

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Paulína Pristašová

Anaeróbne huby a bylinožravce
Anaerobic fungi and herbivores

Bakalárska práce

Školiteľ: Prof. RNDr. Jan Tachezy, Ph.D.

Praha, 2023

Charles University
Faculty of Science

Pod'akovanie

Rada by som sa pod'akovala svojmu školiteľovi pánu Prof. RNDr. Jánovi Tachezemu, Ph.D., za odborné vedenie práce a veľkú dávku trpezlivosti, ako aj RNDr. Tamare Smutnej, Ph.D. za ochotu a cenné rady.

Prehlásenie:

Prehlasujem, že som záverečnú prácu spracovala samostatne a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe,

Podpis:

Abstrakt

Anaeróbne huby *Neocallimastigomycotina* patria k anaeróbnym symbiontom bachorového mikrobiómu. Táto špecifická skupina húb patrí k bazálnym líniam ríše Fungi, odlišujúca sa od aeróbných zástupcov húb v mnohých aspektoch, vrátane prítomnosti hydrogenozómov a tvorbou celulozómov. V bachore prebieha ich kompletný životný cyklus, zahrňujúci pohyblivé zoospóry, ktoré po kolonizácii rastlinnej biomasy vyklíčia vo vegetatívnu stielku, tvoriacu sporangium. V ekosystéme bachoru patria k primárnym kolonizátorom rastlinnej biomasy, kedy pomocou extracelulárnych multienzymových komplexov-celulozómov, degradujú odolnú bunkovú stenu rastlín. Schopnosť tvoriť celulozomy, doposiaľ pozorovanú len u prokaryot, získali horizontálnym génovým prenosom od bachorových baktérií. Výsledkom ich spoločnej koevolúcie sú taktiež pozorované syntrofické reakcie s metanogénmi, ktoré využívajú hubovými hydrogenzómami vytvorený H₂. Ich potencionálne biotechnologické využitie zahrňuje tvorbu bioplynu, či zefektívnenie zisku z potravy hospodárskeho dobytku.

Kľúčové slová: anaeróbne huby, bachor, hydrogenozóm, celulozóm

Abstract

Anaerobic fungi *Neocallimastigomycotina* participate in rumen symbiotic microbiome. This highly specific group of fungi are a part of the basal lineages of the Fungi kingdom, differing from their aerobic counterparts in many aspects, including the possession of hydrogenosomes and the production of cellulosomes. Their entire life cycle occurs in the rumen, comprising of motile zoospores, which after colonizing plant biomass, germinate into vegetative thallus, forming a sporangium. In the rumen ecosystem, anaerobic fungi are primary colonizers of ingested plant biomass, where with the help of extracellular multienzyme complexes- cellulosomes- degrade recalcitrant plant cell wall. The ability to form cellulosomes, until now observed in prokaryotes only, was acquired by horizontal gene transfer from rumen symbiotic bacteria. Their long coevolution also led to many syntrophic interactions with methanogens, which utilise H₂ produced by fungal hydrogenosomes. Their potential use in biotechnology includes biogas production and increased digestibility of agricultural feed.

Key words: anaerobic fungi, rumen, hydrogenosome, cellulosome

Obsah

Úvod	1
Bylinožravce ako životná stratégia	2
Prostredie bachora	2
Bachorový mikrobióm	3
Anaeróbne huby <i>Neocallimastigomycotina</i>	5
História skúmania	6
Evolúcia	6
Životný cyklus	7
Štádium zoospóry	7
Štádium vegetatívnej stielky	8
Rezistentné štádium	8
Sexuálne rozmnožovanie	8
Súčasná taxonómia	9
Molekulárne taxonomické metódy	9
Morfológia a veľkosť	10
Genóm	11
Metabolizmus	13
Anaeróbna degradácia celulózy	13
Hydrogenozómy	15
Metabolické dráhy	16
Odlišnosti metabolizmu <i>Neocallimastigomycotina</i>	17
Molekulárne adaptácie na syntrofické vzťahy s prokaryotmi	19
Sekundárne metabolity	20
Biotechnologické využitie	20
Produkcia bioplynu a biometánu	20
Efektívnejšie kŕmenie	21
Záver	23
Referencie	24

Úvod

Aj keď sa využívanie rastlín ako zdroja potravy vyskytuje v živočíšnej ríši relatívne často, v skutočnosti žiaden živočích nie je schopný tráviť celulózu. Jednou zo stratégií ako využívať celulózu, najabundantnejší polysacharid na Zemi majoritne zastúpený v bunkovej stene rastlín, je vytvorenie symbiotického orgánu, v ktorom budú existovať ideálne podmienky pre rast a metabolickú aktivitu mikroorganizmov, ktoré jediné sú schopné celulózu rozkladať (Gordon; Phillips, 1998). Najpreštudovanejším takýmto orgánom je práve bachor, prítomný u prežúvavcov (*Ruminantia*). Mikrobióm bachora je tvorený baktériami, vírusmi, archeami, protistami a ako objavil Dr. Orpin v roku 1975 aj anaeróbnymi zástupcami z ríše húb-*Neocallimastigomycotina* (Orpin, 1975). Tento objav zmenil dovtedy platiacu dogmu hovoriacu len o aeróbnom výskyte húb a podnietil mnoho výskumov zameraných na túto špecifickú skupinu húb. Napriek dokázanej prítomnosti chitínu v ich bunecnej stene (Orpin, 1977a), *Neocallimastigomycotina* sa od typických zástupcov ríše húb v mnohých ohľadoch líši.

Anaeróbne huby sú jedny z mála známych zástupcov z ríše húb, ktorí majú vo svojom životnom cykle pohyblivé štádium. Pozorované jedno/viacbičíkaté zoospóry patria k prvotným kolonizátorom skonzumovanej rastlinnej potravy, kedy kľúčiacie rhizoidy prenikajú do bunkovej steny rastlín a zefektívňujú kolonizáciu rastlinnej biomasy aj ostatnými mikroorganizmami (Hess et al., 2020).

Jedným z rozdielov, ktorým sa anaeróbne huby *Neocallimastigomycotina* líšia od ostatných húb, je spôsob rozkladu pevnej polysacharidovej bunkovej steny rastlín. Rozklad celulózy u nich prebieha pomocou celulozómov, multienzýmových komplexov, zložených zo štruktúrnych proteínov a mnohých druhov CAZ enzýmov (Carbohydrate-Active enZymes), schopných rozkladať celulózu, hemicelulózu, xylózu, pektín a mnoho ďalších polysacharidov. Napriek pravdepodobnému zisku celulozómov horizontálnym prenosom génov od baktérií, celulozomy anaeróbných húb sa od bakteriálnych v mnohých ohľadoch líšia. Ich schopnosť rozkladať celulózu efektívnejšie než baktérie z nich robí vhodných adeptov na využitie v biotechnológií, ako napr. tvorbe bioplynu (Dollhofer et al., 2015).

Ďalším špecifikom anaeróbných húb je prítomnosť anaeróbnej formy mitochondrií-hydrogenozómov. Hydrogenozomy fixujú energiu vo forme ATP a produkujú molekulový H₂, ktorý sa následne uplatňuje v symbiotických interakciách s bakteriálnymi a archeálnymi metanogénmi (Ma et al., 2022). Tieto unikátne organely sa vyskytujú výlučne u niektorých skupín anaeróbných jednobunkových eukaryotických organizmov, u ktorých sa mierne líšia svojim metabolizmom (Ma et al., 2022).

V nasledujúcich kapitolách sa venujem prostrediu bachora a vybraným vlastnostiam tejto unikátnej skupiny húb, ich spôsobom života, ako aj ich možnému biotechnologickému využitiu.

Bylinožravce ako životná stratégia

Celulóza ako najabundantnejší polysacharid na svete, vyskytujúca sa v bunečnej stene rastlín predstavuje ľahko dostupný a obnoviteľný zdroj energie. Celulóza je polysacharid tvorený jednotkami D-glukózy spojených β -1,4-glykozidickými väzbami, usporiadanými do pevnej štruktúry mikrofibril. Tieto pevné väzby predstavujú problém pri využívaní rastlinnej biomasy ako zdroja energie, keďže schopnosť produkovať enzýmy schopné tieto väzby štiepiť - celulózy (Carbohydrate-Active enZymes- CAZ enzýmy) sa vyskytujú len u určitej skupiny mikroorganizmov (Jayasekara Ratnayake, n.d., 2019). Jedna zo stratégií, ako tento problém obísť, je vytvorenie symbiotického orgánu, ktorý bude predstavovať prostredie vhodné pre ich kultiváciu (Dehority, 2002; Gruninger et al., 2014).

V evolúcií vznikli 2 typy herbivorov u ktorých dochádza k tráveniu celulózy v rozdielnych častiach tráviacej sústavy - „foregut“ (pred-žalúdkom) a „hindgut“ (po-žalúdku) fermentátory. Medzi „hindgut“ fermentátorov patria napríklad nosorožce, hlodavce a kone. K fermentácii dochádza v tenkom a hrubom čreve, a v céku (*caecum*), ktoré sa nachádzajú za žalúdkom (Dehority, 2002). U „foregut“ fermentátorov dochádza k fermentácii pred začiatkom trávenia v žalúdku. Najväčšou skupinou „foregut“ fermentátorov sú bylinožravce so zloženým žalúdkom, ako sú krava, ovca, kozy, jelene, ťavy, ale napríklad aj niektoré vtáky (*Ophistocomidae*). U prežúvavcov (*Ruminantia*) je žalúdok tvorený 4 komorami: bachorom (*rumen*), čepcom (*reticulum*) a knihou (*omasum*) -tvoriace pred-žalúdok- a vlastným žalúdkom-slezom (*abomasum*). Práve bachor je miestom výskytu symbiotických baktérii, prvokov a húb, kde dochádza k fermentácii (Castillo-González et al., 2014).

Prostredie bachora

Prispôbovanie prežúvavcov na využitie rastlinnej biomasy viedlo k evolúcií bachora ako symbiotického orgánu. Napriek niekoľkým prebiehajúcim chemickým procesom ako sú fermentácia a metanogenéza, fyziologické podmienky v tomto vysoko špecializovanom orgáne sú relatívne stabilné. Bachor predstavuje striktné anaeróbne prostredie, s nízkym redoxným potenciálom v rozmedzí -150 až -350 mV. Jedným z dôsledkov metabolickej aktivity

symbiotických mikroorganizmov je produkcia bachorových plynov, pozostávajúcich hlavne z plynových koncových produktov ich metabolizmu- 65% CO₂ ako výsledok činnosti fermentujúcich baktérií, 31% CH₄ ako výsledok činnosti metanogénnych archeí, minoritne (4%) zastúpený je aj N₂ (Dehority, 2002; Moate et al., 1997). Z organických kyselín a HCO₃⁻ zo slín je produkované výrazne menšie množstvo CO₂. Prípadné zvýšenie koncentrácie HCO₃⁻ a rozpusteného CO₂ môže viesť k poškodeniu pufračnej schopnosti bachorovej šťavy a patologickému stavu (Laporte-Urbe, 2019). Vysoké koncentrácie HCO₃⁻ vedú ku zmenám pH, ktoré sa za normálnych okolností pohybujú okolo 6.5, v rozmedzí 5.5-7.0. Teplota dosahuje 39°C, čo umožňuje optimálny rast mezofilných mikroorganizmov. Jediným výrazne sa meniacim faktorom tohto prostredia je osmotický tlak, na ktorý výrazne vplýva príjem potravy. Po príjme potravy dosahuje až 400mOsm/kg, aj keď jeho normálne hodnoty predstavujú 250 mOsm/kg (Dehority, 2002).

Bachorový mikrobióm

V bachorovom ekosystéme symbioticky žijú zástupcovia všetkých skupín mikroorganizmov- protisti, huby, baktérie, archea aj vírusy, ktoré medzi sebou vzájomne interagujú a zdieľajú dlhodobú spoločnú evolúciu.

Analýzou sekvencií 16S rRNA bolo zistených viac než 7000 druhov baktérií, mnoho z nich doposiaľ neopísaných (McSweeney; Mackie 2012). S celkovým počtom 10¹⁰ – 10¹¹ buniek/ml, sú baktérie skupinou s najväčšou diverzitou aj zastúpením, pričom konkrétne zastúpenie druhov je ovplyvňované mnohými faktormi, najvýznamnejšie však zložením potravy (Matthews et al., 2019). Bakteriálne spoločenstvo bachora môže byť klasifikované do 5 hlavných skupín: celulózu degradujúce baktérie, laktát využívajúce baktérie, pektín degradujúce baktérie, proteolytické a lipolytické baktérie (Castillo-González et al., 2014). Rodmi s najvyšším zastúpením sú *Prevotella*, *Butyrivibrio* a *Ruminococcus* (Henderson et al., 2015).

