



VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Raminta Balčytytė

**MIKROORGANIZMŲ NUSTATYMAS ANT TERMOIZOLIACINIŲ
MEDŽIAGŲ, GAUTŲ PERDIRBANT ANTRINES ŽALIAVAS
DETECTION OF MICROORGANISMS ON THERMAL INSULATION
MATERIALS OF RECYCLED RAW MATERIALS**

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 6211FX017

Biotechnologijos studijų kryptis

Vilnius, 2021

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU
Katedros vedėjas

(Parašas)
Jaunius Urbonavičius
(Vardas, pavardė)
2021-05-24
(Data)

Raminta Balčytytė

**MIKROORGANIZMŲ NUSTATYMAS ANT TERMOIZOLIACINIŲ
MEDŽIAGŲ, GAUTŲ PERDIRBANT ANTRINES ŽALIAVAS**

**DETECTION OF MICROORGANISMS ON THERMAL INSULATION
MATERIALS OF RECYCLED RAW MATERIALS**

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 6211FX017

Biotechnologijos studijų kryptis

Vadovas	<u>dokt. Dovilė Vasiliauskienė</u> (Pedag. vardas, vardas, pavardė)	_____ (Parašas)	_____ (Data)
Konsultantas	<u>dr. Jaunius Urbonavičius</u> (Pedag. vardas, vardas, pavardė)	_____ (Parašas)	_____ (Data)
Lietuvių kalbos konsultantas	<u>dr. Vaida Buivydienė</u> (Pedag. vardas, vardas, pavardė)	_____ (Parašas)	_____ (Data)

Vilnius, 2021

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Biotechnologijos studijų kryptis
Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 6211FX017

TVIRTINU
Katedros vedėjas

(Parašas)
Jaunius Urbonavičius

(Vardas, pavardė)
2021-05-24

(Data)

**BAIGIAMOJO MAGISTRO DARBO
UŽDUOTIS**

.....Nr.....

Vilnius

Studentei _____
Ramintai Balčytytei

(Vardas, pavardė)

Baigiamojo darbo tema:

**MIKROORGANIZMŲ NUSTATYMAS ANT TERMOIZOLIACINIŲ MEDŽIAGŲ, GAUTŲ
PERDIRBANT ANTRINES ŽALIAVAS**

patvirtinta 2021 m. balandžio 14 d. dekanu potvarkiu Nr. 90fm

Baigiamojo darbo užbaigimo terminas 2021 m. gegužės 24 d.

BAIGIAMOJO DARBO UŽDUOTYS:

1. Išsaugoti ir identifikuoti mikroorganizmus.
2. Iširti mikroorganizmų fermentinį aktyvumą.
3. Nustatyti ar identifikuoti mikroorganizmai pasižymi antimikrobinėmis savybėmis.
4. Išskirti bendrus karotenoidus bei nustatyti torularodino ir toruleno kiekį mišinyje, patikrinti jų antibakterines savybes.

Baigiamojo magistro darbo konsultantai:

dr. Jaunius Urbonavičius
(Pedag. vardas, vardas, pavardė)

Vadovas _____
(Parašas)

dokt. Dovilė Vasiliauskienė
(Pedag. vardas, vardas, pavardė)

Užduotį gavau

(Parašas)
Raminta Balčytytė

(Vardas, pavardė)
2019-10-01

(Data)

Vilniaus Gedimino technikos universitetas
Fundamentinių mokslų fakultetas
Chemijos ir bioinžinerijos katedra

ISBN ISSN
Egz. sk.
Data-....-....

Antrosios pakopos studijų **Bioinžinerijos** programos magistro baigiamasis darbas

Pavadinimas: **Mikroorganizmų nustatymas ant termoizoliacinių medžiagų, gautų perdirbant antrines žaliavas**

Autorius: **Raminta Balčytė**

Vadovas: **Dovilė Vasiliauskienė**

Kalba: lietuvių

Anotacija

Vidaus patalpų oro kokybė labai svarbi žmonių sveikatai, tačiau dėl drėgmės pertekliaus patalpose, ant sienų, pertvarų bei termoizoliacinių medžiagų gali augti mikroorganizmai. Ypatingai pavojingi grybeliai, kurie gamina mikotoksinius. Šie toksinai sukelia alergines reakcijas ir kvėpavimo takų infekcijas. Kai kurie mikroorganizmai geba sintetinti celiuliazės fermentus, skaidančius celiuliozę, kurios gausu iš perdirbto popieriaus pagamintose termoizoliacinėse medžiagose.

Baigiamojo magistro darbo metu nuo gamtinės kilmės termoizoliacinės medžiagos padarytos nuoplovos. Išskirta bendroji genomine DNR, kuri naudota atliekant naujos kartos sekoskaitą. Mikroorganizmų DNR amplifikuota polimerazinės grandininės reakcijos metodu naudojant atitinkamai 16S rRNR universalius bakterinius arba ITS srities grybeliams specifinius pradmenis. Mėginiai paruošti ilgalaikiam saugojimui bei išsiųsti sekoskaitai. Išanalizavus gautus rezultatus identifikuota 14 pavienių mikroorganizmų, iš kurių 6 skirtingi – bakterijos, mielės ir 4 pelėsinų grybelių rūšys. Nustatyti identifikuotų mikroorganizmų fermentiniai – amilazinis ir celiuliazinis aktyvumai. *Penicillium rubens* CBS 129667 (G11) grybelis pasižymėjo didžiausiu endo- β -1,4-gliukanaziniu ($97,58 \pm 0,82$ U/ml) ir bendruoju celiuliaziniu ($47,74 \pm 0,49$ U/ml) aktyvumu, o mieliagrybis *Rhodotorula mucilaginosa* CBS 316 (G3) – didžiausiu ($32,46 \pm 0,42$ U/ml) amilaziniu aktyvumu. Ištirta, kad labiausiai antimikrobinėmis savybėmis pasižymėjo *Pantoea agglomerans* JCM1236 (G7) bakterijos, prieš *B. subtilis* sudarydamos $33,00 \pm 0,58$ mm inhibicijos zoną. Iš raudonųjų mielių išskirti bendrieji karotenoidai, o didžiausia torularodino ($2,57 \pm 0,37$ mg/l) ir toruleno ($2,20 \pm 0,21$ mg/l) ekstrakcijos išeiga nustatyta *Rhodotorula mucilaginosa* CBS 316 (G3) mielėse po šaldymo-šildymo ciklo. Išskirti karotenoidai nepasižymėjo antibakterinėmis savybėmis.

Darbą sudaro 6 dalys: įvadas, literatūros apžvalga, medžiagos ir metodai, rezultatai ir jų aptarimas, išvados, literatūros sąrašas.

Darbo apimtis – 72 p. teksto be priedų, 25 paveikslai, 7 lentelės, 123 bibliografiniai šaltiniai.

Prasminiai žodžiai: bakterijos, grybeliai, 16S rRNR, ITS, naujos kartos sekoskaita, termoizoliacinė medžiaga, fermentinis aktyvumas, karotenoidai

Vilnius Gediminas Technical University
Faculty of Fundamental Sciences
Department of Chemistry and Bioengineering

ISBN ISSN
Copies No.
Date-....-....

Master Degree Studies **Bioengineering** study programme Master's Graduation Thesis

Title: **Detection of microorganisms on thermal insulation materials of recycled raw materials**

Author: **Raminta Balčytė**

Academic supervisor: **Dovilė Vasiliauskienė**

Thesis language: Lithuanian

Annotation

Indoor air quality is essential for human health, but due to the excess of moisture in the indoor environment, on walls, partitions, and thermal insulation materials, microorganisms can grow. The hazardous fungi can produce mycotoxins. These toxins cause allergic reactions and respiratory infections. Some microorganisms can synthesize cellulase enzymes that break down cellulose, which is abundant in thermal insulation materials made from recycled paper.

During the final master's thesis, the wash-off from thermal insulation material of natural origin was made. Total genomic DNA was isolated and used for next-generation sequencing. The DNA of the microorganisms was amplified by the polymerase chain reaction using universal bacterial 16S rRNA or fungal-specific ITS primers. Samples were prepared for long-term storage and sent for sequencing. The obtained results were analyzed and 14 individual microorganisms were identified of which 6 were different – bacteria, yeast and 4 mold species. The enzymatic – amylase and cellulase activities of the identified microorganisms were determined. *Penicillium rubens* CBS 129667 (G11) mold had the highest endo- β -1,4-glucanase ($97,58 \pm 0,82$ U/ml) and total cellulase ($47,74 \pm 0,49$ U/ml) activity and yeast *Rhodotorula mucilaginosa* CBS 316 (G3) showed the highest ($32,46 \pm 0,42$ U/ml) amylase activity. *Pantoea agglomerans* JCM1236 (G7) bacteria showed the best antimicrobial properties against *B. subtilis* by making $33,00 \pm 0,58$ mm inhibition zone. Total carotenoid content were isolated from red yeast and the highest extraction yield of torularhodin ($2,57 \pm 0,37$ mg/l) and torulene ($2,20 \pm 0,21$ mg/l) was determined in *Rhodotorula mucilaginosa* CBS 316 (G3) after cooling-heating cycle. Extracted carotenoids did not show antibacterial properties.

Thesis structure: introduction, literature review, materials and methods, results and discussion, conclusions, references.

The final thesis consists of: 72 pages text without appendixes, 25 pictures, 7 tables, 123 bibliographical entries

Keywords: bacteria, fungi, 16S rRNA, ITS, next-generation sequencing, thermal insulation, enzymatic activity, carotenoids

TURINYS

PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS.....	8
LENTELIŲ SĄRAŠAS	9
SAMTRUMPŲ SĄRAŠAS	10
IVADAS.....	11
1. LITERATŪRINĖ DALIS.....	13
1.1. Mikroorganizmai	13
1.2. Termoizoliacinės medžiagos.....	13
1.3. Termoizoliacinės medžiagos iš antrinių žaliavų	14
1.4. Celiuliozinė termoizoliacinė medžiaga.....	15
1.5. Mikroorganizmai ant termoizoliacinių medžiagų.....	17
1.6. Mikroorganizmų augimą skatinantys aplinkos veiksniai.....	18
1.7. Grybeliai kasdienybėje	19
1.8. Grybelių augimas vidaus patalpose	20
1.9. Patalpose paplitę mikroorganizmai.....	20
1.10. Grybelių klasifikavimas	23
1.11. Celiuliozės skaidymas	24
1.12. Krakmolo skaidymas.....	25
1.13. Karotenoidai	27
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	30
2.1. Naudoti prietaisai ir medžiagos	30
2.1.1. Naudoti prietaisai.....	30
2.1.2. Naudotos medžiagos ir rinkiniai.....	31
2.1.3. Naudotos terpės	32
2.2. Naudoti metodai.....	34
2.2.1. Mėginio paruošimas	34
2.2.2. Bendrosios genominės DNR išskyrimas	34
2.2.3. Mikroorganizmų išskyrimas iki pavienių kultūrų	34
2.2.4. Polimerazinė grandininė reakcija	34
2.2.5. DNR elektroforezė agarozės gelyje.....	36
2.2.6. PGR produkto gryninimas iš PGR mišinio	36
2.2.7. Mikroorganizmų išsaugojimas	36

2.2.8.	Mikroskopavimas	37
2.2.8.1.	Bakterijų mikroskopavimas	37
2.2.8.2.	Mielų mikroskopavimas	37
2.2.8.3.	Pelėsinių grybelių mikroskopavimas	37
2.2.9.	Mikroorganizmų fermentinio aktyvumo nustatymas	38
2.2.9.1.	Celiulazinio aktyvumo tikrinimas.....	38
2.2.9.2.	Amilazinio aktyvumo tikrinimas	39
2.2.9.3.	Celiulazinio aktyvumo tyrimas DNS reagentu	39
2.2.9.4.	Endo- β -1,4-gliukanazinio aktyvumo tyrimas	39
2.2.9.5.	Bendro celiulazinio aktyvumo tyrimas	40
2.2.10.	Amilazinio aktyvumo tyrimas DNS reagentu	41
2.2.11.	Antimikrobinių savybių tyrimas	41
2.2.12.	Jautrumo antigrybeliniam vaistui tyrimas diskelių difuzijos metodu	42
2.2.13.	Karotenoidų ekstrakcija iš raudonųjų mielių	42
2.2.14.	Mielų karotenoidų antibakterinių savybių tyrimas	43
3.	REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	44
3.1.	Naujos kartos sekoskaita.....	44
3.2.	Mikroorganizmai	44
3.3.	Identifikuoti mikroorganizmai	45
3.4.	Mikroorganizmų fermentinio aktyvumo nustatymas.....	51
3.4.1.	Kokybiniai metodai – dažymas Gramo jodu ir Kongo raudonuoju	51
3.4.2.	Kokybinis metodas – amilazinio aktyvumo tikrinimas	53
3.4.3.	Endo- β -1,4-gliukanazinio aktyvumo tyrimas DNS reagentu	53
3.4.4.	Bendrojo celiulazinio aktyvumo matavimas DNS reagentu	54
3.4.5.	Amilazinio aktyvumo tyrimas DNS reagentu	55
3.5.	Antimikrobinių savybių tyrimas	56
3.6.	Jautrumo antifungicidiniams vaistams tyrimas	57
3.7.	Karotenoidų ekstrakcija iš mielių	57
3.8.	Mielų karotenoidų antibakterinių savybių tyrimas	59
	IŠVADOS	60
	LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	61

PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS

1 pav. Gamtinė termoizoliacinė medžiaga, pagaminta iš perdirbto popieriaus	17
2 pav. Celiuliozės hidrolizės schema	25
3 pav. Struktūrinės β -karoteno, toruleno ir torularodino formulės	28
4 pav. Krona diagrama, vaizduojanti bakterijų bendrijos pasiskirstymą mėginyje	44
5 pav. Mikroorganizmų DNR amplifikuota PGR metodu	45
6 pav. Iš PGR mišinio išgrynintas PGR produktas	45
7 pav. <i>Pantoea agglomerans</i> (G7)	46
8 pav. <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (G1).....	47
9 pav. <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (G3).....	47
10 pav. <i>Penicillium citreonigrum</i> (G10) ant PDA terpės.....	48
11 pav. <i>Penicillium citreonigrum</i> (G10) mikroskopinis vaizdas	48
12 pav. <i>Penicillium rubens</i> (G11) ant PDA terpės.....	49
13 pav. <i>Penicillium rubens</i> (G11) mikroskopinis vaizdas	49
14 pav. <i>Trichoderma simmonsii</i> (G12) ant PDA terpės.....	49
15 pav. <i>Trichoderma simmonsii</i> (G12) mikroskopinis vaizdas	50
16 pav. <i>Sarocladium kiliense</i> (G16) ant SDA terpės	50
17 pav. <i>Sarocladium kiliense</i> (G16) mikroskopinis vaizdas.....	50
18 pav. Mikroorganizmų celiuliazinio aktyvumo tikrinimas.....	51
19 pav. Grybelių celiuliazinio aktyvumo tikrinimas.....	52
20 pav. Mieliagrybių celiuliazinio aktyvumo tikrinimas	52
21 pav. Mikroorganizmų amilazinio aktyvumo tikrinimas.....	53
22 pav. Mikroorganizmų antimikrobinių savybių tyrimas.....	56
23 pav. Grybelių jautrumas amfotericinui B.....	57
24 pav. Karotenoidų ekstrakcijos spektrai– sugerties priklausomybė nuo bangos ilgio.....	58
25 pav. Karotenoidų antibakterinių savybių tyrimas	59

LENTELIŲ SĄRAŠAS

1 lentelė. Identifikuotos bakterijos, remiantis NCBI duomenų baze	46
2 lentelė. Identifikuotos mielės ir pelėsiai grybeliai, remiantis NCBI duomenų baze.....	46
3 lentelė. Mikroorganizmų fermentinis indeksas, naudojant Kongo raudonąjį ir Gramo jodą.....	52
4 lentelė. Mikroorganizmų celiuliazinis aktyvumas	54
5 lentelė. Mikroorganizmų amilazinis aktyvumas	55
6 lentelė. Mikroorganizmų antimikrobinių savybių tyrimo prieš <i>B. subtilis</i> rezultatai	56
7 lentelė. Karotenoidų ekstrakcijos išeigos.....	58

SAMTRUMPŲ SĄRAŠAS

CMC	Karboksimetilceliuliozė
DNR	Deoksiribonukleorūgštis
DNS	3,5-Dinitrosalicilo rūgšties reagentas
FI	Fermentinis indeksas
FPU	Bendras celiuliazinis aktyvumas pagal filtrinį popierių
NGS	Naujos kartos sekoskaita
OV	Optiniai vienetai
PGR	Polimerazinė grandininė reakcija
RNR	Ribonukleorūgštis
SD	Santykinė oro drėgmė

IVADAS

Patalpų šildymas, siekiant palaikyti asmeninį šiluminį komfortą, sunaudoja daug energijos ir yra pagrindinis šiltnamio efektą sukeliančių išmetamųjų dujų šaltinis, kadangi didžioji energijos dalis skiriama erdvės šildymui. Dėl to kyla didžiulis energijos švaistymas ir greitėja pasaulinė energetikos krizė. Literatūroje teigiama, kad daugiau negu 75 % suvartojamos elektros energijos sunaudojama pastatuose, o maždaug pusė pastato suvartojamos energijos – būtent patalpoms šildyti (Yue et al., 2019). Pastaraisiais metais vis daugiau energijos sunaudoja energetikos sistemos, teikiančios šildymo, vėdinimo bei oro kondicionavimo paslaugas. Pastatų termoizoliacijos tobulinimas – vienas iš efektyviausių būdų sutaupyti energijos, sumažinant šilumos ar šalčio nuostolius. Termoizoliacinės medžiagos, pagamintos iš žaliųjų medžiagų, tokios kaip žemės ūkio ar miško liekanos pastaruoju metu vystosi labai greitai, nors jų tyrimų ir plėtros istorija yra palyginti trumpa (Liu et al., 2017).

Gamtinės kilmės kompozitinių termoizoliacinių medžiagų spartus vystymosi laikotarpis prasidėjo XX a. pabaigoje. Praeityje žaliosios medžiagos buvo naudojamos kaip pašaras gyvuliams, kuras namų buityje, ypač daugelyje besivystančių šalių (Liu et al., 2017). Susidomėjimas gamtinės kilmės termoizoliacinėmis medžiagomis pastebimai išaugo maždaug nuo 2000 metų ir per 15 metų šių medžiagų dalis Vokietijos rinkoje pakilo nuo 1 % iki 11 % (Bozsaky, 2019). Viena iš priežasčių – padidėjęs visuomenės supratimas apie aplinkos apsaugą ir energijos taupymą, ypač XXI amžiuje. Taip pat keliama vis aukštesni reikalavimai patalpų oro kokybei, o tam suvartojama daugiau energijos, todėl pastatų termoizoliacija – veiksmingas būdas siekiant sumažinti energijos sąnaudas (Liu et al., 2017). Ypatingai pastaraisiais metais, kai naudojamos aplinkai nekenksmingos, gamtinės kilmės termoizoliacinės medžiagos.

Pasaulio sveikatos organizacijos duomenimis, patalpų oro kokybė daro didesnę įtaką žmonių sveikatai nei lauko oras, nes išsivysčiusių šalių gyventojai 90 % laiko praleidžia uždaroje patalpose (Saini, Dutta, & Marques, 2020; Suchorab et al., 2019). Grybelių augimas patalpose yra globali problema – literatūroje teigiama, kad 25 % visų socialinių būstų Europoje turi problemų dėl drėgmės ir grybelių augimo (Bekker, 2014; Segers et al., 2016). Tai ne tik gadina statybines medžiagas, bet ir kelia grėsmę sveikatai. Tai ypač pavojinga astma sergantiems ir alergiškiems asmenims – patalpų grybelių gaminami mikotoksinai gali sukelti pavojų sveikatai, tačiau dar nežinoma, koku mastu šie nuodingi junginiai gaminasi ir patenka į vidaus patalpų aplinką (Segers et al., 2016).

Mikroorganizmus galima suskirstyti į keletą pagrindinių grupių, tokių kaip bakterijos, virusai, grybeliai ir dumbliai. Kai kurie iš šių mikroorganizmų, įskaitant grybelius, gamina fermentą celiuliazę, todėl sugeba virškinti celiuliozę. Gamtoje šie mikroorganizmai veikia kaip skaidytojai ir vaidina svarbų vaidmenį skaidydami ir perdirbdami augalines medžiagas. Tai reiškia, kad celiuliozės pagrindu sukurta izoliacinė medžiaga nėra apsaugota nuo skaidymo mikroorganizmais, jei bus sudarytos tinkamos augimo sąlygos. O kai kurie grybeliai žmonėms gali sukelti alergiją ir kitas sveikatos problemas – tai viena iš priežasčių, kodėl pastatų termoizoliacinėse medžiagose grybelis nepageidaujamas (Heggebø, 2014).

Ši tema aktuali, nes vidaus patalpų kolonizacija mikroorganizmais, iš kurių dažniausi pelėsiniai grybeliai, yra opi problema, sukelianti daug diskomforto. Su tuo susijusios problemos yra labai įvairios. Visų pirma, sugadintas estetiškas sienų ar kitų paviršių vaizdas, taip pat paviršių kolonizavę mikroorganizmai gali būti patogeniniai, o tai gali sukelti alergines reakcijas bei kvėpavimo takų infekcijas. Nagrinėjamos temos naujumas pasireiškia ir tuo, kad mikroorganizmų mėginys paimtas nuo eksploatuotos gamtinės kilmės termoizoliacinės medžiagos, pagamintos iš perdirbto popieriaus.

Magistro darbo tikslas: nustatyti mikroorganizmus, augančius ant termoizoliacinių medžiagų, gautų perdirbus antrines žaliavas.

Tikslui pasiekti iškelti uždaviniai:

1. Išsaugoti ir identifikuoti mikroorganizmus.
2. Ištirti mikroorganizmų fermentinį aktyvumą.
3. Nustatyti ar identifikuoti mikroorganizmai pasižymi antimikrobinėmis savybėmis.
4. Išskirti bendrus karotenoidus bei nustatyti torularodino ir toruleno kiekį mišinyje, patikrinti jų antibakterines savybes.

1. LITERATŪRINĖ DALIS

1.1. Mikroorganizmai

Mikroorganizmai egzistuoja jau 3,8 milijardo metų, o žmonėms jie žinomi tik 300 metų (Hodges, 2003). Mikroorganizmai – platus terminas, apimantis bakterijas, mieles, grybelius ir virusus. Klasifikacija yra plati ir apima tiek mikroorganizmus, galinčius replikuotis už bet kurio šeimininko ribų, tiek tuos, kuriems išgyventi reikalingas šeimininkas. Jų dydis svyruoja nuo mažiau nei 100 nm iki beveik milimetro (Batt, 2016). Mikroorganizmai yra labai svarbūs ekologiniu, ekonominiu ir socialiniu požiūriu. Mikroorganizmai atlieka svarbų vaidmenį atliekų perdirbimo procese. Jie yra atsakingi už biologinį neorganinių, organinių medžiagų skaidymą ir maisto medžiagų perdirbimą natūralioje aplinkoje (Rani, Sangwan, Joshi, Sagar & Bala, 2019).

Bakterijos yra kelių mikrometrų vienaląsčiai organizmai, neturintys organelių ir branduolio (Dodds & Whiles, 2020). Įvairios formos – rutulinės, lazdelinės ar spiralinės (Dykhuizen, 2005). Grybeliai (angl. *fungi*) priklauso atskirai karalystei – grybams ir apima pelėsius bei mieles. Pelėsių kūnai yra sudaryti iš ilgų, siūlinių ląstelių, vadinamų hifais. Sujungtas šių vamzdinių išsišakojančių hifų tinklas turi daugybę genetiškai identiškų branduolių ir yra laikomas vienu organizmu, vadinamu pelėsių kolonija arba grybiena (Heggebø, 2014; Samson, 2011). Mielės yra vienaląsčiai grybeliai, kurie dalyvauja daugelyje sudėtingų ekosistemų procesų (Hodges, 2003; Starmer & Lachance, 2011). Klasikiniame maisto grandinės modelyje laisvai gyvenančios mielės visų pirma yra skaidytojai (Starmer & Lachance, 2011).

Grybeliai gali gauti maistinių medžiagų iš įvairių organinių medžiagų arba substratų. Jie reikalingi ląstelių veiklai, pavyzdžiui, medžiagų apykaitai ir augimui. Norėdamas pasiekti maistines medžiagas, grybelis prasiskverbia į substratą ir išskiria fermentus, kurie maistines medžiagas suskaido iki mažų molekulių. Naudodamiesi šiuo metodu grybeliai gali panaudoti maistines medžiagas iš kelių substratų, įskaitant plunksnas, naftos produktus, medieną bei celiuliozę. Vanduo yra svarbus visiems grybeliams, nes jis reikalingas norint įsisavinti maistines medžiagas, padeda išlaisvinti tarpląstelinius fermentus, kurie skaido maistines medžiagas, reikalingas grybeliui augti (Heggebø, 2014).

1.2. Termoizoliacinės medžiagos

Paprastas izoliacines medžiagas pagal žaliavą galima suskirstyti į keturias kategorijas:

- iš uolienu ir šlakų, tokių kaip akmens vata, stiklo vata, išpūstas perlitas, stiklo karoliukai, vermikulitas, pelenai, keramikos gaminiai;

- iš naftos chemijos ir anglių cheminių tarpinių produktų, tokių kaip polistirenas, poliuretanai bei polietilenas;
- iš augalų, įskaitant žemės ūkio, miškininkystės ir pramoninių augalų pluoštų atliekas, tokias kaip šiaudai, ryžių luobelė, makulatūra, medžio drožlės, medvilnė ir kukurūzų pasėliai;
- iš metalų, tokių kaip metalinė atspindžio plėvelė kietojo metalo skydelis (angl. *metal reflection film hard metal visor*), spinduliuotės plokštė, kurių pritaikymas vis dar ribotas, nes juos galima naudoti tik stoguose ir jie yra daug brangesni nei kitos termoizoliacinės medžiagos (Liu et al., 2017).

Biodegrauojančios ir organinės statybinių atliekų sudedamosios dalys, tokios kaip mediena, bambukas, plastikas ir pakuočių atliekos laikomos neinertinėmis medžiagomis, kurias reikia šalinti sąvartynuose. Šios ne inertiškos medžiagos sudaro apie 23 % statybinių atliekų Honkonge (Wang, Chen, Tsang, Poon & Ok, 2017).

1.3. Termoizoliacinės medžiagos iš antrinių žaliavų

Dauguma esamų termoizoliacinių medžiagų nėra atsinaujinančios, pavyzdžiui, pagamintos iš naftos chemijos produktų. Taigi atsinaujinančios, aplinkai draugiškos, nebrangios ir didelio šiluminio atsparumo izoliacinės medžiagos yra labai reikalingos (Liu et al., 2017).

Po 1970-ųjų metų energetikos krizės Švedijos vyriausybė skatino gerinti pastatų energijos vartojimo efektyvumą. Dėl to daugelis istorinių pastatų iš medienos ir plytų Švedijoje buvo atnaujinti ir termiškai izoluoti šiuolaikinėmis izoliacinėmis medžiagomis, tokiomis kaip mineralinė vata ir polistirenas. Žala dėl drėgmės ir mikroorganizmų augimo problemų atsirado šiltinant pastatus. Autoriai iškėlė hipotezę, kad kalkių ir kanapių mišinio naudojimas pagerintų pastato energetinį efektyvumą, nesukeldamas drėgmės ir patvarumo problemų. Kalkių ir kanapių mišinio didžiąją dalį sudaro pramoniniai kanapių spalvai – atsinaujinantys žemės ūkio ištekliai, kuriuos galima auginti Švedijoje (Strandberg, Balksten & Donarelli, 2017).

Statymo iš kalkių ir kanapių mišinio pranašumai, be kita ko, yra nedidelis poveikis aplinkai, geros termoizoliacinės savybės ir išskirtinis poringumas. Kanapių spalvai pirmą kartą pradėti naudoti statybinėse medžiagose Prancūzijoje ankstyvais 1990-aisiais. Iš pradžių kanapių spalvai buvo naudojami lengvesniems betono mišiniams gaminti. Vėliau paaiškėjo, kad kanapių spalvius naudinga naudoti kartu su statybinėmis kalkėmis. Yra žinomi keli projektai Jungtinėje Karalystėje, kur kalkių ir kanapių mišinys panaudotas atnaujinant istorinius pastatus (Strandberg et al., 2017).

