VLIV BAKTERIÁLNÍHO KMENE *ESCHERICHIA COLI* NA DEKOLORIZAČNÍ SCHOPNOST HOUBY *DICHOMITUS SQUALENS*

Hana Válková[1]
[1]*Ostravská univerzita, Katedra biologie a ekologie, 30. dubna, Ostrava 70103, hanulka.valkova@seznam.cz*

Abstrakt

Houby bílé hniloby (HBH) jsou heterogenní skupina organismů řadící se mezi basidiomycety. Tyto houby mají schopnost degradovat lignin, jeden z nejrezistentnějších biopolymerů v přírodě, za pomoci ligninolytických enzymů. Díky své nízké substrátové specifitě mají HBH široký biodegradační potenciál a jsou využitelné při transformaci např. syntetických barviv. V přirozených podmínkách houby interagují s ostatními mikroorganismy, proto se výzkum v poslední době zaměřuje i na tyto interakce a na degradace pomocí smíšených mikrobiálních kultur. Tato práce byla zaměřena na degradaci antrachinonového barviva RBBR houbou *D. squalens* a ovlivnění tohoto procesu přítomností bakteriálního kmene *E. coli*. Dle získaných výsledků nemá přítomnost bakterií vliv na dekolorizační kapacitu houby.

Klíčová slova: *Dichomitus squalens, Escherichia coli, interakce, dekolorizace, RBBR*

Úvod

Velké množství barviv se využívá v textilním průmyslu a následně je vypouštěno ve formě odpadních vod, které znečišťují jak vodní tak i terestrické ekosystémy. Eliminace odpadů obsahujících barviva je převážně založena na fyzikálních a chemických postupech jako jsou precipitace, adsorpce či membránová filtrace. Tyto metody bývají však finančně nákladné a mohou při nich vznikat jiné toxické produkty. Proto je pozornost zaměřována na možnosti využití biodegradačního potenciálu organismů žijících kolem nás. [1.].

K těmto organismům patří také houby bílé hniloby (HBH). Díky produkci ligninolytických extracelulárních enzymů jsou schopny degradovat lignin. Kvůli nepravidelné struktuře ligninu je jejich substrátová specifita velmi nízká a díky tomu mají ligninolytické houby široký biodegradační potenciál. Bylo prokázáno, že HBH jsou schopny, mimo jiné, v laboratorních podmínkách účinně degradovat syntetická barviva [2.], [3.].

V přirozeném prostředí však hyfy hub při kolonizaci substrátu mohou prorůstat do půdy, kde se dostávají do kontaktu s ostatními mikroorganismy žijícími v půdě. Tyto interakce mohou mít vliv na degradační schopnost hub. Proto jsou dnes tyto interakce intenzivně studovány [6.], [4.], [5.]. V případě studií, které se zabývají degradací PAU, byl zjištěn spíše negativní vliv na účinnost degradace houbami pod vlivem bakteriální kontaminace [7.], [4.]. Naproti tomu, ve výzkumech týkajících se degradace syntetických barviv a bioremediace textilních odpadních vod byl zjištěn buď žádný, nebo naopak pozitivní vliv interakcí bakterií a hub na dekolorizaci barviv [8.], [9.].

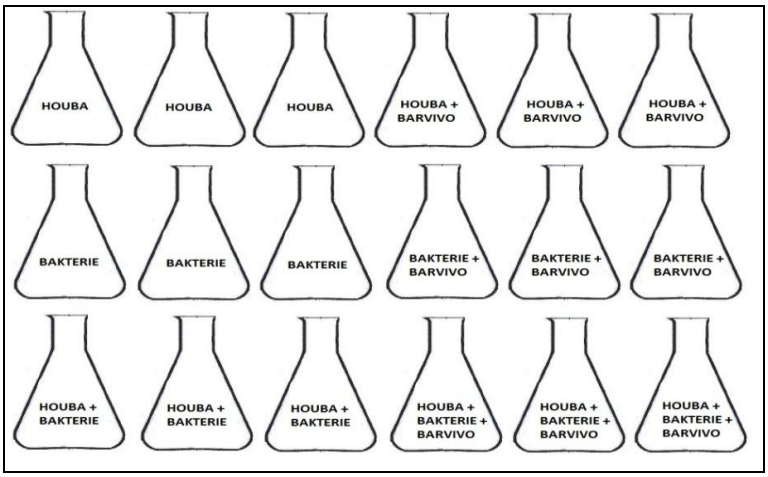
Tato práce byla věnována studiu vlivu přítomnosti bakteriálního kmene *E. coli* na degradační kapacitu houbového organismu *D. squalens*. Pro studium dekolorizace bylo zvoleno antrachinonové barvivo Remazol Brilliant Blue R (RBBR).