Spoločenstvo bachorových archeí predstavuje 10⁶-10⁸ buniek/ ml, čo tvorí 4% z celého mikrobiómu. Aj napriek ich pomerne nízkemu zastúpeniu, ich prítomnosť zanedbateľná nie je. Archea vyskytujúce sa v bachore patria k tzv. metanogénom, kedy ich metabolizmus využíva plynný vodík produkovaný zástupcami húb a protist, ktorý využívajú na redukciu CO₂ za súčasnej produkcie metánu. Ich metabolická aktivita vedie k odstráneniu plynného vodíku, a tým tvoria optimálne podmienky pre ostatné mikroorganizmy. V dôsledku dlhodobej koevolúcie vznikli komplexné medzidruhové syntrofické interakcie, napríklad s anaeróbnymi

hubami, ktorých hlavným produktom metabolizmu je práve H₂ (Cheng et al., 2018; Dollhofer et al., 2020). Metanogénne archea vtedy rastú na povrchu húb, pravdepodobne kvôli obmedzeniu voľnej difúzie H₂ (Marvin-Sikkema et al., 1990). Metabolická aktivita archea má však aj negatívne účinky na využiteľnosť potravy, keďže tvorba metánu predstavuje niekedy až 12% stratu potenciálne využiteľnej energie z prijatej potravy. Vylučovaný metán, ako silný skleníkový plyn, má taktiež negatívne environmentálne dopady. Najzastúpenejším rodom Archea je *Methanobrevibacter* (63.2%), prítomné sú aj *Methanomicrobium*, *Methanosphaera* a *Thermoplasma* (Matthews et al., 2019).

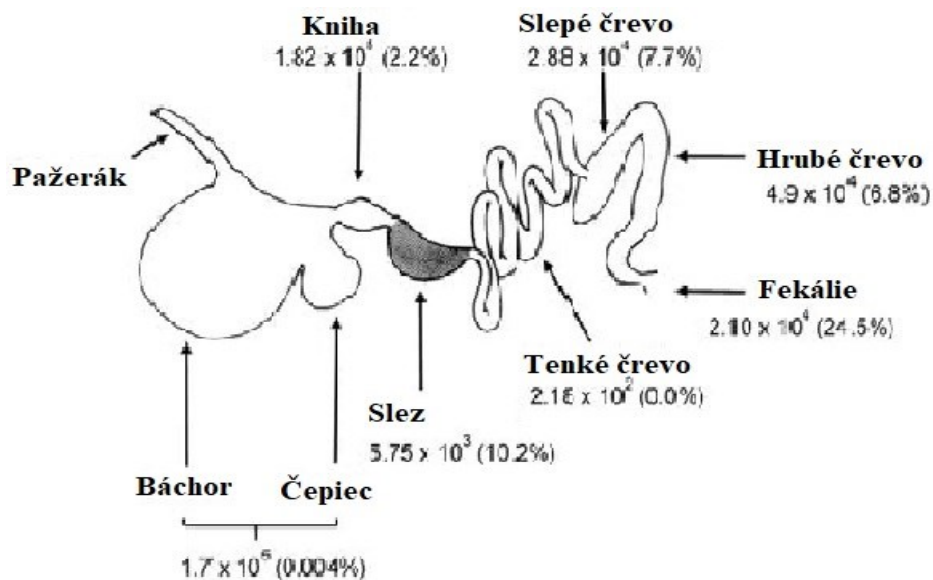
Viróm bachora pozostáva z 10⁷ – 10⁹ vírových partikul/ gram trávanej potravy, pričom je výrazne ovplyvňovaný vonkajšími faktormi. V súčasnosti je predmetom výskumu ich úloha v bachore, ktorá by vysvetľovala ich vysoké zastúpenie. Väčšinu spoločenstva tvoria bakteriofágy, prirodzené bakteriálne patogény, ktoré v mnohých spoločenstvách bývajú jedným z hlavných motorov evolúcie- transdukcie, spôsobu horizontálneho génového prenosu (Matthews et al., 2019). Jedným z možných dôkazov úspešnosti tohto procesu je pravdepodobný prenos génov pre CAZ enzýmy z baktérií do anaeróbných húb (Dollhofer et al., 2020; Wang et al., 2019).

Protisti (jednobunkové eukaryota) sa vyskytujú v relatívne nižších počtoch, v rozmedzí medzi 10⁴-10⁶ buniek/ml, ale vzhľadom na to, že ide o eukaryotické mikroorganizmy môžu predstavovať až 50% mikrobiálnej biomasy. Najčastejšie pozorovanými druhmi sú nálevníky z rodov: *Epidinium caudatum*, *Entodinium caudatum* a *Isotricha prostoma* (*Ciliophora*) (McSweeney; Mackie 2012). V bachore sa podieľajú na 40% celkového rozkladu rastlinnej biomasy pomocou intracelulárnych CAZ-enzýmov- glykozyhydroxyláz, xylanáz a nedávno objavených chitináz, ktoré pravdepodobne slúžia na trávenie buncnej steny bachorových anaeróbných húb. Týmto by mohli dané druhy predstavovať potencionalneho predátora týchto húb (Williams et al., 2020). Významne sa podieľajú aj na procese metanogenézy, kedy ich hydrogenozómami produkovaný H₂ je hlavným zdrojom energie pre metanogénne archea. Práve metanogény boli pozorované na povrchu týchto protist, alebo intracelulárne ako endosymbionti (Finlay et al., 1994; Vogels et al., 1980). Na zníženie emisií metánu sú vyvíjané rôzne metódy defaunácie- odstránenie spoločenstiev protozoa ako sprostredkovateľa 37% metanogenézy (Finlay et al., 1994).

Anaeróbne huby sa nachádzajú v celom tráviacom trakte, aj keď výrazne najväčšie zastúpenie majú v bachore a v knihe vid' obrázok č.1 (Davies et al., 1993). V bachore sa vyskytujú v počte 10³-10⁶ zoospór/ml. Ich zastúpenie je variabilné: pozorované boli 6.03x10⁴ t.f.u. (*thallus forming units*) v dojniciach, oproti 2,04x10⁵ t.f.u. vo

voloch (Davies et al., 1993). Patria medzi prvotných kolonizátorov rastlinnej hmoty a pomocou nimi kódovaných xylanáz, hemiceluláz a celuláz sa podieľajú na jej degradácii (Matthews et al., 2019). Ich morfológií, adaptáciám, genetike a úlohe v bachore sa venujú nasledujúce kapitoly.

Obrázok č.1: Zastúpenie anaeróbných húb v tráviacom trakte prežúvavcov



Grafické zobrazenie tráviaceho traktu prežúvavcov. Mikrobiálne trávenie prebieha pred pravým trávením, ktoré prebieha v slezy. Hodnoty predstavujú počet kultivovateľných kultúr anaeróbných húb na gram sušiny (*thallus forming units*, t.f.u. / g*DM⁻¹) odobraných z jednotlivých orgánov. Hodnoty v zátvorkách predstavujú počet kultúr, ktoré boli kultivovateľné po 7 dňoch. Zastúpenia: bachor + čepiec $1,7 \times 10^5$ (0,004%), kniha $1,82 \times 10^4$ (2,2%), slez $5,75 \times 10^3$ (10,2%), tenké črevo $2,16 \times 10^2$ (0%), slepé črevo $2,88 \times 10^4$ (7,7%), hrubé črevo $4,9 \times 10^4$ (6,8%), fekálie $2,10 \times 10^4$ (24,5%) t.f.u./g*DM⁻¹ (Saye et al., 2021).

Anaeróbné huby *Neocallimastigomycotina*

Neocallimastigomycotina je monofyletická skupina húb, patriaca k bazálnym líniam ríše *Fungi*. Vyskytujú sa len v gastrointestinálnom trakte živočíchov, ktorých časť prijímanej potravy tvorí rastlinná biomasa, ako napríklad bylinožravé cicavce- prežúvavce, alebo aj ťavy (Dagar et al., 2015), či bylinožravé reptília (identifikované u leguána zeleného (*Iguana iguana*)) (Liggenstoffer et al., 2010). Táto skupina húb je jediná známa skupina húb žijúca v anaeróbnom prostredí. Adaptácie na život v tomto, pre huby netradičnom prostredí, sú to hlavné, čím sa líšia od typických aeróbných zástupcov húb, ako je napríklad prítomnosť anaeróbnej formy mitochondrií- hydrogenozómov, či tvorba celulozómov. Od ich objavu v 70. rokoch prebiehajú extenzívne výskumy ohľadom ich potencionálneho využitia pre ľudstvo- tvorba bioplynu, biometánu, bioetanolu či zefektívnenie energetického zisku z potravy hospodárskych zvierat.

História skúmania

Prvé pozorovanie *Neocallimastigomycotina* bolo dokumentované už na začiatku 20. storočia. Medzi prvotne opísané druhy patrili *Sphaeromonas communis* (Liebetanz, 1910), *Callimastix cyclopis* (Weissenberg, 1912) a *Callimastix frontalis* (Braune, 1913). Všetky tieto druhy boli pozorované v ich pohyblivom štádiu bičíkatých zoospór, a preto pravdepodobne došlo k ich zaradeniu do ríše *Protozoa* (rad *Polymastigina*, čeľaď *Callimastigidae* da Fonseca, rod *Callimastix*) (Hess et al., 2020; Orpin, 1975). Nasledovalo niekoľko pokusov o reklasifikovanie niektorých druhov rodu *Callimastix* do v súčasnosti zastaralého taxónu hub *Phycomycota*, čo dalo za vznik rodu *Neocallimastix* a zariadenia do ríše húb (Saye et al., 2021).

Avšak definitívne dôkazy o príslušnosti danej skupiny do ríše *Fungi* poskytol až Orpin v roku 1975 pri skúmaní fluktuácií populácií *Neocallimastix frontalis* v bachore defaunovaných a faunovaných oviec za použitia Abou Akkadovej metódy. Táto metóda využíva dokusát sodný (DOS), kedy po jeho pridaní do potravy dobytku dochádza k vymiznutiu všetkých ciliát z gastrointestinálneho traktu kráv (Abou Akkada et al., 1968). Orpin pozoroval, že aj po pridaní DOS do potravy oviec, boli populácie *Neocallimastix* v bachore stále prítomné (Orpin, 1975). Táto práca vyvrátila platnú dogmu 20. storočia, ktorá hovorila o výlučne aeróbnom výskyte húb. Orpin ďalej potvrdil, že sa jedná o obligátne bachorové organizmy (rast iba v bachorových podmienkach), a navrhol, že pozorované rhizoidné štádium, nevyskytujúce sa u žiadnej skupiny protíst, značí o príslušnosti tejto skupiny organizmov do ríše *Fungi* (Orpin, 1975). Orpinove pozorovania boli následne potvrdené v pokusoch z roku 1977, kedy pozorovaná strata hmotnosti kultúry po pridaní chitináz, a uvoľnenie N-acetylglukozamínu, potvrdili prítomnosť chitínu v bunečnej stene *Neocallimastix frontalis*, *Sphaeromonas communis* a *Piromonas communis*. Na základe pozorovanej morfológie a citlivosti k antibiotikám boli druhy *N. frontalis*, *P. communis* a *S. communis* zaradené do rádu *Chytridiales*. (Orpin, 1977a).

Evolúcia

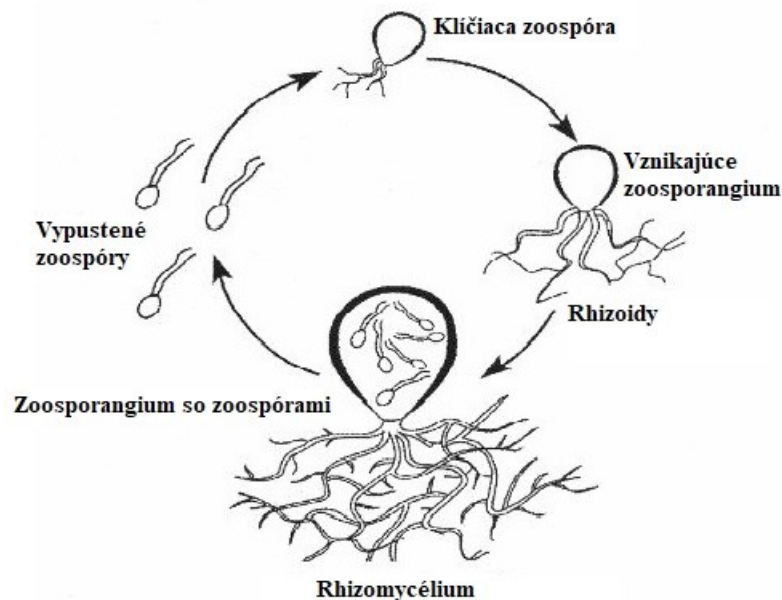
Evolúcia *Neocallimastigomycotina* úzko súvisí s evolúciou prežúvavcov. Posledný spoločný predok aeróbných a anaeróbných druhov húb sa datuje do obdobia Kriedy, pred 66 ±10 miliónov rokov. Toto časové obdobie je taktiež spojené s objavením sa tráv (*Poaceae*) a s prechodom cicavcov od hmyzožravosti k byľinožravosti (Wang et al., 2019). Významným prvkom evolučného vývoja týchto húb je horizontálny prenos genetickej informácie (HGT), ku ktorému v tomto prostredí výrazne obývanom prokaryotmi, pravdepodobne došlo

niekoľkokrát. Dôkazom niekoľkých individuálnych udalostí HGT sú napríklad gény kódujúce CAZ enzýmy pôvodom z rôznych bakteriálnych línií (Wang et al., 2019).

