interface: A Microsensor Study of the Hindgut of the Wood-Feeding Lower Termite *Reticulitermes Flavipes* (Kollar)." *Applied and Environmental Microbiology* 63 (10): 4039–46.
- Eggleton, P. 2001. „Termites and Trees: A Review of Recent Advances in Termite Phylogenetics". *Insectes Sociaux* 48 (3): 187–93. doi:10.1007/PL00001766.
- Eggleton, Paul. 2006. „The Termite Gut Habitat: Its Evolution and Co-Evolution". In *Intestinal Microorganisms of Termites and Other Invertebrates*, editoval Helmut König a Ajit Varma, 6:373–404. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag. doi:10.1007/3-540-28185-1\_16.
- Hackstein, Johannes H. P. 2010. *(Endo)symbiotic Methanogenic Archaea*. Springer Science & Business Media.
- Hampl, Vladimír. 2016. „Preaxostyla". In *Handbook of the Protists*. Roč. 2016.
- Herlemann, D. P. R., O. Geissinger, W. Ikeda-Ohtsubo, V. Kunin, H. Sun, A. Lapidus, P. Hugenholtz, a A. Brune. 2009. „Genomic Analysis of “*Elusimicrobium minutum*,” the First Cultivated Representative of the Phylum “*Elusimicrobia*” (Formerly Termite Group 1)". *Applied and Environmental Microbiology* 75 (9): 2841–49. doi:10.1128/AEM.02698-08.

- Herlemann, Daniel P. R., Oliver Geissinger, a Andreas Brune. 2007. „The Termite Group I Phylum Is Highly Diverse and Widespread in the Environment". *Applied and Environmental Microbiology* 73 (20): 6682–85. doi:10.1128/AEM.00712-07.
- Hongoh, Yuichi, Moriya Ohkuma, a Toshiaki Kudo. 2003. „Molecular Analysis of Bacterial Microbiota in the Gut of the Termite *Reticulitermes Speratus* (Isoptera; Rhinotermitidae)". *FEMS Microbiology Ecology* 44 (2): 231–42. doi:10.1016/S0168-6496(03)00026-6.
- Hongoh, Yuichi, Tomoyuki Sato, Satoko Noda, Sadaharu Ui, Toshiaki Kudo, a Moriya Ohkuma. 2007. „Candidatus Symbiothrix Dinenymphae: Bristle-like Bacteroidales Ectosymbionts of Termite Gut Protists". *Environmental Microbiology* 9 (10): 2631–35. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01365.x.
- Hongoh, Yuichi, Vineet K. Sharma, Tulika Prakash, Satoko Noda, Todd D. Taylor, Toshiaki Kudo, Yoshiyuki Sakaki, Atsushi Toyoda, Masahira Hattori, a Moriya Ohkuma. 2008. „Complete Genome of the Uncultured Termite Group 1 Bacteria in a Single Host Protist Cell". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (14): 5555–60. doi:10.1073/pnas.0801389105.
- Hongoh, Yuichi, Vineet K. Sharma, Tulika Prakash, Satoko Noda, Hidehiro Toh, Todd D. Taylor, Toshiaki Kudo, et al. 2008. „Genome of an Endosymbiont Coupling N<sub>2</sub> Fixation to Cellulolysis Within Protist Cells in Termite Gut". *Science* 322 (5904): 1108–9. doi:10.1126/science.1165578.
- Chouvenc, Thomas, Nan-Yao Su, a Alain Robert. 2009. „Inhibition of *Metarhizium Anisopliae* in the Alimentary Tract of the Eastern Subterranean Termite *Reticulitermes Flavipes*". *Journal of Invertebrate Pathology* 101 (2): 130–36. doi:10.1016/j.jip.2009.04.005.
- Iida, null, null Ohkuma, null Ohtoko, a null Kudo. 2000. „Symbiotic Spirochetes in the Termite Hindgut: Phylogenetic Identification of Ectosymbiotic Spirochetes of Oxymonad Protists". *FEMS Microbiology Ecology* 34 (1): 17–26.