Materiál a metody

V experimentu byl použit houbový kmen *Dichomitus squalens* ze sbírky basidiomycetů Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i. v Praze a bakteriální kmen *Escherichia coli* CCM 3988. Jako modelové bylo zvoleno antrachinonové barvivo Remazol Brilliant Blue R (Sigma, p. a.).

Pokusy byly provedeny v Erlenmayerových baňkách o objemu 250ml. Pro kultivaci bylo zvoleno Kirkovo médium pH 6.

Metodika: Polyamidové drátěnky byly vloženy do Erlenmayerových baněk, kde sloužily jako nosič. Médium bylo připraveno smícháním daných složek a jeho pH bylo upraveno na hodnotu 6 pomocí 8% NaOH a 36% HCl. Baňky i médium byly sterilizovány autoklávováním po dobu 20 minut při 120°C. Do každé baňky bylo aplikováno 100ml Kirkova média a 10ml homogenní houbové kultury. Do zvolených paralelních baněk byl přidán 1 ml suspenze bakteriálního kmene *E. coli* v koncentraci 10^6 CFU, která byla připravena naředěním bakteriální kultury rostoucí 20 hodin. V prvním pokusu byla suspenze přidána po týdenním růstu houby, v druhém případě současně s homogenizovanou houbovou kulturou. Po týdnu, kdy byla houba vystavena bakteriální kontaminaci, bylo přidáno do zvolených baněk barvivo RBBR v koncentraci 150mg/l. Jako kontroly sloužily čisté houbové a bakteriální kultury. Pokusy byly připraveny podle schématu na Obrázku 1. Přítomnost bakterií byla zjišťována metodou výsevu na MPA plotny každých 14 dní. Jednou týdně byly měřeny enzymatické aktivity (MnP, LIP a Lac) a dekolorizace barviva. V průběhu celého pokusu byly kultury kultivovány při 28°C v termostatu.



Obr. 1: Schéma pro přípravu experimentu.

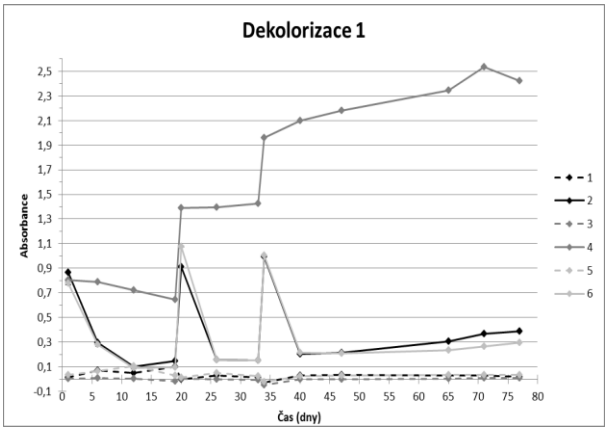
Výsledky a diskuse

Následující grafy (Obr. 2 – 5) zobrazují dekolorizaci RBBR v kulturách a aktivitu lakázy (Lac) v průběhu pokusů. Jak znázorňují Obr. 2 a 4, dekolorizace barviva byla efektivní v obou experimentech. Proběhly tři dekolorizační cykly, kdy RBBR bylo přidáno na začátku experimentů a pak ještě dvakrát v průběhu. Absorbance klesla v každém cyklu téměř k nule. Pouze během třetího dekolorizačního cyklu byly konečné hodnoty absorbance nepatrně vyšší než u dvou předcházejících cyklů. Mohlo to být způsobeno stářím kultur a tedy i nižší enzymatickou aktivitou, která s postupujícím časem klesala (viz. Obr. 3 a 5).