Životný cyklus

Životný cyklus *Neocallimastigomycotina* môže trvať od 24 do 32 hodín (Orpin, 1994) a spočíva v striedaní 2 fyziologicky aj morfológicky výrazne odlišných štádií- motilná poly/mono flagelárna zoospóra a vegetatívna rhizoidná/bulboidná stielka tvoriaca zoosporangia, vid' obrázok č.2.

Obrázok č.2: Životný cyklus anaeróbnych húb



Obrázok znázorňuje životný cyklus anaeróbnych húb. Jedno/dvoj bičíkaté zoospóry (na obrázku dvojbičíkaté) po kolonizácii rastlinnej biomasy vyklíčia, vytvoria rhizoidy a zoosporangium, z ktorého sú po dozretí následne po prijatí potravy vypustené ďalšie zoospóry (Nagpal et al., n.d., 2008).

Štádium zoospóry

Toto pohyblivé štádium začína uvoľnením zoospór zo zoosporangia, ktoré je spúšťané, keď sa hostiteľom prijatá potrava dostane do bachora. Vtedy môže byť pozorovaný 10-45x násobný nárast množstva zoospór v bachore (Orpin, 1977b). Následne začína kolonizácia rastlinnej biomasy, ktorá je pozorovateľná už po 5 minútach (Edwards et al., 2008). Pohyb zoospór je sprostredkovaný jedným, alebo niekoľkými bičikmi, čo predstavuje jeden z taxonomických znakov. Pohyb zoospór je orientovaný na základe gradientu chemických látok- pozorovaná chemotaxia smerom k rastlinným sacharidom a fenolovým kyselinám (Hess

et al., 2020). Na povrchu zoospór boli identifikované 4 skupiny chemoreceptorov- glukózový, sacharózový, manózový a sorbitolový. Zoospóry nekolonizujú rastlinné tkanivá rovnomerne, ale vykazujú značnú preferenciu voči sacharidom z tkanív súkvetia a osti (Orpin; Bountiff, 1978).

Po kontakte s rastlinnou biomasou strácajú zoospóry bičik/y a následne klíčia a tvoria hubovú stielku, prenikajúcu do rastlinnej hmoty (Hess et al., 2020).

Štádium vegetatívnej stielky

Podľa morfológie môžu byť vegetatívne stielky rozdelené do dvoch hlavných (v taxonómii využívaných) skupín. Podľa tvaru na rhizoidné a bulboidné, a podľa počtu centier rastu na monocentrické- s jedným centrom rastu a polycentrické- s viacerými centrami rastu (Dollhofer, et al., 2020).

U monocentrických druhov môže byť typ rastu endogénny- jadro ostáva v zoospóre a vznikajú bezjadrové rhizoidy. Zoosporangium vzniká z miesta klíčenia zoospóry (Hess et al., 2020). U niektorých druhov, ako napríklad *Piromyces spp.* pozorujeme exogénny rast: jadro sa presúva sporangioforom, vzniknutým na opačnej strane, než je strana rastu rhizoidu a na jeho konci vzniká zoosporangium (Barr, Kudo et al. 1989 citované Hess et al., 2020).

U polycentrických druhov sa zárodočná trubica mení na rhizomycélium, ktoré dá vzniknúť viacerým zoosporangiám (Hess et al., 2020).

K uvoľneniu zoospór zo zoosporangií dochádza cez široký apikálny pór. Pri uvoľňovaní nedochádza k zničeniu štruktúry zoosporangia (Hanafy et al., 2017).

Rezistentné štádium

Po prvom úspešnom izolovaní anaeróbných húb z ovčích *faeces* sa začali vyskytovať náznaky o existencii potencionalneho tretieho životného štádia anaeróbných bachorových húb. Keďže huby izolované z *faeces* na rozdiel od izolátov z bachora sú odolnejšie voči vysušeniu a prežívajú v oxickom prostredí, ich životné štádium predstavuje rezistentnú, kľudovú fázu (cysta alebo rezistentné zoosporangium) (Davies et al., 1993; McGranaghan et al., 2006). Prítomnosť rezistentného štádia životného cyklu pravdepodobne slúži k prenosu medzi hostiteľmi, alebo medzi matkou a potomkom. Avšak charakter týchto kľudových štádií nie je doposiaľ jasný (McGranaghan et al., 2006).

Sexuálne rozmnožovanie

Aj keď sexuálny cyklus u *Neocallimastigomycotina* nebol doposiaľ pozorovaný, v ich génóme boli identifikované gény zúčastňujúce sa pohlavného procesu (meiotické rekombinázy, homológy kináz). Ich výskyt v génóme podporuje hypotézu, že schopnosť pohlavného

rozmnožovania je typická pre všetkých zástupcov ríše *Fungi*. Neprítomnosť typických znakov sexuálneho rozmnožovania (GC bohaté oblasti, určité gény) by znamenala len nízku frekvenciu tejto udalosti (Wilken et al., 2020). Táto hypotéza je podporovaná aj nedávnou identifikáciou génov pre sexuálne rozmnožovanie v genóme húb radu *Glomeromycota*, s podobne nízkym obsahom GC párov (okolo 32%), u ktorého sa sexuálne rozmnožovanie doteraz taktiež nepredpokladalo. Prítomnosť daných génov indikuje, že *Neocallimastigomycotina* sú (aj keď s nízkou frekvenciou) schopné sexuálneho rozmnožovania, resp. že niekedy v priebehu evolučného vývoja mali schopnosť sa sexuálne rozmnožovať (Wilken et al., 2020).

Súčasná taxonómia

Hlavnými morfológickými taxonomickými znakmi kmeňa *Neocallimastigomycotina* sú počet bičiek zoospóry, tvar stielky, či tvorba zoosporangia. V súčasnosti pozostáva tento kmeň z jedného radu *Neocallimastigales* a jednej čeľadi *Neocallimastigaceae*. Do nej je zaradených 18 rodov:

- monocentrické rhizoidné: *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Oontomyces*, *Buwchfawromyces*, *Pecoromyces*, *Liebetanzomyces*, *Feromyces*, *Agriosomyces*, *Aklioshbomyces*, *Capellomyces*, *Ghazallomyces*, *Joblinomyces*, *Khoyollomyces* a *Tahromyces*;
- polycentrické rhizoidné *Anaeromyces* a *Orpinomyces*;
- polycentrické bulboidné *Caecomyces*, *Cyllamyces* (Hess et al., 2020)

Molekulárne taxonomické metódy

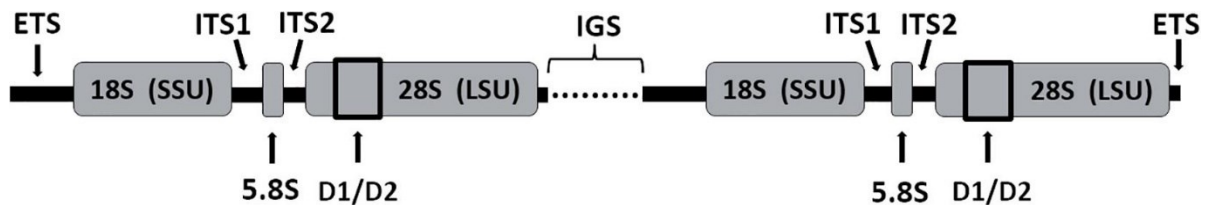
Dlhodobou používanou molekulárnou metódou využívajú ITS1 (*Internal Transcribed Spacer*) oblasť - čo je DNA medzerník ležiaci medzi génmi pre malú a veľkú ribozomálnu podjednotku (18S a 28S rRNA) (Koetschan et al., 2014), vid' obrázok č.3. V súčasnosti sa ale začínajú vyskytovať problémy s využívaním ITS1 ako barcode markeru pre anaeróbne huby (Edwards et al., 2019) najmä kvôli vysokému polymorfizmu jeho sekvencie (Callaghan et al., 2015) a kvôli jeho príliš variabilnej veľkosti (Edwards et al., 2008).

Ako potencionálna náhrada ITS1 markeru sa javí gén LSU rRNA (Large Sub-Unit rRNA), s veľkosťou 3500 bp kódujúci 28S rRNA ribozomálnu podjednotku, nevykazujúci žiadne zo spomínaných limitov ITS1 (Edwards et al., 2017).

Práve pomocou molekulárnych fylogenetických taxonomických metód došlo k reklasifikovaniu *Neocallimastigomycotina* ako samostatnej bazálnej líniei

húb (Hibbett et al., 2007). Klasifikácia založená na morfológií dovtedy prirad'ovala tieto huby ku *Chytridiomycota*, radu *Neocallimasticales* (J. Li et al., 1993).

Obrázok č.3: V súčasnosti využívaný taxonomický marker pre anaeróbne huby, ribozomálny RNA operon



RNA operon: gény kódujúce malú (SSU;18S), veľkú (LSU;28S) a 5,8S podjednotku, interný transkribovaný medzerník 1 a 2 (ITS1, ITS2), oddel'ované intergénovým medzerníkom (IGS) ohraničené externý transkribovanými medzerníkmi (Hess et al., 2020).

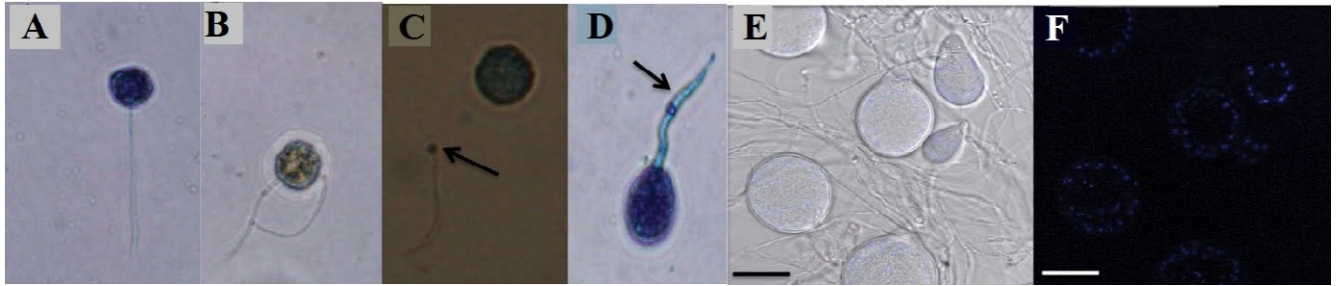
Morfológia a veľkosť

Morfológia anaeróbnych húb sa výrazne mení v priebehu životného cyklu, vid' obrázok č.4. S ich morfológiou sa súčasne mení aj ich veľkosť.

Pohyblivá časť životného cyklu- zoospóry- sú sférické, s priemerom $7,6 \pm 1,5 \mu\text{m}$. Počet bičiekov je taxonomickým znakom, najčastejšie pozorované sú jednobičikaté zoospóry, s dĺžkou bičička okolo $18 \mu\text{m}$. Dvojbičikaté zoospóry tvoria 6-9% pozorovaných zoospór (merané u *Pecoramyces ruminantium*). Zoospóry pri klíčení strácajú bičik (Hanafy et al., 2017).

Veľkosť a tvar endogénnych sporangií bola vysoko variabilná, od menších sféroidov s priemerom $7-20 \mu\text{m}$, až po veľké ovály s výškou $65-140 \mu\text{m}$ a šírkou $45 \mu\text{m}$. U exogénnych sporangií sa tvar aj veľkosť behom rastu menili. Mladé sporangiá boli sférické, s priemerom v rozmedzí $10-60 \mu\text{m}$, alebo oválne s dĺžkou $10-50 \mu\text{m}$ a šírkou $7-30 \mu\text{m}$. Dospelé sporangiá mali veľkosť v rozmedzí $40-155 \times 20-50 \mu\text{m}$, so sférickým, oválnym, elipsoidným a hruškovitým tvarom. Dĺžka sporangiofórov bola v rozmedzí $5-150 \mu\text{m}$. Apikálne štruktúry mali tvar vajca, tvar apifyzy, alebo netvorili žiaden dištinkívny tvar (Hanafy et al., 2017).