- Ikeda-Ohtsubo, Wakako, Mahesh Desai, Ulrich Stingl, a Andreas Brune. 2007. „Phylogenetic Diversity of ‚Endomicrobia‘ and Their Specific Affiliation with Termite Gut Flagellates". *Microbiology (Reading, England)* 153 (Pt 10): 3458–65. doi:10.1099/mic.0.2007/009217-0.
- Ikeda-Ohtsubo, Wakako, Jürgen F. H. Strassert, Tim Köhler, Aram Mikaelyan, Ivan Gregor, Alice C. McHardy, Susannah Green Tringe, Phil Hugenholtz, Renate Radek, a Andreas Brune. 2016. „‚Candidatus *Adiutrix Intracellularis*‘, an Endosymbiont of Termite Gut Flagellates, Is the First Representative of a Deep-Branching Clade of Deltaproteobacteria and a Putative Homoacetogen". *Environmental Microbiology* 18 (8): 2548–64. doi:10.1111/1462-2920.13234.
- Inoue, Jun-Ichi, Kanako Saita, Toshiaki Kudo, Sadaharu Ui, a Moriya Ohkuma. 2007. „Hydrogen Production by Termite Gut Protists: Characterization of Iron Hydrogenases of Parabasalian Symbionts of the Termite *Coptotermes Formosanus*". *Eukaryotic Cell* 6 (10): 1925–32. doi:10.1128/EC.00251-07.
- Inward, Daegan, George Beccaloni, a Paul Eggleton. 2007. „Death of an order: a comprehensive molecular phylogenetic study confirms that termites are eusocial cockroaches". *Biology Letters* 3 (3): 331–35. doi:10.1098/rsbl.2007.0102.
- Karnkowska, Anna, Vojtěch Vacek, Zuzana Zubáčová, Sebastian C. Treitli, Romana Petrželková, Laura Eme, Lukáš Novák, et al. 2016. „A Eukaryote without a Mitochondrial Organelle". *Current Biology: CB* 26 (10): 1274–84. doi:10.1016/j.cub.2016.03.053.

- Karun, Namera, a K. R Sridhar. 2013. „Occurrence and distribution of Termitomyces (Basidiomycota, Agaricales) in the Western Ghats and on the west coast of India (PDF Download Available)". *CZECH MYCOLOGY*.  
[https://www.researchgate.net/publication/267450838\\_Occurrence\\_and\\_distribution\\_of\\_Termitomyces\\_Basidiomycota\\_Agaricales\\_in\\_the\\_Western\\_Ghats\\_and\\_on\\_the\\_west\\_coast\\_of\\_India](https://www.researchgate.net/publication/267450838_Occurrence_and_distribution_of_Termitomyces_Basidiomycota_Agaricales_in_the_Western_Ghats_and_on_the_west_coast_of_India).
- Katzin, Leonard I., a Harold Kirby. 1939. „The Relative Weights of Termites and Their Protozoa". *The Journal of Parasitology* 25 (5): 444–45. doi:10.2307/3272319.
- König, H. 2006. „Bacillus Species in the Intestine of Termites and Other Soil Invertebrates". *Journal of Applied Microbiology* 101 (3): 620–27. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02914.x.
- König, Helmut. 2006. *Intestinal Microorganisms of Termites and Other Invertebrates*. Springer Science & Business Media.
- Leander, Brian S., a Patrick J. Keeling. 2004. „Symbiotic Innovation in the Oxymonad *Streblomastix Strix*". *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 51 (3): 291–300.
- Lee, John J., Gordon F. Leedale, a Phyllis Clarke Bradbury. 2000. *An Illustrated Guide to the Protozoa: Organisms Traditionally Referred to as Protozoa, or Newly Discovered Groups*. Society of Protozoologists.
- Leidy, Prof. 1877. „On Intestinal Parasites of *Termes flavipes*". *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 29: 146–49.
- Leschine, S. B. 1995. „Cellulose Degradation in Anaerobic Environments". *Annual Review of Microbiology* 49: 399–426. doi:10.1146/annurev.mi.49.100195.002151.
- Messer, A. C., a M. J. Lee. 1989. „Effect of Chemical Treatments on Methane Emission by the Hindgut Microbiota in the termite *Zootermopsis Angusticollis*". *Microbial Ecology* 18 (3): 275–84. doi:10.1007/BF02075814.