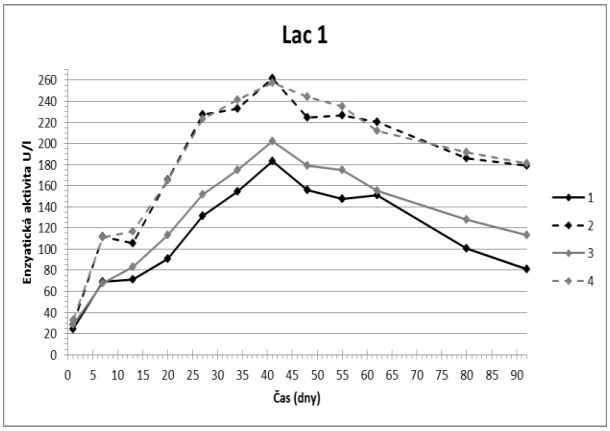
Byla naměřena vysoká aktivita Lac s maximem kolem 40. dne, poté hladina enzymu pozvolna klesala (Obr. 3 a 5). Vyšší aktivita Lac byla zjištěna v kulturách, do kterých bylo přidáváno RBBR. Je tedy zřejmé, že přítomnost barviva pozitivně stimulovala produkci Lac a ta se pak podílela na degradaci barviva.

Co se týče vlivu bakteriální kontaminace na degradační kapacitu *D. squalens*, barvivo bylo stejně rychle a účinně dekolorizováno jak ve smíšených tak v houbových kulturách (Obr. 2 a 4). Shodného výsledku bylo dosaženo při studii dekolorizace barviv houbou *Phanerochaete*

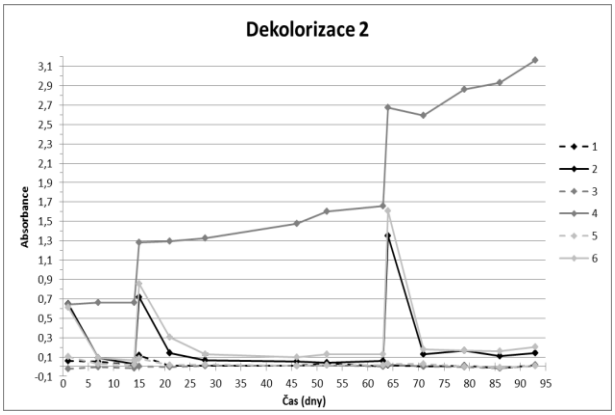
chrysosporium za přítomnosti bakterií. Nebyl zjištěn vliv jejich přítomnosti na dekolorizační schopnost houby [8.].



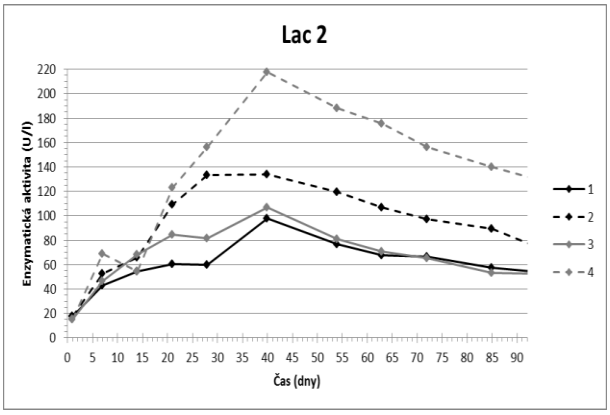
Obr. 2: První pokus: Dekolorizace RBBR kmenem *D. squalens.*



Obr. 3: Aktivita lakázy v prvním pokusu**.**



Obr. 4: Druhý pokus: Dekolorizace RBBR kmenem *D. squalens*



Obr. 5: Aktivita lakázy ve druhém pokusu.

Legenda:

Dekolorizace 1, 2:
1 – *D. squalens* (houbová kontrola)
2 – *D. squalens* + RBBR
3 – *E. coli* (bakteriální kontrola)
4 – *E. coli* + RBBR
5 – *D. squalens* + *E. coli*
6 – *D. squalens* + *E. coli* + RBBR

Lac 1, 2:
1 – *D. squalens*
2 – *D. squalens* + RBBR
3 – *D. squalens* + *E. coli*
4 – *D. squalens* + *E. coli* + RBBR

Závěr

Barvivo RBBR bylo účinně degradováno houbou *D. squalens*. V interakci s bakteriálním kmenem *E. coli* nebylo zjištěno snížení produkce ligninolytických enzymů ani omezení degradační schopnosti houbového organismu. Dekolorizace probíhala téměř identicky v kulturách s bakteriálním kmenem i bez něj. Tento výsledek je tedy dobrým předpokladem pro využití *D. squalens* v biotechnologiích. Při čištění textilních odpadních vod, v běžných, nesterilních podmínkách je totiž přítomnost bakterií nevyhnutelná.