Obrázok č.4: Morfológia *Pecaromyces ruminantium* kmeň C1A



Zoospóry boli pozorované pomocou svetelnej mikroskopie. Obrázky A, B, C, D sú farbené LCB (lactophenol cotton blue) Obrázok A znázorňuje jednobíčičatú zoospóru, obrázok B dvojbíčičatú zoospóru. Obrázok C znázorňuje zoospórickú cystu, šípka odkazuje na odpojený bičík. Obrázok D znázorňuje klíčiacu zoospórickú cystu, šípka označuje zárodočnú trubicu. Obrázky E a F znázorňujú monocentrickú stielku. Na obrázku F boli ofarbené jadrá DAPI a pozorované na fluorescencnom mikroskope. Jadrá sa vyskytovali len v sporangiu, neprítomné boli v rhizoidoch a v sporangiofore. Obrázky odobrané z Hanafy et al., 2017.

Genóm

Napriek ich potenciálu je množstvo sekvenovaných a analyzovaných genómov druhov skupiny *Neocallimastigomycotina* minimálne. Doposiaľ bolo publikovaných 11 sekvenovaných genómov anaeróbných húb: *Pecaromyces ruminantium* (predtým *Orpinomyces*) (kmeň C1A), *Piromyces* sp. (kmeň E2), *Piromyces finnis*, *Pyromyces* sp., *Caecomyces* sp., *Neocallimastix californiae*, *Neocallimastix* sp., kmeň JGI-2020, kmeň WI3-B, *Anaeromyces robustus* a najnovšie *Neocallimastix lanati* (Ma et al., 2022).

Veľkosť genómu bola pozorovaná v rozmedzí od 56,46 Mb u *Piromyces finnis* do 200,97 Mb u *Neocallimastix* sp. Pre súhrn základných informácií o niekoľko doteraz osekvenovaných genómoch vid' tabuľka č.1.

Tabuľka č.1 : Súhrn osekvenovaných genómov dostupných v GeneBank databáze na *National Library of Medicine* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse#!/overview/Neocallimastigales>, 4.4.2023):

Druh	Veľkosť (Mb)	Obsah GC párov (%)	Proteíny	tRNA	Gény	Pseudogény
<i>Anaeromyces robustus</i>	71,69	16,3	12 833	260	13,083	2
<i>Caecomyces sp.</i>	57,84	18,9	-	-	-	-
<i>Neocallimastix californiae</i>	193,03	18,2	20 214	839	21,039	11
<i>Neocallimastix sp. JGI-2020a</i>	200,97	18,3	27 675	2015	29 690	14
<i>Pecaromyces ruminantium</i>	100,95	17	-	-	-	-
<i>Piromyces finnis</i>	56,46	21,2	10 978	355	11 314	-
<i>Piromyces sp.</i>	65,29	19,1	-	-	-	-
<i>Piromyces sp. E2</i>	71,02	32,5	14 612	-	14 612	-

Jedným z charakteristických znakov genómov kmeňa *Neocallimastigomycotina* je jedno z najnižších zastúpení GC párov v ríši húb v priemernom rozsahu od 16% do 22% genómu (Wilken et al., 2020). Percentuálne zastúpenie GC párov je výrazne nižšie v nekódujúcich častiach DNA, ktoré u niektorých druhov predstavujú viac než 70% genómu. U druhu *Orpinomyces CIA* bolo pozorované jedno z najnižších zastúpení GC párov- v priemere 17%, v kódujúcich génoch 26,8%, v nekódujúcich častiach: 14,8% v intergénových sekvenciách a 8,1% v intrónoch (Couger et al., 2015). AT bohaté oblasti predstavujú veľkú prekážku v rôznych sekvenčných metódach, v metóde CRISPR, či pri návrhu primérov (Wilken et al., 2020). Dôvod nízkeho zastúpenia GC párov nebol doteraz objasnený. Vylúčený bol predpoklad fylogenetickej závislosti, keďže *Chytridiomycetes*- príbuzná bazálna línia húb, má GC obsah okolo 56% (Wilken et al., 2020). Nízky obsah GC párov v genóme taktiež ovplyvňuje aj

zastúpenie aminokyselín, kedy je v proteínoch *Neocallimastigomycotina* vysoké zastúpenie aminokyselín kódovaných kodónmi s vysokým obsahom AT párov (K,I,N), a nízke zastúpenie aminokyselín s kodónmi s nízkym obsahom AT párov (A,G,R) (Wilken et al., 2020).

Zastúpenie kódujúcich génov je druhovo špecifické. Sekvenovaný genóm *Pecaromyces ruminantium* (predtým známe ako *Orpinomyces CIA*) s veľkosťou 100,95 Mbp, má 16 347 génov, čím patrí medzi najväčšie fungálne genómy. Daná veľkosť je však výrazne spôsobená vysokou mierou génových duplikácií, kedy 3 252 génových párov sú tvorené z 90% rovnakých sekvencií (Couger et al., 2015).

Pomocou komparatívnej genomiky boli v genóme anaeróbných húb opísané gény eukaryotického aj prokaryotického pôvodu. Takmer polovica génov rodu *Orpinomyces CIA* mala aspoň jeden ortológ v genóme podriše *dikarya*, 10% génov malo aspoň jeden ortológ u bazálnych fylogeneticky príbuzných druhov húb a skupiny *Opisthokonta*, a zvyšných 40% bolo unikátnych, nevyskytujúcich sa u žiadnej inej skupiny z ríše húb (Couger et al., 2015). Daných 40% zahŕňalo spomínané eukaryotické a prokaryotické ortológy. Eukaryotické ortológy kódujú gény bunecných procesov, ako sú proteíny viažuce nukleové kyseliny, cytoskeletálne proteíny, či receptory, zatiaľ čo prokaryotické ortológy kódujú gény súvisiace s metabolickými procesmi- hydrolázy, fosfatázy, transferázy. Pri sekvenovaní genómu *Orpinomyces CIA* boli ďalej objavené aj gény pre serpíny- skupina proteínov inhibujúcich serínové proteázy, ktoré doposiaľ neboli opísané u žiadnej skupiny húb (Couger et al., 2015).

Metabolizmus

Prispôbovaním sa na anaeróbné prostredie bachora si *Neocallimastigomycotina* vytvorili rôzne špecifiká odlišujúce ich od tradičných zástupcov ríše Fungi. Hlavnými špecifikami tejto skupiny húb je anaeróbný rozklad celulózy, tvorbou multienzýmových komplexov (na rozdiel od aeróbného rozkladu pomocou extracelulárne sekretovaných celuláz, či H_2O_2), ako aj zisk energie pomocou substrátovej fosforylácie prebiehajúcej v hydrogenozómoch, na rozdiel od mitochondriálnej oxidatívnej fosforylácie u aeróbných zástupcov húb.

Anaeróbná degradácia celulózy

Neocallimastigomycotina hrajú dôležitú rolu v rozklade lignocelulóзовých zvyškov rastlinnej bunkovej steny, ktorú degradujú v dvoch procesoch: po prvotnom osídlení stráveného materiálu rastom rhizoidov penetrujúcich bunecnú stenu (vzniknutých z kľúčickej zoospóry), a taktiež produkciou celulozómov (Cheng et al., 2018).

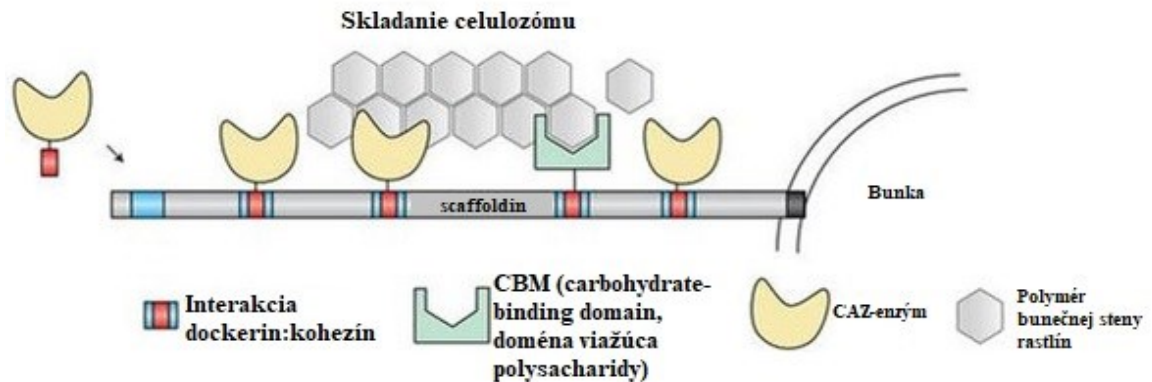
Celulozomy sú extracelulárne multienzymové komplexy, s molekulárnou hmotnosťou >3MDa, ktoré sú schopné štiepiť celulóзовé β -1,4-glykozidické väzby. Tvorené sú prevažne celulázami a hemicelulázami, ale vyskytujú sa tu aj xylázy, pektinázy a manázy (Ali et al., 1995; Fontes Gilbert, 2010; Solomon et al., 2016). Celulozóm je komplex typicky zložený z dvoch interagujúcich proteínov: „scaffoldin“ proteínov a CAZ-enzýmov. Scaffoldin je nekatalytický proteín extracelulárne viazaný na povrch buniek, obsahujúci niekoľko kohezínových domén. Slúži ako stavebná kostra celulozomu (Haitjema et al., 2014). Celulolytické enzýmy obsahujú vysoko konzervovanú „dockerin“ doménu, ktorá interaguje s kohezínovou doménou scaffoldin proteínu. Celulolytické enzýmy ďalej obsahujú CBM-carbohydrate binding module (doména zodpovedná za väzbu na polysacharidy), ktorá zabezpečuje väzbu substrátu=polysacharidu a enzýmu (Fontes Gilbert, 2010; Haitjema et al., 2014; Nagy et al., 2007). U anaeróbných húb sú zastúpené všetky druhy celuláz-endoglukanázy, exoglukanázy, β -glukozidázy (Gilmore et al., 2015). Proces rozkladu celulózy začína rozkladom celulózy na celobiózu (disacharid β -glukózy) pomocou exo- a endoceluláz, nasledovaný transmembránovým transportom celobiózy do cytoplazmy, kde prebieha rozklad celobiózy na monosacharidy (Cheng et al., 2018). Produktom hydrolytického rozkladu hemicelulózy sú pentózy xylóza a arabinóza (Hackstein et al., 2008). Anaeróbne huby sú taktiež schopné regulovať expresiu rôznych druhov CAZ-enzýmov na zefektívnenie rastu na odlišných substrátoch (Henske et al., 2018).

Od ich prvého pozorovania u baktérií v 80. rokoch minulého storočia boli celulozomy pozorované len u tejto skupiny húb. Prítomnosť celulozomov u *Neocallimastigomycotina* sa vysvetľuje pravdepodobným horizontálnym prenosom génov z bachorových baktérií, kedy pri sekvenovaní genómu *Orpinomyces CIA* bolo 69,2% génov pre glykozidhydrolázy najviac príbuzných bakteriálnym ortológom, a 39,5% génov bolo najpodobnejších bakteriálnym líniám najčastejšie sa vyskytujúcim v bachore, ako sú *Clostridiaceae*, *Eubacteriaceae*, a *Ruminococcaceae* (Youssef et al., 2013).

Aj napriek pravdepodobnému HGT sa však fungálne celulozomy od bakteriálnych líšia. Najväčší rozdiel predstavujú sekvencie kódujúce dockerin domény, ktoré sa výrazne odlišujú od tých bakteriálnych. Fungálne dockerin sekvencie sa ďalej líšia aj v počte ich kópií-vyskytujúce sa v jednej, dvoch alebo troch tandemových kópiách u *Piromyces sp.* oproti jedinej kópii u *Clostridium thermocellum* (Raghothama et al., 2001). Fungálne celulozomy patria k najúčinnjším komplexom pre rozklad a utilizáciu lignocelulózy a to najmä vďaka vysokej aktivite β -glukozidáz, ktoré degradujú celobiózu na glukózové podjednotky a tým znižujú

inhibičný efekt celobiózy, pozorovaný u bakteriálnych celulozómov (Steenbakkers et al., 2003).

Obrázok č.5: Grafické znázornenie skladania celulozómu



Scaffoldin proteín, tvoriaci stavebnú kostru pre CAZ- enzýmy (Carbohydrate-Active enZyme, celulázy), pripojený k bunečnej stene (Hackstein et al., 2008).