Medienos ir plastiko atliekų perdirbimas į medienos-plastiko kompozitus (angl. *wood plastic composites*) yra potencialiai patraukli technologija, nes medienos-plastiko kompozitai yra tvarios

ekologiškos medžiagos, turinčios augalų pluoštų ir termoplastikų. Jie demonstruoja didesnę stiprumą ir svorio santykį nei betonas, taip pat yra daug stipresnis ir tvirtesnis nei plastikai. Šie biokompozitiniai produktai, palyginus su plastikiniais gaminiais, taip pat pasižymi lengvumu ir geresnėmis garso, smūgio ir šilumos atkuriamumo savybėmis (L. Wang et al., 2017).

Pastaruoju metu didėja susidomėjimas žaliosiomis termoizoliacinėmis medžiagomis. Žemės ūkio šiaudai, tokie kaip kviečių, kukurūzų ar ryžių šiaudai, neapdoroti (pavyzdžiui, šiaudų rulonai) ilgą laiką buvo naudojami kaip statybinės izoliacinės medžiagos dėl jų tuščiavidurės struktūros, mažų sąnaudų, mažo tankio bei šilumos laidumo. Iki šiol gamtinės kilmės termoizoliacinių medžiagų apibrėžimas yra daug platesnis, apimantis biologines medžiagas, tokias kaip kanapės, linai bei medvilnės stiebai (Liu et al., 2017).

Sparčiai auga ekologiškų statybinių medžiagų, įskaitant izoliacines medžiagas iš atsinaujinančių išteklių, paklausa. Todėl izoliacinių medžiagų, pagamintų iš kanapių, naudojimas tendencingai auga. Tokie gaminiai yra tvarūs, atsinaujinantys ir biologiškai skaidomi (Freivalde, Kukle, Andžs, Bukšans & Gravitis, 2014). Atkreiptas dėmesys į kanapių pluošto izoliacinių medžiagų atsparumą ugniai, kadangi natūralių pluoštų reakcija į ugnį yra veiksnys, ribojantis izoliacinių medžiagų naudojimą statybose (Liu et al., 2017; Freivalde et al., 2014).

Sukurtas ekologiškas kompozitas, kuriame naudota tik linų pluošto medžiaga šilumos izoliacijai bei linų pakulai – garsui sugerti (Hajj et al., 2011). Naudojant karštą presavimą buvo sukurta nauja, aplinkai nekenksminga termoizoliacinė medžiaga, sudaryta iš medvilnės stiebų pluošto, nenaudojant rišamosios medžiagos bei cheminių priedų (Zhou, Zheng, Li & Lu, 2010). Sukurti nauji tvarūs kompozitai, rišant kanapių spalius su nauju hibridiniu organiniu-neorganiniu rišikliu (Sassoni, Manzi, Motori, Montecchi & Canti, 2015). Taip pat miško liekanos, tokios kaip kamštinė žievė (angl. *cork*), medienos pluoštai, drožlės, skiedros naudojamos gamtinės kilmės izoliacinėse medžiagose. Kanapių, šiaudų, linų, medžio, kokoso, saulėgrąžų, kukurūzų tyrimai yra labai populiarūs ir apima apie 73 % visų darbų. Apie 37 % visų tyrimų sutelkta į gamtinės kilmės termoizoliacinių medžiagų iš vienos pagrindinės medžiagos panaudojimo atvejus, o 63,8 % – į hibridinių medžiagų panaudojimą (Liu et al., 2017).

1.4. Celiuliozinė termoizoliacinė medžiaga

Pastaraisiais metais vis labiau domimasi kitomis šilumą izoliuojančiomis medžiagomis, ypač ekologiškesnėmis ir turinčiomis geresnį bendrą energinį naudingumą (gamybos energijos ir energijos taupymo poveikio santykis naudojimo metu) (Vėjelis, Gnipas, & Keršulis, 2006). Žvelgiant į gamtinių termoizoliacinių medžiagų rinką Vokietijoje, celiuliozinės izoliacijos dalis yra didžiausia (32 %), po

jos seka medienos plaušų plokštės (28 %) ir medienos vatos gaminiai (20 %). Kanapių ir linų pluošto pagrindu pagamintos medžiagos sudaro 9 %, avių vilnos izoliacija 4 %, o likusius 7 % kitos medžiagos. Jei minėtos medžiagos sumontuotos pastatuose, o ne medžiagose, sukeliančiose degimą, o tai taip pat sukelia CO₂ emisiją, tada CO₂ koncentracija ore gali būti stipriai sumažinta (Bozsaky, 2019).

Popierius yra dažniausia atliekų rūšis, randama beveik visose veiklos srityse, ir yra svarbus celiuliozės pluošto šaltinis. Įvairių formų (kokybiškas popierius, mišrus popierius, laikraščiai, žurnalai ir gofruotas kartonas) popierius 2014 metų duomenimis sudaro apie 41 % visų buitinių atliekų. Popierius yra perdirbama medžiaga, kurios biologinio skaidymo periodas pasiekus sąvartyną apima 3-12 mėnesių, todėl popieriaus atliekų perdirbimo nauda gamtai yra nepaprastai svarbi (Aciu, Varvara, Cobirzan, & Balog, 2014).

1920 m. Skandinavijoje išrasta biraus užpildo ir įpučiama celiuliozinė termoizoliacija naudota kaip medinių konstrukcijų užpildo izoliacija. Celiuliozinė termoizoliacija ilgą laiką buvo naudojama tik šiame regione (Bozsaky, 2019). JAV ji naudojama nuo 1940-ųjų, o Korėjoje – daugiau nei 30 metų. Biri celiuliozinė izoliacija gaminama Lietuvoje nuo 1993 m., naudojant suomiško koncerno technologiją ir įrangą. Biri užpildo celiuliozinė termoizoliacinė medžiaga gaminama iš grynų celiuliozės atliekų, gautų gaminant popierių arba iš susmulkinto laikraščio (apie 80 %) ir cheminių priedų (boratų (9-12 %) ir boro rūgšties (8-10 %)), kurie naudojami ugnies ir pelėsių prevencijai. Boratų ir boro rūgšties tyrimai parodė, kad neigiamas poveikis žmogaus sveikatai nepastebėtas (Vėjelis et al., 2006).

Celiuliozinė termoizoliacija yra perdirbtas laikraštis, iš kurio pašalinama kas nereikalinga, pavyzdžiui, sąvaržėlės. Išvalyta medžiaga patenka į stambaus, o po to į smulkaus malimo malūną. Po šios procedūros į smulkiai maltą medžiagą dedama priemaišų (borakso, magnio sulfato), kurios pagerina atsparumą ugniai, apsaugo nuo pelėsių, vabzdžių bei graužikų. Galiausiai mišinys supilamas į plastikinius maišelius. Celiuliozinė termoizoliacija sugeba užpildyti net mažiausius įdubimus ir gali suformuoti nepertraukiamą izoliacinį sluoksnį. Kadangi tai perdirbta žaliava, jos gamybai reikia mažiau energijos, taip pat ji yra paprasta, greita, o po gamybos nelieka atliekų. Celiuliozinė termoizoliacija naudojama naujuose ir renovuojamuose pastatuose, ji gali būti pučiama per vamzdį ant paviršiaus arba į įdubimą naudojant specialią įpūtimo mašiną (Bozsaky, 2019; Vėjelis et al., 2006). Ši technologija yra tinkama apšiltinant sienas, grindis, lubas, šlaitinius stogus (tarp gegnių), tuo pačiu užtikrinant gerą garso izoliaciją (Aciu et al., 2014; Bozsaky, 2019).

Celiuliozinės medžiagos paprastai pelyja ir sugeria drėgmę, o tai blogina medžiagų savybes: izoliacines savybes, ilgaamžiškumą ir vidaus oro kokybę. Padidėjus drėgmės kiekiui termoizoliacija sumažėja dėl šiluminio laidumo per vandenį. Be to, didesnis drėgmės kiekis padidina grybelių riziką, o tai gali pabloginti patalpų oro kokybę ir sumažinti celiuliozinės izoliacinės medžiagos patvarumą (Zheng, 2017). Ant popieriaus termoizoliacijos (sudarytos iš 85 % celiuliozės pluošto, 9 % aliuminio hidroksido ir 6 % boro rūgšties) aptikti *Alternaria alternata*, *Penicillium* sp. ir *Chaetomium* sp. grybeliai (Klamer, Morsing, & Husemoen, 2004).



1 pav. Gamtinė termoizoliacinė medžiaga, pagaminta iš perdirbto popieriaus

1 paveiksle pavaizduota gamtinės kilmės termoizoliacinė medžiaga, pagaminta iš perdirbto popieriaus nenaudojant priedų. Kadangi gaminama ekologiška termoizoliacinė medžiaga nepridedant papildomų cheminių medžiagų, stabdančių pelėsinų grybelių augimą, tai esant drėgmės pertekliui, tokios medžiagos gali pasižymėti palankia aplinka mikroorganizmams augti.

1.5. Mikroorganizmai ant termoizoliacinių medžiagų

Mūsų kultūros paveldas yra nuolat veikiamas fizinių, cheminių ir biologinių veiksnių. Pastarieji apima mikroorganizmų sukeltą biologinį skaidymą. Todėl mikroorganizmų, dalyvaujančių biologiniame skaidyme, identifikavimas yra pirmasis būtinas žingsnis norint suprasti mikroorganizmų poveikį istorinio paveldo kultūros vertybėms (Ettenauer, Piñar, Tafer & Sterflinger, 2014).

Ekologiškų medžiagų pavojus yra galimas užteršimas mikroorganizmais (bakterijomis ir grybeliais). Mikroorganizmų augimas ant statybinių medžiagų yra problema, apie kurią seniai žinoma, tačiau pastaraisiais metais ji sulaukė daugiau dėmesio (Sterflinger, Ettenauer & Piñar, 2013). Per pastaruosius dešimtmečius didelis dėmesys skiriamas vidaus oro kokybei. Drėgmės daroma žala pastatams, pavyzdžiui, dėl nepakankamo vėdinimo ar nesandarių stogų, dėl ko vėliau statybinėse medžiagose auga mikroorganizmai, susijusi su daugybe sveikatos padarinių, įskaitant padidėjusią astmos riziką, įvairius kvėpavimo takų ir kitus simptomus (Klamer, Morsing & Husemoen, 2004).

Potvyniai, drėgni metalai, šiluminis gyvenamųjų pastatų modernizavimas, oro kondicionavimo sistemos, konstrukcijų ar medžiagų trūkumai, prasta ir netinkama ventiliacija yra pagrindinės priežastys, dėl kurių padidėja santykinis oro drėgnumas ir paviršių drėgnumas. Šios aplinkos sąlygos skatina mikroorganizmų augimą mūsų gyvenamojoje aplinkoje, ant statybinių medžiagų bei padidina užteršimo grybeliu riziką (Sterflinger et al., 2013).

Grybeliai kolonizuoja įvairius vidaus patalpų paviršius iš celiuliozės, tokius kaip mediena, tapetai ir tekstilė. Celiulioziniai filtrai iš oro kondicionavimo sistemų, turinčių vandens nutekėjimo problemų, gali būti kolonizuojami pelėsių. Labiausiai paplitusios *Acremonium*, *Aspergillus* ir *Cladosporium* rūšys (Price, Simmons, Crow & Ahearn, 2005).

Dažnai atskirų rūšių atskyrimas iš mikroorganizmų grupių yra sudėtingas arba neįmanomas procesas. Dėl sunkumų nustatant tikslines maistines medžiagas, reikalingas jų augimui *in vitro* sąlygomis, nes didelę įtaką daro mikroorganizmų taksonų tarpusavio priklausomybė mišrioje bendruomenėje, kur jos natūraliai gyvena (Mcdonald, Rooks & McCarthy, 2012).

1.6. Mikroorganizmų augimą skatinantys aplinkos veiksniai

Ieškant sprendimo užkirsti kelią grybelių augimui ar jį riboti patalpose svarbu žinoti, kaip tokie parametrai kaip temperatūra, substratas ir drėgmė veikia grybelių augimą. Grybeliai vidaus patalpose iš aplinkos gauna vandens, pavyzdžiui, kondensuojant vandens garus ant santykinai šalto paviršiaus arba dėl atsitiktinio nuotėkio. Santykinė oro drėgmė (SD) (angl. *relative humidity*) patalpose kasdien kinta dėl gyventojų veiklos, pavyzdžiui, maudymosi ar maisto gaminimo. Atlikti moksliniai tyrimai siekiant ištirti grybelių augimą ant apdailos medžiagų, esant apibrėžtoms klimato sąlygoms (Bekker et al., 2015).

Grybelių augimui įtaką daro daugybė abiotinių veiksnių, tokių kaip drėgmė, temperatūra, maistinių medžiagų prieinamumas, deguonis ir pH. Iš šių veiksnių temperatūra ir ypač drėgmė laikomi svarbiausiais, turinčiais įtakos grybelių augimui patalpose. Daugumą patalpų paviršių sudaro porėtos medžiagos, kurios sugeria ir kaupia grybelių augimui reikalingą vandenį. Esant aukšai santykinei drėgmei, ant porėtų medžiagų kaupiasi vandens kondensatas, o tai yra palanki aplinka mikroorganizmų augimui (van Laarhoven, Huinink, & Adan, 2016).

Mažiausias grybeliui reikalingos drėgmės poreikis iš aplinkos paprastai išreiškiamas vandens aktyvumu (a_w) (van Laarhoven et al., 2016). Grybelinė substrato kolonizacija prasideda nuo sporos augimo, kuomet susiformuoja palanki aplinka ir reikalingi mitybos šaltiniai. Išsamiai ištirtas vandens aktyvumo poveikis augimo kinetikai ir tolesniam grybienos augimui (van Laarhoven, Peeters, Bekker, Huinink, & Adan, 2017). Moksliniais tyrimais įrodyta, kad beveik visiems patalpų pelėsiams

optimalios augimo sąlygos SD diapazone yra nuo 90 iki 100 %, taip pat literatūroje teigiama, kad porėtos medžiagos yra paveikiamos pelėsių kolonizacijos, jeigu SD yra mažiau nei 80 % (Bekker et al., 2012).