Poděkování

Článek byl vypracován v rámci projektů: Project Institute of environmental technologies, reg. no. CZ.1.05/2.1.00/03.0100 podporovaný Operačním programem Výzkum a vývoj pro Inovace, financovaného ze strukturálních fondů EU a ze státního rozpočtu ČR; GAV IAA X00200901 Fungal biofilms for bioremediation of wastewater complementary to water treatment plants; FP7-KBBE-2012-6- 312100 BIOCLEAN — New BIOtechnologiCaL approaches for biodegrading and promoting the environmEntal biotrAnsformation of syNthetic polymeric materials. Dále bych ráda poděkovala Doc. RNDr. Čeňkovi Novotnému, CSc., Doc. RNDr. Kateřině Malachové, CSc., Mgr. Haně Mikeskové a Mgr. Jiřímu Červeňovi za pomoc při práci, cenné rady a ochotu.

Literatura

[1.] NOVOTNÝ, Č., RAWAL, B., BHATT, M., PATEL, M., ŠAŠEK, V., MOLITORIS, H. P., (1999): Fungal degradation of synthetic dyes. *Silver Jubilee Meeting Asian Mycology Congress* (IMACA). University Madras, India.

[2.] CHANDER, M., ARORA, D. S., BATH, H. K., (2004): Biodecolourisation of some industrial dyes by white-rot fungi. *Microbiol Biotechnol* 31: 94 – 97.

[3.] KNAPP, J. S., NEWBY, P. S., REECE, L. P., (1995): Decolorization of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi. *Enzyme Microb. Technol.* 17: 664 – 8.

[4.] BORRÀS, E., CAMINAL, G., SARRÀ, M., NOVOTNÝ, Č., (2010): Effect of soil bacteria on the ability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal by *Trametes versicolor* and *Irpex lacteus* from contaminated soil. *Soil Biology & Biochemistry* 42: 2087 – 2093.

[5.] MIKESKOVÁ, H., (2010): Interakce ligninolytických hub s vybranými kmeny bakterií. Ostravská univerzita, Ostrava (diplomová práce).

[6.] BALDRIAN, P., (2004): Increase of laccase aktivity during interspecific interactions of white-rot fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* 50: 245 – 253.

[7.] ANDERSSON, B. E., WELINDER, L., OLSSON, P. A., OLSSON, S., HENRYSSON, T., (2000): Growth of inoculated white-rot fungi and their interactions with the bacterial community in soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, as measured by phospholipid fatty acids. *Biores. Technol.* 73: 29 – 36.

[8.] GAO, D., ZENG, Y., WEN, X., QIAN, Y., (2008): Competition strategies for the incubation of white rot fungi under non-sterile conditions. *Process Biochemistry* 43: 937 – 944.

[9.] KADAM, A. A., TELKE, A. A., JAGTAP, S. S., GOVINDWAR, S. P., (2011): Decolorization of adsorbed textile dyes by developed consortium of *Pseudomonas sp*. SUK1 and *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146 under solid state fermentation. *J. Hazard. Mater*. 189: 486 – 494.

Abstract

White rot fungi are a heterogeneous group of organisms belonging to Basidiomycetes. These fungi have an ability to degrade lignin, one of the most resistant biopolymers in nature, with the help of ligninolytic enzymes. Thanks to a low substrate specifity of the ligninolytic enzymes white rot fungi have a wide potential for bioremediation and are useful for transformation of synthetic dyes. In natural conditions the fungi interact with other microorganisms and, therefore, the research focused on the biological interactions in mixed microbial cultures and their degradation efficiency. This work focused on the degradation of antraquinone dye RBBR by the fungus *D. squalens* and on the effect of the presence of a bacterial strain *E. coli* on this proces. According to the results, the presence of bacteria did not have an influence on the decolorization capacity of the fungus.