Hydrogenozómy

Hydrogenozóm je sférická organela vyskytujúca sa u niektorých anaeróbných jednobunkových eukaryotov. Objavená bola v roku 1973 Dr. Lindmarkom a Mullerom u fakultatívne anaeróbného druhu *Tritrichomonas foetus*. Názov dostala podľa schopnosti produkovať molekulový vodík pri degradácii pyruvátu/ malátu na acetát, za súčasnej tvorby ATP na substrátovej úrovni (Lindmark Muller, 1973; Marvin-Sikkema et al., 1994).

Za produkciu (a rozklad) H_2 je zodpovedný enzým hydrogenáza, katalyzujúca reakciu $H_2 \rightleftharpoons 2H^+ + 2 e^-$. Hydrogenázy patria ku metaloenzýmom a sú zložené z niekoľko podjednotiek. Opísaných bolo viac ako 100 druhov týchto enzýmov (Vignais et al., 2001). Vyskytujú sa prevažne u baktérií a archeí, ale opísané boli aj u niekoľkých druhov eukaryot, ako napr. u anaeróbných nálevníkov (Lewis et al., 2020). Hydrogenázy sú klasifikované podľa prvkov prítomných v aktívnom centre enzýmu. V súčasnosti existujú 3 skupiny: [Fe]- H_2 ázy, so železom, [NiFe]- H_2 ázy, so železom niklom a [FeFe]- H_2 ázy, ktoré v aktívnom centre majú 2 atómy železa (Lubitz Ogata, 2013). U anaeróbných húb (*Neocallimastix sp.L2*) bola dokázaná prítomnosť [Fe]- H_2 ázy v ich hydrogenozómoch (Vignais et al., 2001; Voncken et al., 2002).

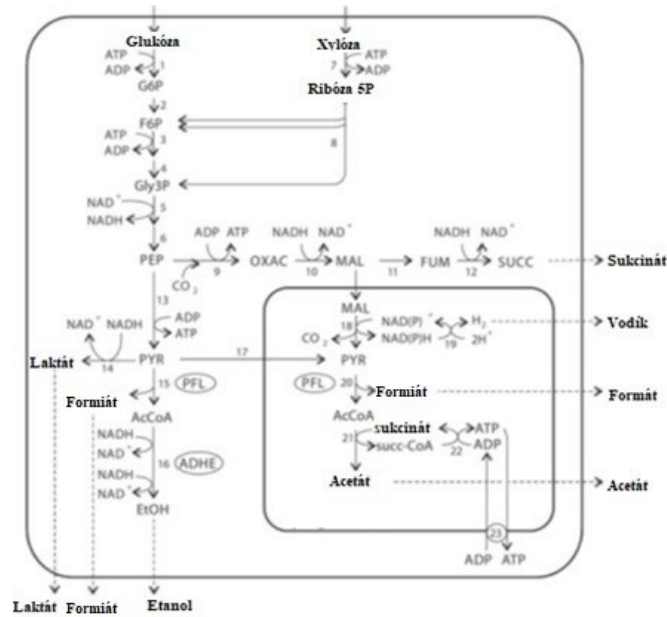
U anaeróbných húb sú hydrogenozómy prítomné v každom štádiu životného cyklu. V pohyblivom štádiu- zoospóry sú hydrogenozómy lokalizované v oblasti kinetozómu, zabezpečujúce prísun ATP nutného na pohyb bičíku (Marvin-Sikkema et al., 1992, 1994).

Anaeróbne huby hrali dôležitú úlohu v zisťovaní evolučného pôvodu hydrogenozómov. Evolúcia hydrogenozómov sa už od ich objavenia stala predmetom mnohých výskumov, s dvoma hlavnými protichodnými teóriami: monofyletický pôvod prispôbením mitochondrií a polyfyletický pôvod. O možnom polyfyletickom pôvode sa začalo uvažovať práve objavením hydrogenozómov u tejto skupiny húb, pri ktorej sa uvažoval vznik z mikroteliesok, či z peroxizómov (Biagini et al., 1997). Aj keď v minulosti prevládala teória o polyfyletickom vzniku, v súčasnosti najakceptovanejší pohľad na vznik hydrogenozómov je vznik zo spoločného predka s mitochondriou, a postupnou adaptáciou mitochondrií na anaeróbne podmienky (van der Giezen et al., 2005). Medzi objavy (u húb) podporujúce teóriu o monofyletickom vzniku patrí napríklad objavený monofyletický pôvod fungálnych hydrogenáz (Voncken et al., n.d., 2002), alkalické prostredie a prítomnosť ATP-áz a ATP/ADP translokáz v membráne hydrogenozómu (Marvin-Sikkema et al., 1994) a dvojvrstvová membrána hydrogenozómov (Van Der Giezen et al., 1997). Neprítomnosť mitochondriálneho genómu by sa dala vysvetliť postupnou stratou respiračných komplexov, ktoré sú kódované v genóme mitochondrií.

Metabolické dráhy

Medziproduktom celulolytického štiepenia rastlinnej bunkovej steny pomocou celulozómov sú monosacharidy glukóza, xylóza a arabinóza, ktoré následne vstupujú do glykolýzy a fermentatívneho metabolizmu pyruvátu pozorovaného u prokaryot, vid' obrázok č.5.

Obr.č.5: Metabolizmus anaeróbnych húb



Obrázok znázorňuje metabolické dráhy vedúce ku najviac zastúpeným konečným produktom. Čísla označujú zúčastňujúce sa enzýmy: (1) hexokináza, (2) glukóza-6-fosfát izomeráza, (3) fosfofruktokináza, (4) aldóza a trióza-fosfát-izomeráza. (5) glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza, (6) fosfoglycerát kináza, (7) oxidatívna fáza pentózafosfátovej dráhy, (8) neoxidatívna fáza pentózafosfátovej dráhy, (9) fosfoenolpyruvát karboxykináza, (10) malát dehydrogenáza, (11) fumaráza, (12) fumarát reduktáza, (13) pyruvát kináza, (14) laktát dehydrogenáza, (15) cytozolická pyruvát:formiát lyáza, (16) alkoholdehydrogenáza E, (17) pyruvátový import do hydrogenozómov, (18) malát dehydrogenáza, (19) hydrogenáza, (20) hydrogenozomálna pyruvát:formiát lyáza, (21) acetát:sukcinát CoA-transferáza, (22) sukcinyl-CoA syntetáza, (23) ADP/ATP antiport. Použité skratky: AcCoa- acetyl-CoA, EtOH- etanol, FUM- fumarát, G3P- glyceraldehyd-3-fosfát, MAL- malát, OXAC- oxalacetát, PEP- fosfoenolpyruvát, PYR- pyruvát, SUCC- sukcinát (Hackstein et al., 2008).

Majoritne zastúpenými konečnými produktami fermentácie sú CO₂, H₂, formiát, acetát, etanol a laktát u „foregut“ fermentátorov. Metabolické dráhy sú lokalizované v cytozole buniek a v hydrogenozómoch. V cytozole je lokalizovaná glykolýza, tvorba laktátu a etanolu. V hydrogenozómoch je lokalizovaná premena pyruvátu/malátu na CO₂, H₂ a acetát. U „hindgut“ fermentátorov nebola pozorovaná prítomnosť konečného produktu laktátu, ktorá môže byť spôsobená neprítomnosťou enzýmu laktát dehydrogenáza, ktorý katalyzuje premenu pyruvátu na laktát. U oboch druhov fermentátorov boli zaznamenané aj minoritné množstvá malátu, fumarátu a sukcinátu (Jullian et al., 1998).

Odlišnosti metabolizmu *Neocallimastigomycotina*

Fungálne hydrogenozómy sa odlišujú od prvotne skúmaných hydrogenozómov parazitických bičíkocov v dráhach pyruvátového katabolizmu. *Trichomonas vaginalis* a *Tritrichomonas foetus* využívajú v procese dekarboxylácie pyruvátu na acetyl-CoA enzým

pyruvát:ferredoxin oxidoreduktázu (PFO), zatiaľ čo u druhov *Neocallimastix* a *Piromyces* bola dokázaná prítomnosť enzýmu pyruvát:formiát lyázy (PFL). PFL je kódovaná multigénovými rodinami (Akhmanova et al., 1999). PFL sa vyskytuje ako v cytozolickej, tak aj v hydrogenozómoch lokalizovanej časti metabolizmu polysacharidov. Prítomnosť PFL bola dokázaná pomocou stechiometrie reakcie: známy molárny pomer reakcie=1→ dokázaná produkcia 1 molekuly fumarátu na 1 molekulu vytvoreného acetátu/etanolu. Pri degradácii pyruvátu pomocou PFO je produkovaná 1 molekula H₂ na každú vytvorenú molekulu acetyl-CoA (z ktorej ďalej vznikali produkty acetát a etanol)- experimentálne boli dokázané výrazne nižšie hodnoty H₂ vzhľadom na množstvo produktov, a teda prítomnosť PFO u *Piromyces* bola vylúčená (Boxma et al., 2004). Jednou z vysvetlení prítomnosti PFL je pravdepodobne adaptácia na vysokú koncentráciu CO₂ v bachore, získaná buď ako eukaryotický pozostatok, alebo HGT (Boxma et al., 2004).

Presný proces metabolickej tvorby H₂ u anaeróbných húb avšak nie je známy. Okrem PFL bola totiž v osekvenovaných genómoch a v transkriptómoch dokázaná aj prítomnosť PFO, typicky vyskytujúca sa v hydrogenozómoch organizmov iných ako huby. Najnovšie modely teda počítajú s prítomnosťou a podieľaním sa oboch enzýmov na tvorbe ATP. Predpokladá sa, že za väčšinu metabolickej premeny na konečné produkty je zodpovedná PFL, zatiaľ čo za samotnú tvorbu H₂ je zodpovedná PFO. Aj keď sú prítomné obidva enzýmy, PFO je exprimovaná v niekoľkonásobne menšej miere (Leggieri et al., 2021; Wilken et al., 2021)

Prítomnosťou PFL je podmienený špecifický metabolický proces u *Neocallimastigomycotina* a to spôsob produkcie etanolu, ktorý prebieha súčinnosťou PFL a alkohol dehydrogenázy E (ADHE) zabezpečujúcej cytozolicú premenu acetyl-CoA na etanol. Tento mechanizmus tvorby etanolu bol doteraz pozorovaný len u eubaktérií a niekoľkých anaeróbných eukaryotov, ktoré ale nedisponujú PFL, mitochondriami či hydrogenozómami, a ani u nich neprebieha prokaryotický typ fermentatívneho metabolizmu (Boxma et al., 2004).

Ďalšou odlišnosťou pozorovateľnou u *Neocallimastigomycotina* je spôsob premeny xylózy na intermediát glykolýzy, a to pomocou xylóza izomerázy a D-xylulokinázy, čo je totožné s dráhou využívanou baktériami. Dochádza tu k premene xylózy na xylulózo-5-fosfát, ktorý následne vstupuje do pentózafosfátovej dráhy s konečnými produktami glyceraldehyd-3-fosfátom a fruktóza-6-fosfátom, medziproduktami glykolýzy (Hackstein et al., 2008; Harhangi et al., 2003). U ostatných druhov húb je využívaná alternatívna dráha zahrňujúca premenu xylózy na xylulózu pomocou reductáz.

Profil fermentačných produktov anaeróbných húb nebýva konštantný. Pozorované boli zmeny zastúpenia konečných produktov metabolizmu, pri meniacich sa množstvách fruktózy

v substráte. Zvyšovanie obsahu fruktózy z 0,1 na 0,5% viedlo k zvýšeným množstvám laktátu, etanolu, formiátu, acetátu a sukcinátu, teda zvýšená bola cytozolická degradačná dráha pyruvátu, čo dala za vznik otázkam ohľadom dôležitosti dehydrogenáz v tomto metabolizme (Boxma et al., 2004).

Molekulárne adaptácie na syntrofické vzťahy s prokaryotmi

Fermentatívny metabolizmus *Neocallimastigomycotina* je taktiež ovplyvnený prítomnosťou metanogénnych archea, kedy v ich prítomnosti dochádza k metabolizmu celulózy vo zvýšenej miere. Pri kokultivácií *Neocallimastix sp. LP2* a *Selenomonas ruminantium JW13* a 2 (bachorový bakteriálny metanotrof) došlo k spotrebe 500 a 560 μM hexózy za hodinu, pričom v čistej kultúre *Neocallimastix* bola pozorovaná spotreba len 350 μM hexózy/h (Marvin-Sikkema et al., 1990).