Santykinės drėgmės poveikio patalpų aplinkai apžvalga rodo, kad santykinė oro drėgmė gali turėti įtakos kvėpavimo takų infekcijų ir alergijų dažnumui. Eksperimentiniai tyrimai, naudojant ore plintančias infekcines bakterijas ir virusus, parodė, kad šių organizmų išgyvenamumas ar užkrečiamumas sumažėja, kai santykinė oro drėgmė yra nuo 40 iki 70 %. Iširtas ryšys tarp kvėpavimo takų infekcijų ir santykinės drėgmės biure, gyvenamoje vietoje ar mokykloje. Nustatyta, kad kvėpavimo takų infekcijų dažnis yra mažesnis tarp žmonių, dirbančių ar gyvenančių vidutinio lygio aplinkoje, palyginus su žema ar didele santykinė drėgme. Grybelių populiacijos dydis patalpose tiesiogiai priklauso nuo santykinės drėgmės. Dauguma grybelių rūšių negali augti, nebent santykinė oro drėgmė viršija 60 % (Arundel, Sterling, Biggin, & Sterling, 1986).

Grybeliai per ore esančias grybelių sporas ir šalutinius medžiagų apykaitos produktus siejami su daugeliu neigiamų padarinių sveikatai, įskaitant alergines reakcijas, padidėjusio jautrumo pneumonitą, mikotoksikozę, patogeninę ligą ir gali būti susiję su sergančio pastato sindromu (SPS) (angl. *sick building syndrome*) (Baughman & Arens, 1996; Kisová et al., 2020). Sergančio pastato sindromas – negalavimai, susiję su žalinga darbo ar gyvenamąja vieta (Sterflinger et al., 2013). Dažniausiai žinomos astmą ir alerginę slogą sukeliančios gentys yra *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* (Baughman & Arens, 1996).

Grybeliams augti reikia vandens, anglies ir azoto, taip pat mažų kiekių kitų maistinių medžiagų, paprastai esančių natūralioje aplinkoje. Įprastos statybinės medžiagos, kuriose yra grybelių naudojamų maistinių medžiagų, yra mediena, celiuliozė, tapetai, organinės izoliacinės medžiagos, tekstilė, klijai ir dažai, turintys angliavandenių ar baltymų. Nors grybeliai negali tiesiogiai naudoti tokių medžiagų kaip metalas, betonas, plastikas, stiklo pluoštas ir kitų sintetinių produktų, jie gali skaidyti medžiagas, kurios yra grybų maistinis šaltinis. Pavyzdžiui, nepaisant oro filtravimo, kai kurios dulkės, kuriose yra gyvų mikroorganizmų, praeina per oro apdorojimo įrenginius ir nusėda porėtuose izoliacijos ortakiuose. Jei ši izoliacinė medžiaga sušlampa, pavyzdžiui, dėl kondensato, grybeliai pradeda augti ir sporuliuoja į ventiliacijos orą (Baughman & Arens, 1996).

1.7. Grybeliai kasdienybėje

Grybai yra mūsų kasdienio gyvenimo dalis. Pavyzdžiui, specifinis prancūziško sūrio Roquefort ar Camembert skonis toks yra dėl šiuose sūriuose esančių grybelių, o sojos pupelių produktams, tokiems kaip miso ir sojos padažui paruošti bei ypatingam skoniui išgauti fermentavimo

proceso metu taip pat naudojamas grybelis. Be to, mielės vaidina svarbų vaidmenį gaminant alkoholinius gėrimus – alų ir vyną. Grybeliai taip pat turi didelę medicininę ir pramoninę svarbą. Pavyzdžiui, *Penicillium* gentis gamina β -laktamo antibiotiką peniciliną. Šio antibiotiko atradimas – vienas svarbiausių žmonijos proveržių gydant infekcijas (Bekker, 2014).

1.8. Grybelių augimas vidaus patalpose

Grybelių augimas vidaus aplinkoje dažnai pastebimas kaip paviršių, tokių kaip lubos ir sienos, spalvos pasikeitimas, tai estetinė problema, dėl kurios kyla didelių išlaidų remontui, techninei priežiūrai ir konstrukcijų atnaujinimui (Bekker, 2014; van Laarhoven, Huinink, Segers, Dijksterhuis, & Adan, 2015). Dar svarbiau, kad grybelių augimas patalpų viduje taip pat gali turėti įtakos gyventojų sveikatai (Bekker, 2014). Pelėsiniai grybeliai geba išskirti sporas ar grybienos fragmentus, kurie gali pakenkti žmonių sveikatai sukeldami alergines reakcijas, kvėpavimo takų infekcijas ar astmą (Bekker et al., 2015; van Laarhoven et al., 2017).

Nuo 2005 m. pasiektas platus sutarimas dėl pelėsių ir drėgmės pastatuose poveikio. Atlikti epidemiologiniai tyrimai Europoje, Kanadoje ir JAV parodė, kad pastato drėgmė ir pelėsis yra susijęs su padidėjusia kvėpavimo simptomų, astmos, rinosinusito, bronchito ir kvėpavimo takų infekcijų rizika. Įkvėptose grybų sporose ir grybienos fragmentuose yra alergenų, grybelinio gliukano ir mažos molekulinės masės toksinų. Drėgnuose pastatuose yra didesnis sporų ir micelinių fragmentų procentas. Dauguma grybelinės biomasės yra smulkūs fragmentai. Nors didžiausios iš šių dalelių plaučių beveik nepasiekia ir neprasiskverbia giliai, tačiau mažos pelėsinų grybelių dalelės atvirkščiai – gali prasiskverbti giliai (Miller & McMullin, 2014).

1.9. Patalpose paplitę mikroorganizmai

Šiame poskyryje apžvelgiamos mikroorganizmų (bakterijų ir grybelių) gentys ir rūšys, dažniausiai aptinkamos vidaus patalpose arba gebančios skaidyti celiuliozę. *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Acremonium*, *Trichoderma* yra grybelių gentys, kurios paprastai nustatomos patalpų aplinkoje vidutiniame klimate. Iš jų *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus* rūšys – labiausiai dominuojantys patalpų grybeliai (Bekker, 2014).

Penicillium filogenetiniu požiūriu priklauso Trichocomaceae šeimai ir šiuo metu šioje gentyje priimtos 354 rūšys. *Penicillium* yra gerai žinomi ir vieni iš labiausiai paplitusių grybelių, pasitaikančių įvairiose buveinėse, pradedant dirvožemiu, baigiant oru, vidaus patalpomis ir įvairiais maisto produktais. Šie grybeliai paplitę visame pasaulyje ir turi didelį ekonominį poveikį žmogaus gyvenimui. Pagrindinė funkcija gamtoje – organinių medžiagų skaidymas. O didžiausias *Penicillium*

pasiekimas – penicilino gamyba, kuri sukėlė perversmą gydant bakterines ligas. Dabar jau praėjo daugiau nei 200 metų, nuo bendrinio pavadinimo *Penicillium*, reiškiančio „teptukas“, įvedimo (Visagie et al., 2014). Įvairūs *Penicillium* mutantų kamienai yra naudojami pramoninių fermentų gamybai (lipazės, pektinazės ir gliukozės oksidazės). Nors kai kurios *Penicillium* rūšys nuo seno žinomos kaip celiulizių ir hemiceliulizių šaltiniai, jų pramoninė gamyba nėra plačiai paplitusi (Gusakov & Sinitsyn, 2012).

Daug *Penicillium* grybelių rūšių yra aptinkamos vidaus patalpose, prie jų priskiriamos ir *P. chrysogenum* bei *P. citreonigrum* (Samson, 2011). *P. citreonigrum* gamina citreoviridiną, kuris yra vienas iš mikotoksinų, užteršiančių įvairiausius žemės ūkio produktus. Toksikologiniais tyrimais įrodyta, kad citreoviridinas žmonėms ir eksperimentiniams gyvūnams gali sukelti ūminį neurotoksinį poveikį, pavyzdžiui, kvėpavimo nepakankamumą, kraujotakos nepakankamumą, paralyžių ir traukulius (Okano, Kobayashi, Izawa, Yoshinari, & Sugita-Konishi, 2020).

Penicillium rubens (ankstenis pavadinimas *Penicillium chrysogenum*) – tipinis grybelis vidaus patalpose, šis grybelis 1991 m. atliekant plataus masto grybelinės floros tyrimą patalpų paviršiuose Nyderlanduose pasirodė esanti vyraujanti rūšis (Bekker, 2014; van Laarhoven et al., 2015). Tai gana gerai ištirta vidaus patalpų rūšis. *P. rubens* dažnai aptinkama ant vandens pažeistų statybinių medžiagų, labiausiai paplitusi ant drėgnų paviršių JAV ir Kanadoje (Bekker et al., 2015; Miller & McMullin, 2014). *Penicillium rubens* yra pramoniniu požiūriu svarbus mikroorganizmas, iš pradžių naudotas β -laktamo antibiotikų gamybai (Pohl et al., 2020). Šis pelėsinis grybelis gamina rokforą C, D ir peniciliną (Houbraken et al., 2012).

Aspergillus genties grybeliai gali būti saprofitiniai, endofitiniai arba elgtis kaip augalų, gyvūnų ir žmogaus patogenai (Cologna et al., 2018). *Aspergillus*, kaip ir *Penicillium*, gamina ilgas, sausas konidijų grandines. *Aspergillus* sporos gali būti žalios, rudos arba juodos, taip pat ir baltos spalvos (Collins, Lyne, Grange, & Falkinham III, 2004). Šie pelėsiniai grybeliai išskiria daug hidrolazių, galinčių degraduoti augalo ląstelės sienelę (Cologna et al., 2018). Keli fermentai susiję su celiuliozės ar ksilano skaidymu. Juodos spalvos *Aspergillus niger* – vienas iš pagrindinių celiuliazės gamintojų (Collins et al., 2004).

Cladosporium genties grybeliai gamina ilgas konidijų grandines, o jų kolonijos pasižymi tamsiai žalia, ruda arba juoda spalva (Collins et al., 2004). Iš literatūros analizės žinoma, kad *Cladosporium tenuissimum* ir *Cladosporium angustisporum* pelėsiniai grybeliai yra veiksmingi celiuliazės gamintojai (Coronado-Ruiz et al., 2018).

Trichoderma yra gijiniai, anamorfiniai grybai, aptinkami dirvožemyje, rizosferoje ir pūvančiose organinėse medžiagose (Cologna et al., 2018). *Trichoderma* genties grybai yra svarbūs, kadangi jie sekretuoja didelius kiekius celiuliazės fermentų, tačiau yra ir šių fermentų negaminančių rūšių (Mukesh Srivastava, 2015). Šie pelėsiniai grybeliai geba skaidyti tokius polisacharidus kaip chitinas, celiuliozė ir hemiceliuliozės (Cologna et al., 2018). Didžiausi celiuliazės gamintojai *Trichoderma* gentyje – *T. harzianum*, *T. reesei* bei *T. viride* (Mukesh Srivastava, 2015).

Taip pat viena iš dažniausiai aptinkamų pelėsinų grybelių genčių vidaus patalpose bei termoizoliacinėse medžiagose – *Acremonium*. *Sarocladium kiliense*, anksčiau žinomas kaip *Acremonium kiliense*, yra visur esantis dirvožemio saprofitas, dažniausiai randamas aplinkoje ir kartais užkrečiantis žmones. Jo patogeniškumas įprastai susijęs su grybelio inokuliacija per atvirą žaizdą, dėl kurios dažnai susidaro granuloma (Bougnoux, Brun, & Zahar, 2018; Fernández-Silva, Capilla, Mayayo, Sutton, & Guarro, 2014). Šis mikroorganizmas apibūdinamas kaip pažeidžiantis plaučius, taip pat micetomos, keratito, odos infekcijos, endoftalmito, endokardito ir su kateteriu susijusios fungemijos priežastis (Bougnoux et al., 2018; Khan et al., 2011; Pérez-Cantero & Guarro, 2020). Optimalus infekcijų gydymas nežinomas, tačiau amfotericinas B, galimai yra efektyviausias vaistas, nors taip pat yra žinoma ir apie nesėkmingą gydymą bei sumažėjusį jautrumą šiam preparatui (Fernández-Silva et al., 2014; Júnior, de Moraes Arantes, Silva, Costa, & Silva, 2013; Khan et al., 2011).

Vidaus patalpų mielės yra gana retos, o dažniausiai aptinkamos *Rhodotorula* (*R. mucilaginosa*), *Sporobolomyces* ir *Cryptococcus* rūšys. Mielės dauginasi vegetatyviškai pumpuravimo būdu (Samson, 2011). *Cryptococcus* rūšys (*C. albidus* ir *C. laurentii*) kartais užkrečia tirpalus, tačiau retai yra patogeniškos, o patogeninė *C. neoformans* sukelia meningitą ir granulomą. *Sporobolomyces* gyvena ant lapų paviršių ir dauginasi balistosporomis, kurios išleidžiamos į orą (Collins et al., 2004). *Rhodotorula* yra bazidiomicetinės (angl. *basidiomycetous*) mielės, priklausančios Cryptococcaceae šeimai (Fung, Martyn, Shahidi, & Brown, 2009; Marova, Certik, & Breierov, 2011; Zajc, Gostinčar, Černoša, & Gunde-Cimerman, 2019). Jos yra plačiai paplitusios aplinkoje ir dažnai išskiriamos iš dirvožemio, žmonių odos, plaučių, šlapimo ir išmatų, kvėpavimo takų bei virškinamojo trakto (Fung et al., 2009; Seifi, Zarei Mahmoudabadi, & Hydrinia, 2013). *Rhodotorula* gentis apima 34 rūšis, iš kurių dažniausios yra: *R. glutinis*, *R. mucilaginosa* ir *R. minuta* (Seifi et al., 2013). Iš literatūros žinoma, kad antifungicidiniai vaistai, tokie kaip amfotericinas B, flukitozinas, nistatinas ir flukonazolas yra naudojami grybelinėms infekcijoms gydyti. Kai kurie iš šių

antigrybelinių vaistų, ypač amfotericinas B ir flukitozinas dažnai parodo aktyvumą prieš *Rhodotorula* *in vitro* (Krzyściak & Macura, 2010; Seifi et al., 2013).