- Noda, Satoko, Toshiya Iida, Osamu Kitade, Hideaki Nakajima, Toshiaki Kudo, a Moriya Ohkuma. 2005. „Endosymbiotic Bacteroidales Bacteria of the Flagellated Protist *Pseudotrichonympha grassii* in the Gut of the Termite *Coptotermes formosanus*". *Applied and Environmental Microbiology* 71 (12): 8811–17. doi:10.1128/AEM.71.12.8811-8817.2005.
- Noda, Satoko, Tetsushi Inoue, Yuichi Hongoh, Miho Kawai, Christine A. Nalepa, Charunee Vongkaluang, Toshiaki Kudo, a Moriya Ohkuma. 2006. „Identification and Characterization of Ectosymbionts of Distinct Lineages in Bacteroidales Attached to Flagellated Protists in the Gut of Termites and a Wood-Feeding Cockroach". *Environmental Microbiology* 8 (1): 11–20. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00860.x.
- Noirot, Charles. 2001. „The Gut of Termites (Isoptera) Comparative Anatomy, Systematics, Phylogeny. II. Higher Termites (Termitidae)". *Annales de La Société Entomologique de France* 37 (4): 431–71.
- Ohkuma, Moriya, Satoko Noda, Satoshi Hattori, Toshiya Iida, Masahiro Yuki, David Starns, Jun-ichi Inoue, Alistair C. Darby, a Yuichi Hongoh. 2015. „Acetogenesis from H<sub>2</sub> plus CO<sub>2</sub> and Nitrogen Fixation by an Endosymbiotic Spirochete of a Termite-Gut Cellulolytic Protist". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (33): 10224–30. doi:10.1073/pnas.1423979112.
- Poinar, George O. 2009. „Description of an early Cretaceous termite (Isoptera: Kalotermitidae) and its associated intestinal protozoa, with comments on their co-evolution". *Parasites & Vectors* 2: 12. doi:10.1186/1756-3305-2-12.
- Prillinger, H., R. Messner, H. König, R. Bauer, K. Lopandic, O. Molnar, P. Dangel, et al.



1996. „Yeasts Associated with Termites : A Phenotypic and Genotypic Characterization and Use of Coevolution for Dating Evolutionary Radiations in Asco- and Basidiomycetes". *Systematic and Applied Microbiology* 19 (2): 265–83.
- Puniya, Anil Kumar, Rameshwar Singh, a Devki Nandan Kamra. 2015. *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. Springer.
- Radek, Renate. 1999. „Flagellates, bacteria, and fungi associated with termites: diversity and function in nutrition—a review". *Ecotropica* 5.1.
- Riesenfeld, Christian S., Patrick D. Schloss, a Jo Handelsman. 2004. „Metagenomics: Genomic Analysis of Microbial Communities". *Annual Review of Genetics* 38 (1): 525–52. doi:10.1146/annurev.genet.38.072902.091216.
- Sen, Ruchira, Rhitoban Raychoudhury, Yunpeng Cai, Yijun Sun, Verena-Ulrike Lietze, Brittany F. Peterson, Michael E. Scharf, a Drion G. Boucias. 2015. „Molecular Signatures of Nicotinoid-Pathogen Synergy in the Termite Gut". *PLoS ONE* 10 (4). doi:10.1371/journal.pone.0123391.
- Scharf, Michael E. 2015. „Omic research in termites: an overview and a roadmap". *Frontiers in Genetics* 6 (březen). doi:10.3389/fgene.2015.00076.
- Schultz, J E, a J A Breznak. 1978. „Heterotrophic bacteria present in hindguts of wood-eating termites [*Reticulitermes flavipes* (Kollar)]". *Applied and Environmental Microbiology* 35 (5): 930–36.
- Smith, a Arnott. 1974. „Epi- and endobiotic bacteria associated with *Pyrsonympha vertens*, a symbiotic protozoon of the termite *Reticulitermes flavipes*". *Blackwell Publishing on behalf of American Microscopical Society*.