Metanogény sú schopné ovplyvňovať metabolizmus *Neocallimastigomycotina* pomocou ovplyvňovania ich génovej expresie. Pri kultivácií *Anaeromyces robustus* s metanogénom došlo u 5% génov k odlišnej regulácii transkripcie- u 105 génov kódujúcich CAZ-enzýmy (z čoho 75% asociovalo s dockerin doménami, alebo CBM) došlo k up-regulácií, zatiaľ čo u 29 génov došlo k down-regulácií (Swift et al., 2019). Taktiež došlo k up-regulácií GPCRs (*G protein coupled receptors*), o ktorých sa uvažuje, že hrajú úlohu v signalizácii prítomnosti cukrov a tým urýchľujú kolonizáciu tráveniny (Swift et al., 2019).

Prítomnosť metanogénov v kultúre ďalej ovplyvňuje aj zastúpenie fermentačných produktov. Na rozdiel od čistej kultúry (s fermentačnými produktmi H_2 , CO_2 , formiát, acetát, sukcinát, etanol, laktát) došlo v kokultúrach s metanogénmi k tvorbe CH_4 , CO_2 , formiátu a acetátu. Namerané množstvo acetátu bolo výrazne zvýšené oproti čistým kultúram: u *Neocallimastix sp. L2* 5,50 vs. 15,50 mol/ 10 mol fermentovanej celulózy, u *Piromonas communis* 7,17 vs. 15,37 mol/ 10 mol fermentovanej celulózy (Marvin-Sikkema et al., 1990). Javí sa, že prítomnosť metanogénov posúva metabolizmus od laktátovej dráhy, v prospech malátovej dráhy (Li et al., 2016).

Pozorovateľné metabolické zmeny pri kokultivácií s metanogénmi sa pripisujú medzidruhovému prenosu H_2 , keďže akumulácia metabolických produktov ako H_2 a formiát vedie k spomaleniu metabolizmu anaeróbných húb. Aktívne odoberanie H_2 napr. metanogénmi je obojstranne výhodné (Ma et al., 2022; Marvin-Sikkema et al., 1990).

Sekundárne metabolity

Pri analýze genómu 4 odlišných kmeňov anaeróbných húb bolo objavených až 146 génov kódujúcich enzýmy vedúce k syntéze rozličných sekundárnych metabolitov. Takéto zastúpenie je niekoľkokrát relatívne vyššie ako u iných bazálnych húb- *Chytridiomycota*. Medzi pozorované gény patria enzýmy polyketid syntázy (PKS- *polyketide synthases*), neribozomálnych peptidov (NRPS- *nonribosomal peptide synthases*), či typicky baktériami produkované bakteriocíny, či antimikrobiálne peptidy (AMPs- *antimicrobial peptides*). Sekvencie bakteriocínov mali 31,6 % podobnosť s bakteriocínmi baktérií, čo len potvrdzuje teóriu horizontálneho prenosu génov v bachorovom mikrobióme. (Swift et al., n.d., 2021).

Biotechnologické využitie

V súčasnosti sú skúmané rôzne možné biotechnologické aplikácie *Neocallimastigomycotina*, a to vo viacerých oblastiach- ako rezervoár doposiaľ neobjavených produktov a enzýmov (Swift et al., n.d. 2021), v oblasti poľnohospodárstva a možného využitia v zefektívnenia kŕmenia hospodárskych zvierat, či v produkcií biometánu a bioplynu. (Dollhofer, et al., 2020)

Produkcia bioplynu a biometánu

Zbytky domácich potravín, obilnín, hnoj, či zbytky drevárskeho priemyslu predstavujú obrovský dostupný zdroj lignocelulolytických materiálov a teda obnoviteľných zdrojov pre výrobu bioplynu, ktorý následne môže byť využitý na tvorbu energie, tepla a ako pohonná látka (Čater et al., 2014).

Biologický proces produkcie bioplynu zahŕňa 4 kroky, všetky prebiehajúce v anaeróbnom prostredí: hydrolýzu organických biopolymérov, baktériami sprostredkovanú acidogénu a acetogénu, a metanogénu pomocou archeí (Čater et al., 2014). Schopnosť anaeróbných húb rozkladať lignocelulolytické zvyšky s vyššou efektívnosťou ako baktérie, ako aj ich existujúce obojstranne prospešné vzťahy s metanogénmi môžu nájsť biotechnologické uplatnenie v prvom kroku- hydrolýze, ktorá dosahuje len 60% z hodnoty teoretického výťažku (Čater et al., 2014; Vinzelj et al., 2020). Pri experimentoch, ktoré v procese tvorby bioplynu využívali anaeróbne huby je pozorovaný pozitívny efekt na množstvo a kvalitu vyrobeného bioplynu. Podľa typu substrátu a podľa použitého druhu, množstvo vyprodukovaného bioplynu bolo zvýšené o 4-22% (Procházka et al., 2012).

Problémom pri implementovaní anaeróbných húb do kultúry produkujúcej bioplyn je ich krátke prežívanie v danej kultúre, kedy efekt anaeróbných húb na hydrolýzu začal klesať už po 10. dňoch. Je nutný výskum optimálnych podmienok na dlhodobé udržanie hubových populácií (Dollhofer et al., 2015; Procházka et al., 2012).

Efektívnejšie kŕmenie

Krmivá používane pri chove hospodárskych zvierat majú často veľmi nízke nutričné hodnoty, s vysokým zastúpením ťažko rozložiteľnej vlákniny, ako sú napríklad trávy, slamy, zvyšky obilnín a agro-industriálne zvyšky (Król et al., 2022; Nagpal et al., 2009). So stále narastajúcimi reguláciami a problémami s metódami využívajúcimi antibiotiká a rastové hormóny, došlo k zvýšeniu záujmu o metódy DFM- *direct-fed microbials*- ktorých princípom je priamo pridávať mikrobiálne kultúry do potravy dobytká, ktorých implementovanie by pozitívne ovplyvnilo množstvo produkovaného mlieka, hmotnosť a využitie (konverziu) krmiva (Dey et al., 2004; Lee et al., n.d., 2000).

Prvý výskum využívajúci kultúry anaeróbných húb prebiehal v roku 1999, a porovnával 3 skupiny oviec. Prvej skupine bolo do bachora pridané médium pre rast hubovej kultúry, druhej skupine supernatant z inkubovanej kultúry (enzýmy, bez živých buniek), tretej živá hubová kultúra. Po pridaní kultúry anaeróbných húb došlo k zdvojnásobeniu množstva anaeróbných húb v bachore, a taktiež k zvýšeniu počtov celkových a celulolytických baktérií. Celkovo bola pozorovaná zvýšená tráviaca schopnosť oviec, zlepšenie fermentačných podmienok a zvýšenie počtov populácií bachorového mikrobiómu (Lee et al., n.d., 2000).

Efekt pridávania fungálnych spoločenstiev bol následne skúmaný aj u ostatných druhov hospodárskych zvierat. U teliat boli pozorované vyššie prírastky hmotnosti za deň, napriek nameranému nižšiemu priemernému dennému príjmu potravy, a to až o 15,37%, čo môže naznačovať efektívnejšie spracovanie potravy u teliat inokulovaných hubovými spoločenstvami (Dey et al., 2004). Inokulácia anaeróbnym druhom *Piromyces*, izolovaného z fekálií divokej antilopy nilgau, zvýšila efektívnosť trávenia potravy u byvolov. Po inokulácii došlo k 2,5x zvýšeniu celulolytických, 2,9x zvýšeniu hemicelulolytických a 2,5x zvýšeniu celkových počtov baktérií a k 4,4x násobnému zvýšeniu množstva hubového spoločenstva. So zvýšenou početnosťou bachorových mikroorganizmov došlo aj k navýšeniu enzýmovej aktivity xylanáz, celuláz, esteráz a proteáz (Paul et al., 2004).

Mnohé výskumy dokázali pozitívny vplyv anaeróbných húb na gastrointestinálne zdravie hospodárskych zvierat, zvýšenú produkciu mlieka a zvyšovanie hmotnosti. Vďaka

svojej schopnosti rozkladať pevné rastlinné zvyšky prispievajú k efektívnejšiemu tráveniu menej kvalitných krmív, vylepšujú mieru bachorovej fermentácie a potencionálne znižujú riziko metabolických chorôb, ako napr. acidóza. Tým sú vhodným adeptom na využívanie v DFM metódach, ako prídavok k potrave bylinožravých hospodárskych zvierat. Problémom však ostáva zabezpečenie ich masovej produkcie (Król et al., 2022).

Pridanie kultúr anaeróbnych húb avšak spôsobilo aj zvýšenie celkového vyprodukovaného metánu (Paul et al., 2010). Metán predstavuje jeden z hlavných skleníkových plynov, vznikajúci okrem iného aj činnosťou metanogénov v bachore bylinožravcov. Stále stúpajúce emisie metánu sú pripisované práve hospodárskemu dobytku, tvoriacemu 9% celkových antropogénnych emisií metánu (Gill et al., 2010; La et al., 2018).

Záver

Táto práca zhrňuje doposiaľ zistené poznatky o *Neocallimastigomycotina*, bazálnej skupiny húb, vyskytujúcej sa v anaeróbnom prostredí bachora. V symbiotickej interakcii s hostiteľom, ktorým sú hlavne prežúvavce, pomáhajú rozkladať β -1,4-glykozidickú väzbu celulóзовých mikrofibríl a tým pomáhajú rozkladať prijatú rastlinnú potravu. Rozklad rastlinnej bunecnej steny prebieha s pomocou multienzymových komplexov - celulozómov, ktoré pravdepodobne získali horizontálnym prenosom génov z bakteriálnych bachorových symbiontov.

Anaeróbne huby *Neocallimastigomycotina* tvoria vedecky veľmi zaujímavú skupinu, búrajúcu mnohé predpoklady o ríši húb. Je to jediná skupina húb žijúca v anaeróbnom prostredí, tvoriaca celulozomy či obsahujúca anaeróbnú formu mitochondrií- hydrogenozomy. Ich ďalší výskum by mohol priniesť mnoho poznatkov týkajúcich sa pôvodu a evolúcie tejto skupiny, evolúcie a metabolizmu hydrogenozómov, či porozumenia symbiotickým interakciám v bachore. Ďalší výskum by mohol viesť k výraznejšiemu praktickému využitiu týchto húb v oblasti biotechnológie a poľnohospodárstve, napríklad zvýšením efektivity výživy dobytká, či v produkcii bioplynu.

Referencie

1. Akkada, A. R., Bartley, E. E., Berube, R., Fina, L. R., Meyer, R. M., Henricks, D., Julius, F. 1968. Simple method to remove completely ciliate protozoa of adult ruminants. *Applied Microbiology*, 16:1475-1477.
2. Akhmanova, A., Voncken, F. G. J., Hosea, K. M., Harhangi, H., Keltjens, J. T., Op den Camp, H. J. M., Vogels, G. D., Hackstein, J. H. P. 1999. A hydrogenosome with pyruvate formate-lyase: Anaerobic chytrid fungi use an alternative route for pyruvate catabolism. *Molecular Microbiology*, 32:1103-1114.
3. Ali, B. R. S., Zhou, L., Graves, F. M., Freedman, R. B., Black, G. W., Gilbert, H. J., Hazlewood, G. P. 1995. Cellulases and hemicellulases of the anaerobic fungus *Piromyces* constitute a multiprotein cellulose-binding complex and are encoded by multigene families. *FEMS Microbiology Letters*, 125:15-22.
4. Bauchop, T., Mountfort, D. O. 1981. Cellulose fermentation by a rumen anaerobic fungus in both the absence and the presence of rumen methanogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 42:1103-1110.
5. Benchimol, M., de Souza, W. 2019. Structure of the hydrogenosome. ed. Tachezy J., *In Hydrogenosomes and Mitosomes: Mitochondria of Anaerobic Eukaryotes*, Springer, Cham, pp.85-110.
6. Biagini, G. A., Finlay, B. J., Lloyd, D. O. 1997. Evolution of the hydrogenosome. *FEMS Microbiology Letters*, 155:133-140.
7. Boxma, B., Voncken, Frank, Jannink, Sander, van Alen, T., Akhmanova, A., van Weelden, S. W. H., van Hellemond, J. J., Ricard, G., Huynen, M., Tielens, A. G. M., Hackstein, J. H. P. 2004. The anaerobic chytridiomycete fungus *Piromyces sp. E2* produces ethanol via pyruvate:formate lyase and an alcohol dehydrogenase E. *Molecular Microbiology*, 51:1389-1399.
8. Bullerwell, C. E., Lang, B. F. 2005. Fungal evolution: The case of the vanishing mitochondrion. *Current Opinion in Microbiology*, 8:362-369.
9. Callaghan, T. M., Podmirseg, S. M., Hohlweck, D., Edwards, J. E., Puniya, A. K., Dagar, S. S., Griffith, G. W. 2015. *Buwchfawromyces eastonii* gen. nov., sp. nov.: A new anaerobic fungus (*Neocallimastigomycota*) isolated from buffalo faeces. *MycologyKeys*, 9:11-28.
10. Castillo-González, A. R., Burrola-Barraza, M. E., Domínguez-Viveros, J., Chávez-Martínez, A. 2014. Rumen microorganisms and fermentation. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 46:349-361.
11. Couger, M. B., Youssef, N. H., Struchtemeyer, C. G., Liggenstoffer, A. S., Elshahed, M. S. 2015. Transcriptomic analysis of lignocellulosic biomass degradation by the anaerobic fungal isolate *Orpinomyces sp. strain CIA*. *Biotechnology for Biofuels*, 8, 208. DOI 10.1186/s13068-015-0390-0
12. Čater, M., Zorec, M., Marinšek Logar, R. 2014. Methods for improving anaerobic lignocellulosic substrates degradation for enhanced biogas production. *Springer Science Reviews*, 2:51-61.
13. Dagar, S. S., Kumar, S., Griffith, G. W., Edwards, J. E., Callaghan, T. M., Singh, R., Nagpal, A. K., Puniya, A. K. 2015. A new anaerobic fungus (*Oontomyces anksri* gen.