Mokslinės literatūros analizė parodė, kad maždaug pusė *Pantoea agglomerans* bakterijų kamienų geba skaidyti celiuliozę (Shrestha et al., 2007; Torres et al., 2008). Dalies autorių atliktuose tyrimuose teigiama, kad ši bakterija, išskirta iš medyje gyvenančių vabzdžių žarnyno, negeba skaidyti celiuliozės (Delalibera, Handelsman, & Raffa, 2005). Kitų autorių teigimu *P. agglomerans* kamienas, išskirtas iš žirnių (*Lathyrus rnaritimus*) lapų, gamina amilazę ir celiuliazę (Acioly et al., 2017; Khetmalas, Bal, Noble, & Gow, 1996). *Pantoea* gentis priklauso Enterobacteriaceae šeimai. *Pantoea* genties nariai buvo išskirti nuo įvairiausių vietų, įskaitant dirvožemį, vandenį, dulkes, pieno produktus, mėsą, žuvį, vabzdžius, žmones ir gyvūnus (Acioly et al., 2017; Walterson & Stavrinides, 2015). *P. agglomerans* bakterijos gali būti oportunistinių žmogaus infekcijų priežastis, daugiausia dėl žaizdų užkrėtimo augaline medžiaga arba lignoninėje įgyta infekcija (Acioly et al., 2017). Žinoma, kad *P. agglomerans* turi unikalių medžiagų apykaitos galimybių, įskaitant antibiotikų biosintezę (Dutkiewicz, Mackiewicz, Lemieszek, Golec, & Milanowski, 2016). Vieni iš tokių – aglomerinai (angl. *agglomerins*) A, B, C ir D, kurie *in vitro* veikia daugybę anaerobinių bakterijų ir kai kurias aerobines Gram-teigiamas bakterijas (Dutkiewicz et al., 2016; Grimont & Grimont, 2015).

1.10. Grybelių klasifikavimas

Vandens tolerancija

Grybelius galima suskirstyti į dvi grupes, atsižvelgiant į jų augimo galimybes, kai vandens aktyvumas yra 0,85 a_w . Negalintys augti tokiaame arba žemesniame vandens aktyvume vadinami kserofobiniais, o galintys – kserofiliniais grybais. Kserofiliniai grybai apima *Aspergillus*, *Eurotium* ir *Penicillium* gentis. Tik kelios *Penicillium* rūšys gali augti žemiau 0,80 a_w , tarp jų – *P. brevicompactum* ir *P. chrysogenum*. O labiausiai kserofiliškas grybas – *Xeromyces bisporus*, kuris gali augti iki itin mažo 0,61 a_w (Vinnere Pettersson & Leong, 2011).

Konidijų susidarymas

Dauguma grybų dauginasi lytiniu būdu ir jiems būdingas lytinių sporų susidarymas (zigosporos, askosporos ir bazidiosporos), pagal gyvenimo ciklą šiuos organizmus galima klasifikuoti į zigomicetus, askomicetus arba bazidiomicetus. Anamorfinių grybų sporos vadinamos konidijomis, o jas gaminanti konstrukcija – konidijakočiu. Konidijų susidarymas skiriasi tarp skirtingų genčių, o

jų efektyvumą gaminant oru sklindančias sporas daugiausia lemia konidijų susidarymo būdas (Samson, 2011). Pagal konidijų ir sporų susidarymą patalpų mikrobiota klasifikuojama:

- konidijos gaminamos kaip sausos pavienės sporos arba grandinės. Šie grybeliai dažni ore, nes gamina daugybę konidijų, kurios lengvai patenka į orą. Jie gali augti drėgnoje aplinkoje, tačiau tipiška yra kserotolerantiškos ir kserofilinės rūšys. Šiai grupei priklauso *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Wallemia*, *Alternaria*, *Ulocladium*, *Cladosporium* gentys;
- konidijos gaminamos drėgnose ar gleivėtose galvose. Paprastai šie grybai nėra lengvai randami oro mėginiuose, nes konidijos sulimpa drėgnoje ar gleivėtoje galvoje. Tipiniai atstovai: *Stachybotrys*, *Acremonium*, *Trichoderma*, *Aureobasidium* ir *Fusarium*. Šių grybelių buvimas rodo, kad vanduo yra lengvai pasiekiamas, pavyzdžiui, vonios kambariuose;
- konidijos arba sporos, susidarančios vaisiakūniuose. Yra tik keletas vidaus patalpų grybelių, tokių kaip *Phoma*, kur vaisiakūnyje susidaro konidijos (Samson, 2011).

1.11. Celiuliozės skaidymas

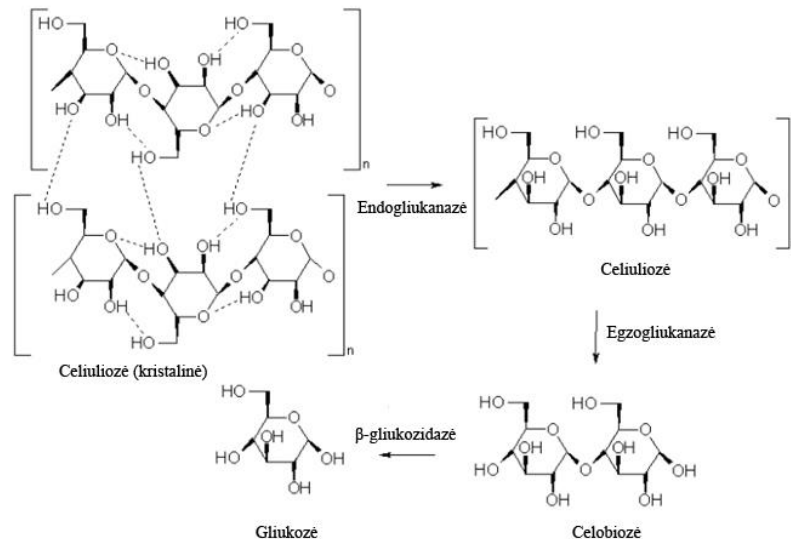
Celiuliozė yra viena iš gausiausių žemėje esančių biomasės formų ir laikoma neišsenkančiu įvairių produktų žaliavų šaltiniu (Gohel, Contractor, Ghosh, & Braganza, 2014; Zapata, Galviz-Quezada, & Osorio-Echeverri, 2018). Tai gamtinis polisacharidas, susidedantis iš linijinės grandinės, kurią sudaro nuo kelių šimtų iki tūkstančių β -1-4 jungtimi sujungtų D-gliukozės vienetų (Abedin, 2015; Zapata et al., 2018). Šio polisacharido gausu tokiose medžiagose kaip žemės ūkio, komunalinėse atliekose bei miško liekanose. Celiuliozės biomasės hidrolizė fermentinės, o ne cheminės reakcijos būdu, yra pageidaujamas metodas, nes fermentiniame procese nėra cukraus skaidymo (Legodi, La Grange, Van Rensburg, & Ncube, 2019). Patikimas celiuliozės panaudojimo būdas prasideda celiuliozės suskaidymu į mažesnius oligosacharidus arba monosacharidus (Gohel et al., 2014).

Celiuliazės – hidrolazių klasei priklausančios fermentai, turintys skirtingus specifiskumus, siekiant katalizuoti gliukozidinių jungčių hidrolizę celiuliozės viduje (Chinedu, Okochi, & Omidiji, 2011; Gohel et al., 2014; Legodi et al., 2019). Celiuliazės skirstomos į tris pagrindines grupes:

- Endogliukanazės (endo-1,4- β -gliukanazės, EC 3.2.1.4) atsitiktinai hidrolizuoja celiuliozės ties β -1-4 glikozidine jungtimi, taip gaunamos skirtingo ilgio oligosacharidų grandinės (Gohel et al., 2014; Legodi et al., 2019).
- Celobiohidrolazės arba egzogliukanazės (egzo-1,4- β -gliukanazės, EC 3.2.1.91) skaldo oligosacharidų grandines nuo redukuotų arba neredukuotų galų, siekiant atpalaiduoti

atitinkamai gliukozę (gliukohidrolazė) arba celobiozę (celobiohidrolazė) (Legodi et al., 2019; Quintero, Rincón, & Cardona, 2011).

- β -gliukozidazės (β -D-gliukozido gliukohidrolazės, EC 3.2.1.21) hidrolizuoja β -1-4 jungtį disachariduose (celobiozėje) siekiant atpalaiduoti gliukozės molekules (Legodi et al., 2019).



2 pav. Celiuliozės hidrolizės schema, parengta remiantis (Abedin, 2015)

Antrame paveiksle pavaizduota celiuliazinių fermentų katalizuojama celiuliozės skaidymo schema. Sinergetiškai veikdamos celiuliazės (endogliukanazė, egzogliukanazė ir β -gliukozidazė) celiuliozę hidrolizuoja iki gliukozės molekulių.

Bendroji celiuliazė yra aktyvumas, susijęs su minėtų fermentų sinergetiniais veiksmiais, o aktyvumas matuojamas tokiais substratais, kaip Whatman No. 1 filtrinis popierius, mikrokristalinė celiuliozė ar karboksimetilceliuliozė (Legodi et al., 2019).

Nors daugybė mikroorganizmų sugeba skaidyti celiuliozę, tik nedaugelis iš jų gamina reikšmingą kiekį fermentų, galinčių visiškai hidrolizuoti celiuliozę *in vitro* (Chinedu et al., 2011). Tarp grybelių žymiausi komerciniai celiuliazės gamintojai yra *Trichoderma*, *Aspergillus* ir *Penicillium* gentys (Chinedu et al., 2011; Damaso et al., 2012).

1.12. Krakmolo skaidymas

Kraskmolas yra pagrindinis atsarginis angliavandenis visuose aukštesniuose augaluose vandenyje netirpių granulių pavidalu. Tai heterogeninis polisacharidas, susidedantis iš dviejų didelės molekulinės masės komponentų – amilozės ir amilopektino (Sandhu, Vilku, & Soni, 1987). Krakmolą gali būti hidrolizuojamas cheminiais ar fermentiniais metodais, todėl norint veiksmingai

jį paversti mažesnės molekulinės masės produktais, tokiais kaip dekstrinai, maltozė ir gliukozė, reikia įvairių fermentų (Ana et al., 2015). Mikroorganizmai yra svarbūs fermentų gamybos šaltiniai dėl didelio gamybos pajėgumo, mažos kainos bei polinkio į genetines manipuliacijas (Barman & Dkhar, 2015). Pastaraisiais metais galimybė naudoti mikroorganizmus kaip pramoniniu požiūriu svarbių fermentų biotechnologinius šaltinius paskatino susidomėjimą mikroorganizmų fermentinio aktyvumo tyrimais (Sakthi, Kanchana, Saranraj, & Usharani, 2012). Mokslinėje literatūroje minima, kad mikrobinės amilazės krakmolo perdirbimo pramonėje sėkmingai pakeitė cheminę krakmolo hidrolizę (Saranraj & Stella, 2013).

1894 metais pramoniniu būdu pagamintas pirmasis fermentas – amilazė iš grybelio, šis fermentas buvo naudojamas virškinimo sutrikimams gydyti (Sakthi et al., 2012; Saranraj & Stella, 2013). Amilazės fermentai yra vieni iš svarbiausių fermentų, hidrolizuojančių krakmolą, siekiant suardyti glikozidinius ryšius nuo neredukuojančio galo (egzo- veikiantys fermentai) arba iš vidaus (endo- veikiantys fermentai) ir taip gauti įvairius produktus, įskaitant dekstrinus, maltozę ir gliukozę (Shoa, 2019; Sujeeta, Malik, Mehta, & Sihag, 2017). Šie fermentai yra naudingi alaus, tekstilės, popieriaus, ploviklių ir farmacijos pramonėje. Jie taip pat naudojami maltozės, oligosacharidų mišinių ir fruktozės sirupo gamybai (Shoa, 2019).

Amilolitiniai fermentai susideda iš trijų pagrindinių pogrupių ir nors visi šie fermentai geba hidrolizuoti α -gliukozidinius ryšius krakmole, jie turi struktūrinius ir katalizinius skirtumus (Carrasco et al., 2016). Amilazių grupės:

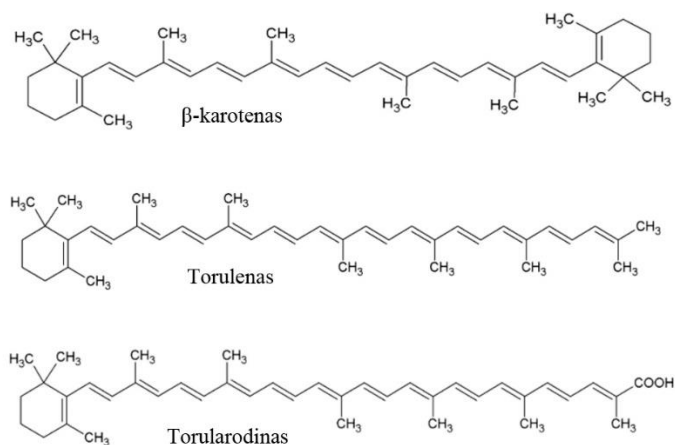
- α -amilazė (1,4- α -D-gliukano gliukanohidrolazė, EC 3.2.1.1) tai endoamilazė, kuri atsitiktiniu būdu hidrolizuoja α -1,4 glikozidinius ryšius krakmolo polimero vidinėje dalyje. Taip susidaro skirtingo grandinės ilgio linijiniai ir šakoti oligosacharidai (maltotriozė, dekstrinai) bei maltozė ir gliukozė (Mojsov, 2016; Sujeeta et al., 2017).
- β -amilazė (1,4- α -D-gliukano maltohidrolazė, EC 3.2.1.2) yra egzoamilazė, kuri veikdama nuo neredukuoto galo katalizuoja antrosios α -1,4 glikozidinės jungties hidrolizę, vienu metu atskirdama du gliukozės vienetus – maltozę (Mojsov, 2016; Saranraj & Stella, 2013). Bręstant vaisiams, β -amilazė krakmolą skaido į maltozę, todėl gaunamas saldus prinokusių vaisių skonis (Saranraj & Stella, 2013).
- γ -amilazė (gliukoamilazė, EC 3.2.1.3) – egzoamilazė, hidrolizuojanti α -1,4 ir α -1,6 glikozidinius ryšius nuo išorinių amilozės ir amilopektino gliukozės liekanų nuo neredukuoto galo, o reakcijos produktas yra gliukozė (Mojsov, 2016).