- Sorensen, J. S., C. A. Turnbull, a M. D. Dearing. 2004. „A Specialist Herbivore (*Neotoma stephensi*) Absorbs Fewer Plant Toxins than Does a Generalist (*Neotoma albigula*)". *Physiological and Biochemical Zoology: PBZ* 77 (1): 139–48. doi:10.1086/378923.
- Stingl, Ulrich, Renate Radek, Hong Yang, a Andreas Brune. 2005. „Endomicrobia: Cytoplasmic Symbionts of Termite Gut Protozoa Form a Separate Phylum of Prokaryotes". *Applied and Environmental Microbiology* 71 (3): 1473–79. doi:10.1128/AEM.71.3.1473-1479.2005.
- Strassert, Jürgen F. H., Tim Köhler, Tobias H. G. Wienemann, Wakako Ikeda-Ohtsubo, Nicolas Faivre, Sibylle Franckenberg, Rudy Plarre, Renate Radek, a Andreas Brune. 2012. „Candidatus *Ancillula trichonymphae*, a Novel Lineage of Endosymbiotic Actinobacteria in Termite Gut Flagellates of the Genus *Trichonympha*". *Environmental Microbiology* 14 (12): 3259–70. doi:10.1111/1462-2920.12012.
- Strassert, Jürgen F. H., Aram Mikaelyan, Tanja Woyke, a Andreas Brune. 2016. „Genome Analysis of ‘Candidatus *Ancillula trichonymphae*’, First Representative of a Deep-Branching Clade of Bifidobacteriales, Strengthens Evidence for Convergent Evolution in Flagellate Endosymbionts". *Environmental Microbiology Reports* 8 (5): 865–73. doi:10.1111/1758-2229.12451.
- Su, N. Y. 2003. „Overview of the Global Distribution and Control of the Formosan Subterranean Termite". *Sociobiology*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300959237>.
- Sugimoto, Atsuko, David E. Bignell, a Jannette A. MacDonald. 2000. „Global Impact of Termites on the Carbon Cycle and Atmospheric Trace Gases". In *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*, editoval Takuya Abe, David Edward Bignell, a Masahiko Higashi, 409–35. Springer Netherlands. doi:10.1007/978-

94-017-3223-9\_19.

- Tabatabaei, Anaraki M., R. Rahim, N. Abdullah, R. A. Rahim, A. D. G. Wright, Y. Shirai, K. Sakai, et al. 2010. „Importance of the methanogenic archaea populations in anaerobic wastewater treatments", leden. doi:10.1016/j.procbio.2010.05.017.
- Tai, Vera, Erick R. James, Christine A. Nalepa, Rudolf H. Scheffrahn, Steve J. Perlman, a Patrick J. Keeling. 2015. „The Role of Host Phylogeny Varies in Shaping Microbial Diversity in the Hindguts of Lower Termites". *Applied and Environmental Microbiology* 81 (3): 1059–70. doi:10.1128/AEM.02945-14.
- Tholen, Anne, Bernhard Schink, a Andreas Brune. 1997. „The Gut Microflora of Reticulitermes Flavipes, Its Relation to Oxygen, and Evidence for Oxygen-Dependent Acetogenesis by the Most Abundant Enterococcus Sp." *FEMS Microbiology Ecology* 24 (2): 137–49. doi:10.1111/j.1574-6941.1997.tb00430.x.
- Thomas, Torsten, Jack Gilbert, a Folker Meyer. 2012. „Metagenomics - a guide from sampling to data analysis". *Microbial Informatics and Experimentation* 2 (únor): 3. doi:10.1186/2042-5783-2-3.
- Todaka, Nemuri, Tetsushi Inoue, Kanako Saita, Moriya Ohkuma, Christine A. Nalepa, Michael Lenz, Toshiaki Kudo, a Shigeharu Moriya. 2010. „Phylogenetic Analysis of Cellulolytic Enzyme Genes from Representative Lineages of Termites and a Related Cockroach". *PLOS ONE* 5 (1): e8636. doi:10.1371/journal.pone.0008636.