- nov., sp. nov.) from the digestive tract of the Indian camel (*Camelus dromedarius*). *Fungal Biology*, 119:731-737.
14. Davies, D. R., Theodorou, M. K., Lawrence, M. I. G., Trinci, A. P. J. 1993. Distribution of anaerobic fungi in the digestive tract of cattle and their survival in faeces. *Journal of General Microbiology*, 139:1395-1400.
 15. Dehority, B. A. 2002. Gastrointestinal tracts of herbivores, particularly the ruminant: Anatomy, physiology and microbial digestion of plants. *Journal of Applied Animal Research*, 21:145-160.
 16. Dey, A., Paul Sehgal, J., Kumar Puniya, A., Singh, K., Author, C. 2004. Influence of an anaerobic fungal culture (*Orpinomyces sp.*) administration on growth rate, ruminal fermentation and nutrient digestion in calves. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 17: 820-824.
 17. Dollhofer, V., Podmirseg, S. M., Callaghan, T. M., Griffith, G. W., Fliegerová, K. 2015. Anaerobic fungi and their potential for biogas production. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 151:41-61.
 18. Dollhofer, V., Young, D., Seppälä, S., Hooker, C., Youssef, N., Nagler, M., Reilly, M., Li, Y., Fliegerova, K., Cheng, Y., Griffith, G. W., Elshahed, M., Solomon, K. V., O'Malley, M. A., Theodorou, M. K. 2020. The biotechnological potential of anaerobic gut fungi. eds. Benz J.P., Schipper K. Springer *In Genetics and Biotechnology*, International Publishing, pp. 413-437.
 19. Edwards, J. E., Kingston-Smith, A. H., Jimenez, H. R., Huws, S. A., Skøt, K. P., Griffith, G. W., McEwan, N. R., Theodorou, M. K. 2008. Dynamics of initial colonization of nonconserved perennial ryegrass by anaerobic fungi in the bovine rumen. *FEMS Microbiology Ecology*, 66:537-545.
 20. Edwards, J. E., Forster, R. J., Callaghan, T. M., Dollhofer, V., Dagar, S. S., Cheng, Y., Chang, J., Kittelmann, S., Fliegerova, K., Puniya, A. K., Henske, J. K., Gilmore, S. P., O'Malley, M. A., Griffith, G. W., Smidt, H. 2017. PCR and omics based techniques to study the diversity, ecology and biology of anaerobic fungi: Insights, challenges and opportunities. *Frontiers in Microbiology*, 8, 657. DOI 10.3389/fmicb.2017.01657
 21. Edwards, J. E., Hermes, G. D. A., Kittelmann, S., Nijse, B., Smidt, H. 2019. Assessment of the accuracy of high-throughput sequencing of the ITS1 region of *Neocallimastigomycota* for community composition analysis. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2370. DOI 10.3389/fmicb.2019.02370
 22. Finlay, B. J., Esteban, G., Clarke, K. J., Williams, A. G., Embley, T. M., Hirt, R. P. 1994. Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. *FEMS Microbiology Letters*, 117:157-161.
 23. Fontes, C. M. G. A., Gilbert, H. J. 2010. Cellulosomes: Highly efficient nanomachines designed to deconstruct plant cell wall complex carbohydrates. *Annual Review of Biochemistry*, 79:655-681.
 24. Gill, M., Smith, P., Wilkinson, J. M. 2010. Mitigating climate change: The role of domestic livestock. *Animal*, 4:323-333.
 25. Gilmore, S. P., Henske, J. K., O'Malley, M. A. 2015. Driving biomass breakdown through engineered cellulosomes. *Bioengineered*, 6:204-208.

26. Gordon, G. L. R., Phillips, M. W. 1998. The role of anaerobic gut fungi in ruminants. *Nutrition Research Reviews*, 11:133-168.
27. Gruninger, R. J., Puniya, A. K., Callaghan, T. M., Edwards, J. E., Youssef, N., Dagar, S. S., Fliegerova, K., Griffith, G. W., Forster, R., Tsang, A., Mcallister, T., Elshahed, M. S. 2014. Anaerobic fungi (phylum *Neocallimastigomycota*): Advances in understanding their taxonomy, life cycle, ecology, role and biotechnological potential. *FEMS Microbiology Ecology*, 90:1-17.
28. Hackstein, J. H. P., Baker, S. E., van Hellemond, J. J., Tielens, A. G. M. 2008. Hydrogenosomes of anaerobic Chytrids: An alternative way to adapt to anaerobic environments. ed. Tachezy J., *In Hydrogenosomes and Mitosomes: Mitochondria of Anaerobic Eukaryotes*, Springer, Cham, pp.159-175.
29. Haitjema, C. H., Solomon, K. V., Henske, J. K., Theodorou, M. K., O'malley, M. A. 2014. Anaerobic Gut Fungi: Advances in isolation, culture, and cellulolytic enzyme discovery for biofuel production. *Biotechnology and bioengineering*, 111:1471-1482.
30. Haitjema, C. H., Gilmore, S. P., Henske, J. K., Solomon, K. V., de Groot, R., Kuo, A., Mondo, S. J., Salamov, A. A., LaButti, K., Zhao, Z., Chiniquy, J., Barry, K., Brewer, H. M., Purvine, S. O., Wright, A. T., Hainaut, M., Boxma, B., van Alen, T., Hackstein, J. H. P., Henrissat, B., Baker, S. E., Grigoriev, I. V., O'Malley, M. A. 2017. A parts list for fungal cellulosomes revealed by comparative genomics. *Nature Microbiology*, 2, 17087. DOI 10.1038/nmicrobiol.2017.87
31. Hanafy, R. A., Elshahed, M. S., Liggenstoffer, A. S., Griffith, G. W., Youssef, N. H. 2017. *Pecoramyces ruminantium*, gen. nov., sp. nov., an anaerobic gut fungus from the feces of cattle and sheep. *Mycologia*, 109:231-243.
32. Harhangi, H. R., Akhmanova, A. S., Emmens, R., van der Drift, C., de Laat, W. T. A. M., van Dijken, J. P., Jetten, M. S. M., Pronk, J. T., Op den Camp, H. J. M. 2003. Xylose metabolism in the anaerobic fungus *Piromyces sp. strain E2* follows the bacterial pathway. *Archives of Microbiology*, 180:134-141.
33. Henderson, G., Cox, F., Ganesh, S., Jonker, A., Young, W., Janssen, P. H., Abecia, L., Angarita, E., Aravena, P., Arenas, G. N., Ariza, C., Attwood, G. T., Avila, J. M., Avila-Stagno, J., Bannink, A., Barahona, R., Batistotti, M., Bertelsen, M. F., Brown-Kav, A., ... Zunino, P. 2015. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Scientific Reports*, 9, 14567. DOI 10.1128/AEM.00199-20
34. Henske, J. K., Wilken, S. E., Solomon, K. V., Smallwood, C. R., Shutthanandan, V., Evans, J. E., Theodorou, M. K., O'Malley, M. A. 2018. Metabolic characterization of anaerobic fungi provides a path forward for bioprocessing of crude lignocellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, 115:874-884.
35. Hess, M., Paul, S. S., Puniya, A. K., van der Giezen, M., Shaw, C., Edwards, J. E., Fliegerova, K. O. 2020. Anaerobic fungi: past, present and future. *Frontiers in Microbiology*, 11, 584893. DOI 10.3389/fmicb.2020.584893

36. Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lücking, R., Thorsten Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P. B., McLaughlin, D. J., Powell, M. J., Redhead, S., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., Stalpers, J. A., ... Zhang, N. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycological Research*, 111:509-547.
37. Cheng, Y. F., Edwards, J. E., Allison, G. G., Zhu, W. Y., Theodorou, M. K. 2009. Diversity and activity of enriched ruminal cultures of anaerobic fungi and methanogens grown together on lignocellulose in consecutive batch culture. *Bioresource Technology*, 100:4821-4828.
38. Cheng, Y., Shi, Q., Sun, R., Liang, D., Li, Y., Li, Y., Jin, W., Zhu, W. 2018. The biotechnological potential of anaerobic fungi on fiber degradation and methane production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34, 155. DOI 10.1007/s11274-018-2539-z
39. Jayasekara, S., Ratnayake, R. 2019. Microbial Cellulases: An Overview and Applications. eds. Pascual, A. J., Martin, M. E. E., *In Cellulose*, IntechOpen, Londýn, 293, pp. 15-22.
40. Joblin, K. N., Naylor, G. E., Williams², A. G., Richardson, J., Stewart, C. S., Campbell, G. P., Wilson, A. B. 1990. Effect of *Methanobrevibacter smithii* on xylanolytic activity of anaerobic ruminal fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 56:2287-2295.
41. Jullian, V., Riondet, C., de Vaux, A., Alcaraz, G., Fonty, G. 1998. Comparison of metabolic activities between *Piromyces citronii*, an equine fungal species, and *Piromyces communis*, a ruminal species. *Animal Feed Science Technology*, 70:161-168.
42. Koetschan, C., Kittelmann, S., Lu, J., Al-Halbouni, D., Jarvis, G. N., Müller, T., Wolf, M., Janssen, P. H. 2014. Internal transcribed spacer 1 secondary structure analysis reveals a common core throughout the anaerobic fungi (*Neocallimastigomycota*). *PLoS ONE*, 9, 91928. DOI 10.1371/journal.pone.0091928
43. Król, B., Słupczyńska, M., Wilk, M., Asghar, M., Cwynar, P. 2023. Anaerobic rumen fungi and fungal direct-fed microbials in ruminant feeding. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 32:3-16.
44. La, H., Hettiaratchi, J. P. A., Achari, G., Dunfield, P. F. 2018. Biofiltration of methane. *Bioresource Technology*, 268:759–772.
45. Lankiewicz, T. S., Choudhary, H., Gao, Y., Amer, B., Lillington, S. P., Leggieri, P. A., Brown, J. L., Swift, C. L., Lipzen, A., Na, H., Amirebrahimi, M., Theodorou, M. K., Baidoo, E. E. K., Barry, K., Grigoriev, I. v., Timokhin, V. I., Gladden, J., Singh, S., Mortimer, J. C., ... O'Malley, M. A. 2023. Lignin deconstruction by anaerobic fungi. *Nature Microbiology*, 8:596-610.
46. Laporte-Urbe, J. A. 2019. Rumen CO species equilibrium might influence performance and be a factor in the pathogenesis of subacute ruminal acidosis. *Translational Animal Science*, 3:1081-1098.
47. Lee, S. S., Ha, J. K., Cheng, K.J. 2000. Influence of an anaerobic fungal culture administration on in vivo ruminal fermentation and nutrient digestion. *Animal Feed Science and Technology*, 88:201-217.