Visus minėtus fermentus gamina augalai, grybai bei bakterijos, o α -amilazę ir γ -amilazę dar sintetina ir gyvūnai (Benjamin et al., 2013). Šiai dienai komerciškai prieinama daugybė mikrobinių amilazių, kurios beveik visiškai pakeitė cheminę krakmolo hidrolizę krakmolo perdirbimo pramonėje. Amilazę galima gauti iš keleto grybų, mielių, bakterijų ir aktinomicetų, tačiau ypač grybai sulaukė daug dėmesio dėl prieinamumo ir didelio produktyvumo. Tyrimais įrodyta, kad grybelinės kilmės amilazės yra stabilesnės už bakterines (Sujeeta et al., 2017).

Dauguma amilazių pagamintos iš dirvožemio grybų, tokių kaip *Aspergillus*, *Penicillium* ir *Rhizopus* (Sunitha, Ramesha, Savitha, & Srinivas, 2012). Marlida ir kt. atliko tyrimą ir nustatė skirtingus neapdorotą krakmolą skaidančius ir amilazę gaminančius endofitinius grybus, tokius kaip *Gibberella pulicaris*, *Acremonium* sp., *Synnematous* sp. ir *Nodilusporium* sp. (Marlida, Saari, Hassan, & Radu, 2000). Kitų autorių atliktame tyrime pranešama, kad grybų (*Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Acremonium* ir *Fusarium*) ir bakterijų (*Bacillus*, *Pseudomonas* ir *Streptomyces*) gentys, išskirtos iš lignoceluliozės atliekų kompostavimo, yra potencialūs mikroorganizmai fermentų gamybai (Robledo-Mahón, Calvo, & Aranda, 2020). Taip pat irodyta, kad kelios mielių rūšys naudoja krakmolą kaip anglies ir energijos šaltinį bei gamina amilazes (Sandhu et al., 1987).

1.13. Karotenoidai

Karotenoidai – natūralūs riebaluose tirpūs pigmentai, kuriuos sintetina įvairūs mikroorganizmai ir augalai. Karotenoidai yra patraukli alternatyva sintetiniams maisto dažikliams (Martínez, Delso, Angulo, Álvarez, & Raso, 2018). Dauguma karotenoidų yra C₄₀ terpenoidai, kurie veikia kaip membraną apsaugantys antioksidantai, šalinantys O₂ ir peroksilo radikalus (Kot, Błażej, Gientka, Kieliszek, & Bryś, 2018; Mata-Gómez, Montanez, Zavala, & Aguilar, 2014). Pagal struktūrą karotenoidai skirstomi į karotenus ir ksantofilus. Karoteno grandinę sudaro anglis ir vandenilis (β -karotenas, torulenas), o ksantofilai papildomai turi deguonį funkcinėje grupėje kaip hidroksi-, oksio- arba karboksi- grupę (astaksantinas, kataksantinas, torularodinas) (Tkáčová, Furdíková, Klempová, Ďurčanská, & Certik, 2015). Manoma, kad svarbiausia karotenoidų struktūrinė charakteristika yra jų konjuguoti dvigubi ryšiai, kurie daugiausia lemia jų fizikines ir chemines savybes. Jie atsakingi už daugumos karotenoidų spalvą (spalvotam karotenoidui gauti reikalingi mažiausiai septyni konjuguoti dvigubi ryšiai) (Rapoport et al., 2021). Karotenoidams būdinga geltona, oranžinė ir raudona spalva (Zhao, Guo, Xia, Zhuang, & Chu, 2019).



3 pav. Struktūrinės β -karoteno, toruleno ir torularodino formulės, remiantis (Rapoport et al., 2021)

β -karoteno ($C_{40}H_{56}$) molekulė susideda iš dviejų β -jononų žiedų, sujungtų polieno grandine, kurioje yra devyni konjuguoti dvigubi ryšiai (žr. 3 pav.). Dėl β -karoteno struktūros ir dvigubų jungčių sistemos šis junginys pasižymi oranžine spalva (Rapoport et al., 2021). β -karotenas naudojamas kaip maisto dažiklis arba kaip maisto papildas, veikiantis kaip provitaminas A. Jis taip pat dedamas į sultis ir gėrimus, sviestą, margariną ir sūrį (Mata-Gómez et al., 2014). Torulenas ($C_{40}H_{54}$, 3',4'-didehidro- β , γ -karotenas) priklauso karotenų grupei (Mata-Gómez et al., 2014; Rapoport et al., 2021). Toruleno molekulė susideda iš vieno β -jonono žiedo ir polieno grandinės, kurioje yra 12 konjuguotų dvigubų jungčių (žr. 3 paveikslą). Torulenas turi antioksidacinių ir priešvėžinių savybių. Torularodino ($C_{40}H_{52}O_2$, 3', 4'-didehidro- β , γ -karoteno-16-rūgštis) struktūra panaši į toruleno. Vienintelis skirtumas – karboksilo grupė polieno grandinės gale (žr. 3 pav.). Dėl šios priežasties torularodinas priklauso ksantofilų grupei (Rapoport et al., 2021). Torularodinas pasižymi dideliu antioksidaciniu aktyvumu, kuris padeda stabilizuoti membranas stresinėmis sąlygomis (Zoz, Carvalho, Soccol, Casagrande, & Cardoso, 2015). Dėl trylikos dvigubų jungčių, torulenas ir torularodinas pasižymi stipriomis antioksidacinėmis savybėmis (Kot et al., 2018). Antioksidacinės savybės priskiriamos konjuguotai dvigubo ryšio sistemai. Minėti junginiai pasižymi didesniu antioksidaciniu veiksmingumu nei β -karotenas, kurio cheminėje struktūroje yra mažiau dvigubųjų jungčių (Mata-Gómez et al., 2014). Atsižvelgiant į toruleno ir torularodino koncentracijas, jie yra rausvai raudonos spalvos (Kot et al., 2018).

Gyvūnuose karotenoidai atlieka svarbias biologines funkcijas dėl provitamino A ir antioksidacinių savybių, o tai naudinga sveikatai – sustiprėja imuninė sistema ir sumažėja vėžio bei degeneracinių ligų rizika (Martínez et al., 2018). Šiais laikais pigmentai dažniausiai gaminami chemiškai, tačiau visuomenės sąmoningumas ir šiuolaikinių vartotojų neigiamai vertinami sintetiniai

maisto dažikliai sukėlė didelį susidomėjimą natūraliomis dažymo alternatyvomis. Kaip potencialūs natūralių pigmentų šaltiniai svarstomi mikroorganizmai, kadangi jie geba pasiekti didelę išeigą augdami nebrangiuose substratuose. Šiuo metu karotenoidai komerciškai naudojami kaip pašarų priedai, natūralūs maisto dažikliai, maisto papildai, o pastaruoju metu – farmacijos reikmėms skirti maisto produktai. Nors sintetinės formos yra pigesnės, mikrobiniai karotenoidai turi pranašumą produkuodami natūralius izomerus, kurie pasirodė esą geresni maistinės ir terapinės vertės atžvilgiu (Martínez, Delso, Álvarez, & Raso, 2020).

Tokie mikroorganizmai kaip mielės, grybeliai, bakterijos bei dumbliai geba gaminti karotenoidus (Al-Turki, Al-Hassan, & M.M., 2016; Tkáčová et al., 2015). Mielių karotenoidų gamintojus daugiausia atstovauja *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* ir *Rhodosporidium* rūšys, kurios gamina karotenoidinius pigmentus, tokius kaip β -karotenas, torulenas ir torularodinas (Libkind et al., 2004; Tkáčová et al., 2015; Zhao et al., 2019). *Rhodotorula mucilaginosa* (anksčiau vadinta *Rhodotorula rubra*) mielės laikomos vertingu karotenoidų šaltiniu ir yra potencialiai perspektyvus komercinis mikroorganizmas karotenoidų gamybai (Al-Turki et al., 2016; Fung et al., 2009; Q. Wang, Liu, Yang, & Wang, 2017). Šioms mielėms būdingas karotenoido torularodino – pigmento, kuris jų kolonijoms suteikia tipiską spalvą nuo rožinės iki koralų raudonos, gamyba (iš čia ir kilęs bendrasis pavadinimas „raudonosios mielės“) (Fung et al., 2009).

Karotenoidų gamyba raudonosiose mielėse turi pranašumų prieš kitus mikroorganizmus: prisitaikymas prie skirtingų aplinkos sąlygų, augimas esant įvairiems anglies ir azoto šaltiniams, didelis specifinis augimo greitis ir didelių kiekių ląstelių biomasės gamyba (Martínez, Schottroff, et al., 2020). Tačiau, kadangi mielių gaminami karotenoidai sintetinami ląstelėje ir lieka jos viduje, norint juos naudoti komerciškai, reikia efektyvių ekstrakcijos metodų (Martínez et al., 2018; Martínez, Schottroff, et al., 2020).

Įrodyta, kad efektyvus mielių ląstelių sienelių suardymas cheminėmis ar mechaninėmis procedūromis palengvina tirpiklių patekimą į ląstelę, siekiant ištirpinti viduląstelinius karotenoidus ir pagerinti karotenoidų ekstrakcijos išeigą (Martínez et al., 2018). Todėl prieš ekstrakciją ar jos metu atliekamos skirtingos fizikinės procedūros (terminis apdorojimas, ultragarsas, aukšto slėgio homogenizavimas, rutuliukų malimas) siekiant palengvinti tirpiklių patekimą į ląstelę ir vėlesnį karotenoidų tirpinimą, taip pagerinant gavybos našumą (Martínez et al., 2018; Martínez, Schottroff, et al., 2020).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Naudoti prietaisai ir medžiagos

2.1.1. Naudoti prietaisai

- Autoklavas Steriltechnik AG LABOKLAV ECO 135
- Automatinės pipetės Eppendorf Research Plus: 10, 20, 200, 1000
- Centrifugos: Sigma 2-16KL ir Eppendorf Centrifuge 5418-R
- Elektroforezės aparatas Consort EV261 ir jo priedas Cleaver Scientific MultiSUB Midi
- Gelių dokumentavimo sistema DNR Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro 16mm ir programinė įranga GelCapture
- Inkubatoriai: Friocell ir Thermo Fisher Scientific
- Inkubatorius-purtyklė Eppendorf New Brunswick Innova 44
- Laboratorinis šaldiklis SKADI DF 8520 Upright
- Laminarinis boksas Scanlaf Mars Safety Classe 2 Mars 1500
- Magnetinė maišyklė su kaitinimu IKA C-MAG HS 7
- Mikrobangų krosnelė SHARP R-200 BKW
- Mikroskopas Olympus CX41
- Mikroskopo kamera Olympus U-TV1X-2/U-CMAD3 ir PixelINK uScope programinė įranga
- Mini centrifuga NIPPON Genetics EUROPE FastGene NG002B
- Spektrofotometrai: Merck Spectroquant Pharo 10 ir Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis
- Spiritinė lemputė
- Stiklinis glaistytuvas
- Sukūriniai maišytuvai: Scientific Industries Vortex Genie 2 G560E ir Biosan Multi-Vortex V-32
- Svarstyklės: KERN EG 220-2NM ir KERN EG 420
- Šaldytuvai: Snaigė FR240-1101AA ir Whirlpool ARC 2353
- Termocikleris Biometra T-Personal 48
- Termomikseris Eppendorf Thermomixer Comfort 1,5 ml
- Ultragarsinis dezintegratorius, Cole-Parmer
- Vandens vonia GFL 1083

2.1.2. Naudotos medžiagos ir rinkiniai

- 3,5-Dinitrosalicilo rūgštis, Alfa Aesar
- „6x DNA Loading Dye“ dažas, Thermo Fisher Scientific
- 10 X DreamTaq buferinis tirpalas, Thermo Fisher Scientific
- 50x TAE elektroforezės buferinis tirpalas, Fermentas
- Agaras, Formedium
- Agarozės tabletės TopVision, Thermo Fisher Scientific
- Ampicilinas, Balkanpharma
- Amfotericinas B, Sigma Aldrich
- *Bacillus subtilis* kamienas, Vilnius Tech Chemijos ir bioinžinerijos katedra
- Cinko sulfato heptahidratas ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Reachim
- Citrinos rūgšties monohidratas, Reachim
- D-(+)-maltozė, Reachim
- Dietileteris, Honeywell Fluka
- „Difco Sabouraud Dextrose Agar“, Becton Dickinson
- Dimetilsulfoksidas, Honeywell
- Distiliuotas vanduo
- dNTP mišinys, 2mM, Thermo Fisher Scientific
- Etanolis 96%, MV Group Production, Stumbras
- Etidžio bromidas, Sigma Aldrich
- *Escherichia coli* kamienas DH10β, Vilnius Tech Chemijos ir bioinžinerijos katedra
- Geležies (II) sulfato heptahidratas ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Reachim
- „GeneJET PCR Purification Kit“, Thermo Fisher Scientific
- „GeneRuler Ladder Mix“ markeris, Thermo Fisher Scientific
- Glicerolis, Reachim
- Gliukozė, Sigma Aldrich
- Heksanas, Honeywell
- Jodas, Reachim
- Kalcio chloridas, ROTH
- Kalio jodidas, Reachim
- Kalio natrio tartratas ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), Reachim

- Kalio permanganatas, ROTH
- Karboksimetilceliuliozės natrio druska, ROTH
- Kongo raudonasis, ROTH
- Krakmolas, Amilina
- Magnio sulfato heptahidratas ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Reachim
- Mielių ekstraktas, Sigma Aldrich
- Natrio chloridas, ROTH
- Natrio citrato dihidratas, Reachim
- Natrio hidroksidas, Sigma Aldrich
- Natrio nitratas, Reachim
- Peptonas, Sigma Aldrich
- PDA, neoFroxx
- Pradmenys universalūs bakteriniai, Metabion International AG:
Priekinis W001 (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTC-3')
Atvirkštinis W002 (5'-GNTACCTTGTTACGACTT-3')
- Pradmenys grybelių, Sigma Aldrich:
Priekinis ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA -3')
Atvirkštinis ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC -3')
- *Pseudomonas putida* laukinis kamienas, Vilnius Tech Chemijos ir bioinžinerijos katedra
- „PureLink Microbiome DNA Purification Kit“ (soil samples), Invitrogen
- Sacharozė, Reachim
- Salyklo ekstraktas, Sigma Aldrich
- Vanduo be nukleazių, Thermo Fisher Scientific.
- Vario sulfato pentahidratas ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), Reachim

2.1.3. Naudotos terpės

- Luria-Betrani (LB) terpė (1 litrai): peptonas 10 g, mielių ekstraktas 5 g, natrio chloridas (NaCl) 10 g. pH 7,0-7,2, distiliuotas vanduo 1000 ml.
- LB agarizuota terpė (1 litrai): peptonas 10 g, mielių ekstraktas 5 g, natrio chloridas 10 g, agaras 20 g. pH 7,0-7,2, distiliuotas vanduo 1000 ml.
- Bulvių dekstrozės (PDA) agarizuota terpė (1 litrai): PDA 39 g ir distiliuotas vanduo 1000 ml.