- Tokuda, G., H. Watanabe, T. Matsumoto, a H. Noda. 1997. „Cellulose Digestion in the Wood-Eating Higher Termite, Nasutitermes Takasagoensis (Shiraki): Distribution of Cellulases and Properties of Endo-Beta-1,4-Glucanase". *Zoological Science* 14 (1): 83–93. doi:10.2108/zsj.14.83.
- Tokuda, Gaku, Nathan Lo, a Hirofumi Watanabe. 2005. „Marked Variations in Patterns of Cellulase Activity against Crystalline- vs. Carboxymethyl-Cellulose in the Digestive Systems of Diverse, Wood-Feeding Termites". *Physiological Entomology* 30 (4): 372–80. doi:10.1111/j.1365-3032.2005.00473.x.
- Tokuda, Gaku, Yuuri Tsuboi, Kumiko Kihara, Seikou Saitou, Sigeharu Moriya, Nathan Lo, a Jun Kikuchi. 2014. „Metabolomic profiling of <sup>13</sup>C-labelled cellulose digestion in a lower termite: insights into gut symbiont function". *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 281 (1789). doi:10.1098/rspb.2014.0990.
- Tokura, null, null Ohkuma, a null Kudo. 2000. „Molecular Phylogeny of Methanogens Associated with Flagellated Protists in the Gut and with the Gut Epithelium of Termites". *FEMS Microbiology Ecology* 33 (3): 233–40.
- Wang, Xiudan, Zongqing Wang, a Yanli Che. 2014. „A Taxonomic Study of the Genus Panesthia (Blattodea, Blaberidae, Panesthiinae) from China with Descriptions of One New Species, One New Subspecies and the Male of Panesthia Antennata". *ZooKeys* 466 (prosinec): 53–75. doi:10.3897/zookeys.466.8111.
- Watanabe, H., H. Noda, G. Tokuda, a N. Lo. 1998. „A Cellulase Gene of Termite Origin". *Nature* 394 (6691): 330–31. doi:10.1038/28527.
- Wenzel, M., I. Schönig, M. Berchtold, P. Kämpfer, a H. König. 2002. „Aerobic and Facultatively Anaerobic Cellulolytic Bacteria from the Gut of the Termite *Zootermopsis Angusticollis*". *Journal of Applied Microbiology* 92 (1): 32–40.
- Wenzel, Marika, Renate Radek, Guy Brugerolle, a Helmut König. 2003. „Identification of the ectosymbiotic bacteria of *Mixotricha paradoxa* involved in movement symbiosis". *European Journal of Protistology* 39 (1): 11–23. doi:10.1078/0932-4739-00893.

- Wier, Andrew, Michael Dolan, David Grimaldi, Ricardo Guerrero, Jorge Wagensberg, a Lynn Margulis. 2002. „Spirochete and protist symbionts of a termite (*Mastotermes electrodomenicus*) in Miocene amber". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (3): 1410–13. doi:10.1073/pnas.022643899.
- Xinning Zhang, a Jared R. Leadbetter. 2012. „Evidence for Cascades of Perturbation and Adaptation in the Metabolic Genes of Higher Termite Gut Symbionts". <http://mbio.asm.org/content/3/4/e00223-12/F1.expansion.html>.
- Yamaoka, I., a Y. Nagatani. 1975. „Cellulose digestion system in the termite, *Reticulitermes speratus* (Kolbe). producing sites and physiological significance of two kinds of cellulase in the worker". *Zool Mag Tokyo*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302744225>.
- Yang, Hong, Dirk Schmitt-Wagner, Ulrich Stingl, a Andreas Brune. 2005. „Niche Heterogeneity Determines Bacterial Community Structure in the Termite Gut (*Reticulitermes Santonensis*)". *Environmental Microbiology* 7 (7): 916–32. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00760.x.
- Yarza, Pablo, Pelin Yilmaz, Elmar Priesse, Frank Oliver Glöckner, Wolfgang Ludwig, Karl-Heinz Schleifer, William B. Whitman, Jean Euzéby, Rudolf Amann, a Ramon Rosselló-Móra. 2014. „Uniting the Classification of Cultured and Uncultured Bacteria and Archaea Using 16S rRNA Gene Sequences". *Nature Reviews Microbiology* 12 (9): 635–45. doi:10.1038/nrmicro3330.