48. Leggieri, P. A., Kerdman-Andrade, C., Lankiewicz, T. S., Valentine, M. T., O'Malley, M. A. 2021. Non-destructive quantification of anaerobic gut fungi and methanogens in co-culture reveals increased fungal growth rate and changes in metabolic flux relative to mono-culture. *Microbial Cell Factories*, 20, 199. DOI 10.1186/s12934-021-01684-2
49. Lewis, W. H., Lind, A. E., Sendra, K. M., Onsbring, H., Williams, T. A., Esteban, G. F., Hirt, R. P., Ettema, T. J. G., Embley, T. M. 2020. Convergent evolution of hydrogenosomes from mitochondria by gene transfer and loss. *Molecular Biology and Evolution*, 37:524-539.
50. Li, J., Heath, I. B., Packer, L. 1993. The phylogenetic relationships of the anaerobic chytridiomycetous gut fungi (*Neocallimasticaceae*) and the *Chytridiomycota*. II. Cladistic analysis of structural data and description of *Neocallimasticales* ord.nov. *Canadian Journal of Botany*, 71:393-407.
51. Li, Y., Jin, W., Cheng, Y., Zhu, W. 2016. Effect of the associated methanogen *Methanobrevibacter thaueri* on the dynamic profile of end and intermediate metabolites of anaerobic fungus *Piromyces* sp. *Fl*. *Current Microbiology*, 73:434-441.
52. Liggenstoffer, A. S., Youssef, N. H., Couger, M. B., Elshahed, M. S. 2010. Phylogenetic diversity and community structure of anaerobic gut fungi (phylum *Neocallimastigomycota*) in ruminant and non-ruminant herbivores. *ISME Journal*, 4:1225-1235.
53. Lindmark, D. G., Müller, M. 1973. Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 248:7724-7728.
54. Lubitz, W., Ogata, H. 2013. Hydrogenases, structure and function. eds. Lennarz W. J., Lane, M. D., *In Encyclopedia of Biological Chemistry*, Academic press, Cambridge, pp. 562-567.
55. Ma, J., Zhong, P., Li, Y., Sun, Z., Sun, X., Aung, M., Hao, L., Cheng, Y., Zhu, W. 2022. Hydrogenosome, pairing anaerobic fungi and H₂-utilizing microorganisms based on metabolic ties to facilitate biomass utilization. *Journal of Fungi*, 8, 338. DOI 10.3390/jof8040338
56. Mar, K. A., Unger, C., Walderdorff, L., Butler, T. 2022. Beyond CO₂ equivalence: The impacts of methane on climate, ecosystems, and health. *Environmental Science and Policy*, 134:127-136.
57. Marvin-Sikkema, F. D., Richardson, A. J., Stewart, C. S., Gottschal, J. C., Prins, R. A., Bryant, M. P. 1990. Influence of hydrogen-consuming bacteria on cellulose degradation by anaerobic fungi organisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 56:3793-3797.
58. Marvin-Sikkema, F. D., Lahpor, G. A., Kraak, M. N., Gottschal, J. C., Prins, R. A. 1992. Characterization of an anaerobic fungus from llama faeces. *Journal of General Microbiology*, 138:2235-2241.
59. Marvin-Sikkema, F. D., Kraak, M. N., Veenhuis, M., Gottschal, J. C., Prins, R. A. 1993. The hydrogenosomal enzyme hydrogenase from the anaerobic fungus *Neocallimastix* sp. *L2* is recognized by antibodies, directed against the C-terminal microbody protein targeting signal SKL. *European journal of cell biology*, 61:86-91.
60. Marvin-Sikkema, F. D., Driessen, A. J. M., Gottschal, J. C., Prins, R. A. 1994. Metabolic energy generation in hydrogenosomes of the anaerobic fungus

- Neocallimastix*: evidence for a functional relationship with mitochondria. *Mycological Research*, 98:205-212.
61. Matthews, C., Crispie, F., Lewis, E., Reid, M., O'Toole, P. W., Cotter, P. D. 2019. The rumen microbiome: a crucial consideration when optimising milk and meat production and nitrogen utilisation efficiency. *Gut Microbes*, 10:115-132.
 62. McGranaghan, P., Davies, J. C., Griffith, G. W., Davies, D. R., Theodorou, M. K. 2006. The survival of anaerobic fungi in cattle faeces. *FEMS Microbiology Ecology*, 29:293-300.
 63. McSweeney, Ch., Mackie, R. 2012. Micro-organisms and ruminant digestion: state of knowledge, trends and future prospects. Background study paper (FAO), 61.
 64. Moate, P. J., Clarke, T., Davis, L. H., Laby, R. H. 1997. Rumen gases and bloat in grazing dairy cows. *Journal of Agricultural Science*, 129:459-469.
 65. Nagpal, R., Kumar Puniya, A., Griffith, G. W., Goel, G. 2009. Anaerobic rumen fungi: potential and applications. *Agriculturally Important Micro-Organisms*, 1:375-393.
 66. Nagy, T., Tunnicliffe, R. B., Higgins, L. D., Walters, C., Gilbert, H. J., Williamson, M. P. 2007. Characterization of a double dockerin from the cellulosome of the anaerobic fungus *Piromyces equi*. *Journal of Molecular Biology*, 373:612-622.
 67. Orpin, C.G. 1975. Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. *Journal of General Microbiology*, 1:249-262.
 68. Orpin, C.G., Bountiff, L. 1978. Zoospore chemotaxis in the rumen phycomycete *Neocallimastix frontalis*. *Journal of General Microbiology*, 104:113-122.
 69. Orpin, C. G. 1977a. The occurrence of chitin in the cell walls of the rumen organisms *Neocallimastix frontalis*, *Piromonas communis* and *Sphaeromonas communis*. *Journal of General Microbiology*, 99:215-218.
 70. Orpin, C. G. 1977b. The rumen flagellate *Piromonas communis*: Its life-history and invasion of plant material in the rumen. *Journal of General Microbiology*, 99:107-17.
 71. Orpin, C. G. 1994. Anaerobic Fungi: biology, ecology, and function. *In Anaerobic fungi: taxonomy, biology, and distribution in nature*, CRC press, Boca Raton, pp.1-46.
 72. Paul, S. S., Kamra, D. N., Sastry, V. R. B., Sahu, N. P., Agarwal, N. 2004. Effect of administration of an anaerobic gut fungus isolated from wild blue bull (*Boselaphus tragocamelus*) to buffaloes (*Bubalus bubalis*) on *in vivo* ruminal fermentation and digestion of nutrients. *Animal Feed Science and Technology*, 115:143-157.
 73. Paul, S. S., Deb, S. M., Punia, B. S., Singh, D., Kumar, R. 2010. Fibrolytic potential of anaerobic fungi (*Piromyces sp.*) isolated from wild cattle and blue bulls in pure culture and effect of their addition on *in vitro* fermentation of wheat straw and methane emission by rumen fluid of buffaloes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90:1218-1226.
 74. Peng, X., Wilken, S. E., Lankiewicz, T. S., Gilmore, S. P., Brown, J. L., Henske, J. K., Swift, C. L., Salamov, A., Barry, K., Grigoriev, I. v., Theodorou, M. K., Valentine, D. L., O'Malley, M. A. 2021. Genomic and functional analyses of fungal and bacterial consortia that enable lignocellulose breakdown in goat gut microbiomes. *Nature Microbiology*, 6:499-511.

75. Procházka, J., Mrázek, J., Štrosová, L., Fliegerová, K., Záborská, J., Dohányos, M. 2012. Enhanced biogas yield from energy crops with rumen anaerobic fungi. *Engineering in Life Sciences*, 12:343–351.
76. Raghothama, S., Eberhardt, R. Y., Simpson, P., Wigelsworth, D., White, P., Hazlewood, G. P., Nagy, T., Gilbert, H. J., Williamson, M. P. 2001. Characterization of a cellulosome dockerin domain from the anaerobic fungus *Piromyces equi*. *Nature Structural Biology*, 8:775-778.
77. Saye, L. M. G., Navaratna, T. A., Chong, J. P. J., O'Malley, M. A., Theodorou, M. K., Reilly, M. 2021. The anaerobic fungi: Challenges and opportunities for industrial lignocellulosic biofuel production. *Microorganisms*, 9, 694. DOI 10.3390/microorganisms9040694
78. Seppälä, S., Solomon, K. V., Gilmore, S. P., Henske, J. K., O'Malley, M. A. 2016. Mapping the membrane proteome of anaerobic gut fungi identifies a wealth of carbohydrate binding proteins and transporters. *Microbial Cell Factories*, 15, 212. DOI 10.1186/s12934-016-0611-7
79. Solomon, K. V., Haitjema, C. H., Henske, J. K., Gilmore, S. P., Borges-Rivera, D., Lipzen, A., Brewer, H. M., Purvine, S. O., Wright, A. T., Theodorou, M. K., Grigoriev, I. v., Regev, A., Thompson, D. A., O'Malley, M. A. 2016. Early-branching gut fungi possess large, comprehensive array of biomass-degrading enzymes. *Science*, 351:1192-1195.
80. Steenbakkers, P. J. M., Harhangi, H. R., Bosscher, M. W., van der Hoof, M. M. C., Keltjens, J. T., van der Drift, C., Vogels, G. D., Op Den Camp, H. J. M. 2003. β -Glucosidase in cellulosome of the anaerobic fungus *Piromyces sp. strain E2* is a family 3 glycoside hydrolase. *Biochemical Journal*, 370:963-970.
81. Swift, C. L., Louie, K. B., Bowen, B. P., Olson, H. M., Purvine, S. O., Salamov, A., Mondo, S. J., Solomon, K. V., Wright, A. T., Northen, T. R., Grigoriev, I. v., Keller, N. P., O'malley, M. A. 2021. Anaerobic gut fungi are an untapped reservoir of natural products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118, 2019855118. DOI 10.1073/pnas.2019855118
82. Swift, C. L., Brown, J. L., Seppälä, S., O'Malley, M. A. 2019. Co-cultivation of the anaerobic fungus *Anaeromyces robustus* with *Methanobacterium bryantii* enhances transcription of carbohydrate active enzymes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 46:1427-1433.
83. van der Giezen, M., Sjollem, K. A., Artz, R. R. E., Alkema, W., Prins, R. A. 1997. Hydrogenosomes in the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* have a double membrane but lack an associated organelle genome. *FEBS Letters*, 408:147-150.
84. van der Giezen, M., Tovar, J., Graham Clark, C. 2005. Mitochondrion-derived organelles in protists and fungi. *International Review of Cytology*, 244:175-225.
85. Vignais, P. M., Billoud, B., Meyer, J. 2001. Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiology Reviews*, 25:455-501.
86. Vinzelj, J., Joshi, A., Insam, H., Podmirseg, S. M. 2020. Employing anaerobic fungi in biogas production: challenges opportunities. *Bioresource Technology*, 300, 122687. DOI 10.1016/j.biortech.2019.122687

87. Vogels, G. D., Hoppe, W. F., Stumm, C. K. 1980. Association of methanogenic bacteria with rumen ciliates. *Applied and Environmental microbiology*, 40:608-612.
88. Voncken, F. G. J., Boxma, B., van Hoek, A. H. A. M., Akhmanova, A. S., Vogels, G. D., Huynen, M., Veenhuis, M., Hackstein, J. H. P. 2001. A hydrogenosomal [Fe]-hydrogenase from the anaerobic chytrid *Neocallimastix sp. L2*. *Gene*, 284F/:103-12.
89. Wang, Y., Youssef, N. H., Couger, M. B., Hanafy, R. A., Elshahed, M. S., Stajich, J. E. 2019. Molecular Dating of the Emergence of Anaerobic Rumen Fungi and the Impact of Laterally Acquired Genes. *mSystems*, 4, 247. DOI 10.1128/mSystems.00247-19
90. Wilken, S. E., Seppälä, S., Lankiewicz, T. S., Saxena, M., Henske, J. K., Salamov, A. A., Grigoriev, I. V., O'Malley, M. A. 2020. Genomic and proteomic biases inform metabolic engineering strategies for anaerobic fungi. *Metabolic Engineering Communications*, 13, 186. DOI 10.1016/j.mec.2019.e00107
91. Wilken, S. E., Monk, J. M., Leggieri, P. A., Lawson, C. E., Lankiewicz, T. S., Seppälä, S., Daum, C. G., Jenkins, J., Lipzen, A. M., Mondo, S. J., Barry, K. W., Grigoriev, I. V., Henske, J. K., Theodorou, M. K., Palsson, B. O., Petzold, L. R., O'malley, M. A. 2021. Experimentally validated reconstruction and analysis of a genome-scale metabolic model of an anaerobic *Neocallimastigomycota* fungus. *mSystems*, 6, 1. DOI 10.1128/mSystems.00002-21
92. Williams, C. L., Thomas, B. J., McEwan, N. R., Rees Stevens, P., Creevey, C. J., Huws, S. A. 2020. Rumen protozoa play a significant role in fungal predation and plant carbohydrate breakdown. *Frontiers in microbiology*, 11, 720. DOI 10.3389/fmicb.2020.00720
93. Wilson, C. A., Wood, T. M. 1992. Studies on the cellulase of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*, with special reference to the capacity of the enzyme to degrade crystalline cellulose. *Enzyme and Microbial Technology*, 14:258-264.
94. Youssef, N. H., Couger, M. B., Struchtemeyer, C. G., Liggenstoffer, A. S., Prade, R. A., Najar, F. Z., Atiyeh, H. K., Wilkins, M. R., Elshahed, M. S. 2013. The genome of the anaerobic fungus *Orpinomyces sp. strain c1a* reveals the unique evolutionary history of a remarkable plant biomass degrader. *Applied and Environmental Microbiology*, 79:4620-4634.