- Kazeino agarizuota terpė (1 litrui): peptonas 1 g, mėsos ekstraktas 1 g, gliukozė 1 g, agaras 12 g, distiliuotas vanduo 1000 ml.
- Čapeko (CZ) terpė (1 litrui): Čapeko koncentratas 10 ml, sacharozė 30 g, mikroelementų pradinis tirpalas 0,4 ml ir distiliuotas vanduo 1000 ml.
 - Čapeko koncentratas (100 ml): NaNO_3 30 g, KCl 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g, distiliuotas vanduo 100 ml. Gera sumaišoma ir laikoma šaltai.
 - Mikroelementų pradinis tirpalas (100 ml): $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g, distiliuotas vanduo 100 ml. Gera sumaišoma ir tirpalas laikomas šaltai.
- CZ agarizuota terpė (1 litrui): Čapeko koncentratas 10 ml, sacharozė 30 g, mikroelementų pradinis tirpalas 0,4 ml, agaras 20 g, distiliuotas vanduo 1000 ml.
- Karboksimetilceliuliozės (CMC) terpė (1 litras): karboksimetilceliuliozės natrio druska 5 g, NaNO_3 1 g, K_2HPO_4 1,8 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,9 g, KCl 0,5 g ir 1000 ml distiliuotas vanduo.
- CMC agarizuota terpė (1 litras): karboksimetilceliuliozės natrio druska 5 g, NaNO_3 1 g, K_2HPO_4 1,8 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,9 g, KCl 0,5 g, agaras 20 g ir 1000 ml distiliuotas vanduo.
- Krakmolo agarizuota terpė (1 litrui): krakmolas 10 g, mėsos ekstraktas 3 g, agaras 12 g ir distiliuotas vanduo 1000 ml.
- Mielių ekstrakto peptono dekstrozės (YEPD) terpė (1 litrui): mielių ekstraktas 10 g, peptonas 20 g, distiliuotas vanduo 900 ml. Autoklavuojama 15 minučių 1 atm. slėgyje, 121 °C temperatūroje. Po to pridedama sterilios gliukozės tirpalo 100 ml.
 - Sterilios gliukozės tirpalas (100 ml): gliukozė 22 g ir distiliuotas vanduo 100 ml, sterilinama per švirkštą, laikoma šaltai.
- YEPD agarizuota terpė (1 litrui): mielių ekstraktas 10 g, peptonas 20 g, agaras 20g, distiliuotas vanduo 900 ml. Autoklavuojama 15 minučių 1 atm. slėgyje, 121 °C temperatūroje. Po to pridedama sterilios gliukozės tirpalo 100 ml.
- YM agarizuota terpė (1 litrui): gliukozė 10g, peptonas 5 g, mielių ekstraktas 3g, slyklo ekstraktas 3g, agaras 15 g ir distiliuotas vanduo 1000 ml.
- Saburo (SDA) agarizuota terpė (1 litrui): Difco Sabouraud Dextrose Agar 65 g ir distiliuotas vanduo 1000 ml.
- Salyklo dekstrozė (MEA) agarizuota terpė (1 litrui): salyklo ekstraktas 50 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,005 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g, distiliuotas vanduo 1000 ml.

Visos minėtos terpės autoklavuojamos 15 minučių 1 atm. slėgyje, 121 °C temperatūroje.

2.2. Naudoti metodai

2.2.1. Mėginio paruošimas

Gauta gamtinė termoizoliacinė medžiaga, pagaminta iš perdirbto popieriaus, nenaudojant rišiklio. Pirmiausia su fiziologiniu 0,9 % NaCl tirpalu padaromos nuoplovos tiesiogiai nuo minėtos termoizoliacinės medžiagos, kurios paviršių kolonizavusi mikroorganizmų bendrija. Gautos nuoplovos naudojamos bendrosios gDNR išskyrimui.

2.2.2. Bendrosios genominės DNR išskyrimas

Genominės DNR išskyrimui naudojamas „PureLink Microbiome DNA Purification Kit“ rinkinys pagal gamintojo nurodytus reikalavimus.

2.2.3. Mikroorganizmų išskyrimas iki pavienių kultūrų

Nežinomi mikroorganizmai pasėjami ant LB, YEPD, YM, CZ, SDA, PDA bei MEA terpių. Mikroorganizmai persėjami kelis kartus, jeigu reikalinga atliekami skiedimai, mėginiai vėl persėjami, kol gaunamos pavienės kolonijos.

2.2.4. Polimerazinė grandininė reakcija

Pirmiausia mikroorganizmai paruošiami prieš atliekant polimerazinę grandininę reakciją:

- Bakterijų naktinė kultūra: į 15 ml centrifuginį mėgintuvėlį įpilama 3 ml LB terpės ir vienkartinė kilpele inokuliuojama pavienė kolonija, inkubuojama 37 °C temperatūroje, 16-18 valandų purtant termostatuojamoje vandens vonioje. PGR reakcijai naudojamas 1 µl.
- Mielės: vienkartinė kilpele paimama pusė kolonijos ir inokuliuojama į PGR mišinį, o kita tos pačios kolonijos pusė – pasėjama ant agarizuotos YM terpės ir vėliau bus naudojama siekiant mieliagrybį išsaugoti.
- Pelėsiniai grybeliai: į Eppendorf mėgintuvėlį įpilama 200 µl distiliuoto vandens, vienkartinė kilpele perbraukiama per pelėsinio grybelio kolonijos paviršių, mėgintuvėliai šildomi 95 °C temperatūroje vandens vonioje 5 minutes, tada centrifuguojami 8000 rpm 2 min. 1 µl supernatanto naudojamas PGR reakcijai.

Polimerazinė grandininė reakcija (PGR) yra greitas, santykinai nebrangus, paprastas, jautrus *in vitro* metodas, skirtas amplifikuoti DNR fragmentus. Grybeliams specifinės ITS srities (ITS1-5.8S-ITS2) amplifikacija atlikta PGR metodu, naudojant ITS-1F ir ITS-4 pradmenis (White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990). 16S rRNR koduojantis genas amplifikuotas naudojant universalius bakterinius pradmenis W001 ir W002 (Godon, Zumstein, Dabert, Habouzit, & Moletta, 1997). Reakcijai naudota

DreamTaq DNR polimerazė, kuri yra termostabili. Tai patobulinta Taq DNR polimerazė ir užtikrina didesnę jautrumą negu pastaroji.

Pagal protokolą:

1. Reikiami komponentai yra atšildomi, vorteksuojami ir centrifuguojami mini centrifugoje.

Reakcija vykdoma ledo vonioje, supilami komponentai 50 μ l PGR mišiniui:

- 10x DreamTaq buferinis tirpalas 5 μ l
- 2mM dNTP mišinys, 5 μ l
- Tiesioginis pradmuo 0,5 μ l
- Atvirkštinis pradmuo 0,5 μ l
- Mėginio DNR 1 μ l
- DreamTaq DNR polimerazė 0,5 μ l
- Vanduo be nukleazijų 37,5 μ l

2. Pagamintas PGR mišinys švelniai vorteksuojamas ir centrifuguojamas.

3. Sumaišytas mišinys dedamas į termociklerį, nustatoma PGR programa, kurios sąlygos:

- a. Naudojant grybeliams specifinius ITS1F ir ITS4 pradmenis:

- Pradinė denatūracija 94 °C temperatūroje vykdoma 1 minutę.
 - Denatūracija 94 °C temperatūroje vyksta 1 minutę.
 - Pradmenų prilydymas 51 °C temperatūroje 1 minutę.
 - DNR sintezė 72 °C temperatūroje 1 minutę.
 - Galutinė DNR sintezė vykdoma 72 °C temperatūroje 8 minutes.
 - Laikoma 10 minučių 10 °C temperatūroje.
- } 35 ciklai

- b. Naudojant universalius bakterinius W001 ir W002 pradmenis:

- Pradinė denatūracija 95 °C temperatūroje vykdoma 3 minutes.
 - Denatūracija 94 °C temperatūroje vyksta 30 sekundžių.
 - Pradmenų prilydymas 53 °C temperatūroje 30 sekundžių.
 - DNR sintezė 72 °C temperatūroje 2 minutes.
 - Galutinė DNR sintezė vykdoma 72 °C temperatūroje 10 minučių.
 - Laikoma 10 minučių 16 °C temperatūroje.
- } 30 ciklų

4. Po PGR reakcijos gautas PGR mišinys yra tikrinamas elektroforezės būdu.

2.2.5. DNR elektroforezė agarozės gelyje

Paruošiamas elektroforezės buferis: įpilama 10 ml 50x TAE elektroforezės buferinio tirpalo bei distiliuoto vandens iki 500 ml, iš paruošto buferio 450 ml supilama į elektroforezės vonelę. Į likusius 50 ml elektroforezės buferio įdedama agarozės tabletė, 10-15 minučių tirpinama kambario temperatūroje, tada ištirpinama kaitinant, taip paruošiamas 1 % agarozės gelis. Gautas tirpalas atvėsinaamas iki 50-60 °C temperatūros, pilamas į parengtą formą, įstatomos „šukos“ ir laukiama 10-15 minučių kol gelis sustings. Ištraukus „šukas“ gelis perkeliamas į elektroforezės vonelę. 5 µl PGR mišinio sumaišoma su 1 µl 6x DNA Loading Dye dažu ir 5 µl leidžiami į šulinėlį. Į sekantį šulinėlį – 5 µl GeneRuler Ladder Mix markerio. Elektroforezės sąlygos: 130 A, 130 V, 300 W ir vykdoma 45 minutes. Pasibaigus elektroforezei išjungiamas srovės šaltinis, gelis išimamas iš elektroforezės vonelės ir įdedamas į vonelę su 0,5 ml/l etidžio bromido tirpalu, laikomas 10-15 minučių. Gelis detektuojamas UV šviesoje, naudojama gelių dokumentavimo sistema DNR Bio-Imaging Systems (MiniBIS Pro 16 mm aparatas) ir analizuojama naudojant GelCapture programinę įrangą.

2.2.6. PGR produkto gryninimas iš PGR mišinio

PGR produktas gryninamas naudojant „GeneJET PCR Purification Kit“ rinkinį pagal nurodytą gamintojo protokolą. Patikrinama elektroforezės būdu.

2.2.7. Mikroorganizmų išsaugojimas

Šiame skyrelyje aprašomas mikroorganizmų paruošimas ilgalaikiam saugojimui.

- Bakterijų išsaugojimas: paruošta naktinė bakterijų kultūra naudojama mikroorganizmo išsaugojimui glicerolyje (galutinė koncentracija 30 %).
- Mielių išsaugojimas: kaip minėta anksčiau, pusė kolonijos pasėjama ant YM terpės (kita pusė naudojama PGR reakcijoje). Tada užaugusi kolonija paimama vienkartinė kilpele ir inokuliuojama 250 ml auginimo kolboje, turinčioje 100 ml skystos YEPD terpės, auginama 24 valandas inkubatoriuje-purtyklėje. Išsaugojimui mėginys supilstomas į 50 ml centrifuginius mėgintuvėlius, centrifuguojama 5000 rpm 10 minučių, supernatantas nupilamas, pridedama 10 ml 0,9 % NaCl tirpalo, vėl centrifuguojama. Nupilamas supernatantas, dar kartą pridedama NaCl, centrifuguojama, nupilamas supernatantas, nuosėdos suspenduojamos 2,5 ml NaCl bei pridedama glicerolio iki galutinės 30 % koncentracijos.
- Pelėsių išsaugojimas: vienkartinė kilpele perbraukiama per pelėsinio grybelio kolonijos paviršių ir inokuliuojama glicerolyje, kurio galutinė koncentracija 30 %.

2.2.8. Mikroskopavimas

2.2.8.1. Bakterijų mikroskopavimas

Vienkartine kilpele perbraukiama ant LB agarizuotos terpės užaugusi bakterijų kolonija, kuri suspenduojama sterilaus vandens laše ant objektyvinio stiklelio. Bakterijų tepinėlis džiovinamas ore ir fiksuojamas 2-3 kartus perbraukiant stiklelį per spiritinės lempūtės liepsną. Taip paruoštas mėginys dažomas Gramo būdu (Abedin, 2015). Ant fiksuoto tepinėlio užlašinama 100 µl kristalo violeto, palaikoma 1 minutę ir nuplaunama distiliuotu vandeniu. Po to ant mėginio užlašinama 100 µl Gramo jodo 1 minutei ir vėl nuplaunama distiliuotu vandeniu. Tada užpilama 100 µl blukinimo tirpalu bei nuplaunama distiliuotu vandeniu. Galiausiai mėginys 1 minutę dažomas 100 µl safraninu, nuplaunamas distiliuotu vandeniu ir leidžiama nudžiūti kambario temperatūroje. Ant sauso stikliuko užlašinamas lašas imersinio aliejaus ir stebima per mikroskopą. Naudojamas Olympus CX41 šviesinis mikroskopas su 10x, 40x ir 100x kartų didinančiais objektyvais. Nuotraukoms gauti naudojama Olympus U-TV1X-2/U-CMAD3 mikroskopo kamera, o vaizdas apdorojamas naudojant PixelINK uScope programinę įrangą.

Dažant Gramo būdu siekiama diferencijuoti bakterijų grupes pagal jų sienelių sudedamąsias dalis. Gramo dažymas atskiria Gram-teigiamas ir Gram-neigiamas bakterijas nuspalvinant jų ląsteles atitinkamai violetine ar raudona spalva (Bishop & McCue, 2014).

2.2.8.2. Mielių mikroskopavimas

Mielių mikroskopavimui naudojamos ant SDA terpės užaugusios kolonijos. Vienkartine kilpele paimama viena kolonija ir suspenduojama 100 µl vandenyje be nukleazijų. Mėginys gerai išmaišomas vorteksuojant. 7 µl uždedama ant švaraus mikroskopinio stikliuko, ant viršaus dedamas dengiamasis stikliukas, ant kurio užlašinamas lašas imersinio aliejaus ir stebima mikroskopu.

2.2.8.3. Pelėsinių grybelių mikroskopavimas

Pelėsinio grybelio mikroskopavimui paruošiama Petri lėkštelė, iškerpamas atitinkamo dydžio filtrinis popierius ir sudrėkinamas distiliuotu vandeniu, siekiant palaikyti drėgmę. Ant filtrinio popieriaus viršaus dedamas mikroskopinis stikliukas, ant jo uždedama su steriliu skalpeliu išpjauta kvadrato formos PDA terpė, ant kurios dedamas dengiamasis stikliukas. Tada vienkartinę kilpele perbraukiamas pelėsinio grybelio kultūros paviršius ir atsargiai užsėjama ant išpjautos PDA terpės šonų. Mikroskopavimui paruoštos lėkštelės inkubuojamos 10 dienų.

Po inkubacijos, ant švaraus mikroskopinio stikliuko užlašinamas lašas laktofenolio mėlynojo dažo. Nuo pelėsinio grybelio kultūros nuimamas dengiamasis stikliukas ir uždedamas ant paruošto mikroskopinio stikliuko su dažu, tada stebima mikroskopu.

2.2.9. Mikroorganizmų fermentinio aktyvumo nustatymas

Pirmiausia mėginiai paruošiami:

- Bakterijos: pasėjama naktinė kultūra, kaip minėta anksčiau.
- Mielės: pasėjama naktinė kultūra – vienkartinė kilpele kolonija inokuliuojama į 3 ml skystą YEPD terpę.
- Pelėsinių grybelių sporų suspensija: ant PDA terpės 7-28 dienas augintas pelėsinis grybelis nuplaunamas 10 ml 0,9 % NaCl tirpalu ir naudojamas tolesniuose tyrimuose.

2.2.9.1. Celiuliazinio aktyvumo tikrinimas

Celiuliazę gaminantys mikroorganizmai tiriami ant agarizuotos terpės lėkštelių, kuriose kaip substratas naudojama tik karboksimetilceliuliozė (Coronado-Ruiz et al., 2018; Lal & Mishra, 1978). Karboksimetilceliuliozės skaidymą parodo skaidri zona aplink kolonijas (Delalibera et al., 2005).

5 µl naktinės bakterijų, mielių kultūros, arba pelėsinių grybelių sporų suspensijos užnešama ant CMC agaro terpės taškiniu būdu. Lėkštelės inkubuojamos 25-37 °C temperatūroje nuo 1 iki 10 parų. Po inkubacijos lėkštelės užpilamos:

- 0,1 % Kongo raudonuoju, laikoma nuo 20 iki 30 minučių ir užpilama 1 M NaCl tirpalu, palaikoma 10-20 minučių ir nupilama.
- Gramo jodu (angl. *Gram iodine*) (KI 2 g, I₂ 1 g ir distiliuotas vanduo 300 ml) nuo 20 iki 30 minučių ir praplaunama distiliuotu vandeniu.

Stebimos bespalvės zonos aplink kultūros taškus (Kasana, Salwan, Dhar, Dutt & Gulati, 2008). Ten, kur celiuliozė hidrolizuojama fermentų pagalba, atsiranda halo zona (Coronado-Ruiz et al., 2018). Zona matuojama siekiant apskaičiuoti fermentinį indeksą (FI) (angl. *enzymatic index*), skaičiuojamą pagal (1) formulę (Coronado-Ruiz et al., 2018; Florencio, Couri, & Farinas, 2012):

$$FI = \frac{\text{Hidrolizės zonos diametras}}{\text{Kolonijos diametras}} \quad (1)$$

Fermentinis indeksas apskaičiuojamas kolonijos skersmenį ir skaidrią zoną aplink koloniją padalinus iš kolonijos skersmens (Delalibera et al., 2005). Kiekvieno mikroorganizmo fermentinis indeksas matuojamas iš 3 pakartojimų, išvedamas vidurkis ir apskaičiuojamos paklaidos.

2.2.9.2. Amilazinio aktyvumo tikrinimas

Mikroorganizmai patikrinami ne tik dėl celiuliazinio, bet ir dėl amilazinio aktyvumo. 5 μ l naktinės bakterijų, mielių kultūros, arba pelėsinių grybelių sporų suspensijos užnešama ant krakmolo agarizuotos terpės taškiniu būdu. Lėkštelės inkubuojamos 25-37 °C temperatūroje 3-7 paras. Po inkubacijos lėkštelės užpilamos Gramo jodu nuo 20 iki 30 minučių ir praplaunamos distiliuotu vandeniu. Jeigu po inkubacijos aplink kultūros taškus matoma halo zona, yra manoma, kad tokie mikroorganizmai geba skaidyti krakmolą.

2.2.9.3. Celiuliazinio aktyvumo tyrimas DNS reagentu

Mėginiai paruošiami remiantis anksčiau aprašytu metodu jį šiek tiek modifikuojant (Yang et al., 2014). 500 ml auginimo kolbos su paruoštomis 250 ml LB, YM, CZ terpėmis, turinčiomis 1 % CMC kaip anglies šaltinio, naudojamos atitinkamai bakterijų, mielių ir pelėsinių grybelių auginimui 25-37 °C temperatūroje purtant 140-180 rpm. Terpės pirmiausia autoklavuojamos 1 atm. slėgyje, 121 °C temperatūroje, tada užsėjama 1 ml atitinkamo mikroorganizmo ir auginama nuo 1 iki 28 dienų. Praėjus inkubaciniam laikotarpiui mėginiai centrifuguojami 5000 rpm 15 minučių, o gautas skaidrus supernatantas naudojamas celiuliazinio aktyvumo tyrimams.

Paruošiamas citratinis buferis: 4,37 g citrinų rūgšties monohidrato ištirpinama 750 ml distiliuoto vandens, pridedama 12,84 g NaOH, tada matuojamas pH. Pasiekus pH 4,8, buferis praskiedžiamas iki 1000 ml.

Paruošiamas DNS reagentas (Ghose.T.K, 1987). 1 g dinitrosalicilo rūgšties tirpinama 50 ml distiliuoto vandens, kaitinant 95 °C temperatūroje. Ištirpus DNS, į tirpalą pridedama 30 g kalio natrio tartrato, ištirpinto 20 ml distiliuoto vandens, toliau maišoma kaitinant. Tada pridedama 8 g natrio hidroksido, ištirpinto 20 ml distiliuoto vandens, į taip paruoštą tirpalą įpilama dar 10 ml distiliuoto vandens.

2.2.9.4. Endo- β -1,4-gliukanazinio aktyvumo tyrimas

Tai vienas paprasčiausių metodų celiuliazės aktyvumui matuoti. Metodas susijęs su fermento veikiamo karboksimetilceliulioze, o gautų cukrų redukcija nustatoma naudojant dinitrosalicilo rūgšties reagentą (Lal & Mishra, 1978; Miller, Blum, Glennon, & Anne L. Burton, 1960). Geltonas DNS reaguoja su redukuojančiu cukrumi, sudarydamas oranžinę-raudoną 3-amino-5-nitrosalicilo rūgštį, aromatinį junginį, kuris sugeria šviesą esant 540 nm, todėl leidžia kiekybiškai spektrofotometriškai išmatuoti esančio redukuojančio cukraus kiekį (Abedin, 2015; Goncalves, Rodriguez-Jasso, Gomes, Teixeira, & Belo, 2010; Rahman, Fernando, Ross, Wu, & Qin, 2018). Dėl

tirpumo vandenyje CMC yra pranašesnė už natūralią celiuliozę kaip substratą, o DNS reagentas – pranašesnis už kitus reagentus nustatant cukraus redukcijos laipsnį (Miller et al., 1960).

1 % CMC substratas paruošiamas karboksimetilceliuliozę ištirpinus 0,05 M natrio citratiniame buferyje, pH 4,8. Tyrimas atliekamas remiantis žinomu metodu (Ghose.T.K, 1987).

1. Pridedami 0,5 ml fermento mėginiai, skiesti citratiniame buferyje.
2. Prie fermento mėginio įpilama 0,5 ml 1 % CMC substrato, gerai sumaišoma ir inkubuojama 50 °C temperatūroje 30 min.
3. Pridedama 3 ml DNS reagento, sumaišoma vartant.
4. Mėginiai inkubuojami lygiai 5 minutes verdančio vandens vonioje. Praėjus 5 minutėms, mėginiai iškart atvėsunami ledo vonioje.
5. Į mėgintuvėlius pridedama 20 ml distiliuoto vandens, gerai sumaišoma kelis kartus vartant.
6. Mėginių sugertis matuojama esant 540 nm bangos ilgiui.
7. Kartu matuojamas ir kontrolinis mėginys – vietoj fermento naudojant citratinį buferį, o kaip standartas naudojama 0,1-2,0 mg/ml gliukozė.
8. Sudaroma standartinė gliukozės kalibracinė kreivė. Naudojant šį standartą perskaičiuojamos mėginių absorbcijos vertės į gliukozę, pagamintą reakcijos metu.
9. Endo-β-1,4-gliukanazinis (CMC) aktyvumas U/ml apskaičiuojamas pagal (2) formulę:

$$Celiuliazinis\ aktyvumas = \frac{c \times V_r \times SF}{t \times V_f \times M}, \quad (2)$$

čia c – gliukozės koncentracija mg/ml; V_r – reakcijos tūris, ml; SF – skiedimo faktorius; t – inkubacijos trukmė, min; V_f – fermento tūris, ml; M – molinė gliukozės masė, g/mol.

Vienas fermentinio aktyvumo vienetas – fermento kiekis, kuris tyrimo sąlygomis atpalaiduoja vieną mmol redukuojančio cukraus per minutę. Kiekvieno mikroorganizmo celiuliazinis aktyvumas matuojamas iš 3 pakartojimų, išvedamas vidurkis ir apskaičiuojamos paklaidos.

2.2.9.5. Bendro celiuliazinio aktyvumo tyrimas

Bendras celiuliazinis aktyvumas nustatomas filtrinio popieriaus tyrimu, kaip substratą naudojant Whatman No. 1 filtrinio popieriaus juostelę, kurios matmenys 1,0 × 6,0 cm, atitinkantys 50 mg substrato (Ghose.T.K, 1987; Legodi et al., 2019). Kaip standartas naudojama 1-10 mg/ml gliukozė. Tyrimas vykdomas remiantis anksčiau aprašytu metodu (Ghose.T.K, 1987). Pridedama 1 ml 0,05 M citratinio buferio, pH 4,8, įpilama 0,5 ml fermento, skiesto citratiniame buferyje. Pridedama

substrato – Whatman No. 1 filtrinio popieriaus juostelė 1 x 6 cm (50 mg), sumaišoma ir inkubuojama 50 °C temperatūroje 60 min. Toliau tyrimas vykdomas kaip atliekant CMC aktyvumo tyrimą. Bendras celiuliazinis aktyvumas (FPU) matuojamas pagal (2) formulę.

2.2.10. Amilazinio aktyvumo tyrimas DNS reagentu

Šiam tyrimui naudota naktinė bakterijų, mielių kultūra bei pelėsinų grybelių sporų suspensija. Amilazinio aktyvumo tyrimas atliekamas tokiu pačiu principu kaip ir CMC aktyvumo matavimas, tik kaip substratas naudojamas 1 % krakmolo tirpalas ir mėginiai inkubuojami valandą 37 °C temperatūroje. Kaip standartas naudojama 0,1-10,0 mg/ml maltozė, nubrėžiama standartinė maltozės kalibracinė kreivė, iš kurios apskaičiuojama susidariusio redukuojančio cukraus koncentracija mėginiuose. Galiausiai apskaičiuojamas amilazinis aktyvumas pagal (3) formulę.

$$\text{Amilazinis aktyvumas} = \frac{c \times V_r \times SF}{t \times V_f \times M}, \quad (3)$$

čia c – maltozės koncentracija mg/ml; V_r – reakcijos tūris, ml; SF – skiedimo faktorius; t – inkubacijos trukmė, min; V_f – fermento tūris, ml; M – molinė maltozės masė, g/mol.

Vienas fermentinio aktyvumo vienetas apibrėžiamas kaip fermento kiekis, kuris tyrimo sąlygomis per minutę atpalaiduoja vieną mmol redukuojančio cukraus. Kiekvieno mikroorganizmo amilazinis aktyvumas matuojamas iš 3 pakartojimų, išvedamas vidurkis ir apskaičiuojamos paklaidos.

2.2.11. Antimikrobinių savybių tyrimas

Vidinis atsparumas yra įgimtas bakterijų gebėjimas atsispirti tam tikro antimikrobinio agento veiklai per struktūrinius požymius, pavyzdžiui, Gram-neigiamų bakterijų išorinę membraną. Gram-neigiamas bakterijas (*P. putida* ir *E. coli*) slopina mažesnis grybelių ir bakterijų kamienų skaičius nei Gram-teigiamas (*B. subtilis*) bakterijas. Tai gali būti siejama su atsparumu Gram-neigiamų bakterijų antimikrobiniams junginiams (Albores, Sanguinedo, Held, Cerdeiras, & Blanchette, 2018).

Bakterijų, mielių ir pelėsinų grybelių antimikrobinės savybės prieš Gram-neigiamas *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* bei Gram-teigiamas *Bacillus subtilis* bakterijas *in vitro* patikrintos remiantis diskelių difuzijos metodu.

Tyrimas atliktas remiantis ankstesniu metodu jį šiek tiek modifikuojant (Garcia et al., 2012). 100 µl naktinės *E. coli*, *P. putida* ir *B. subtilis* 10⁹ ląst./ml bakterijų kultūros stikliniu glaistytuvu pasėjama ant atskirų Petri lėkštelių su LB agarizuota terpe. Tada paruošiami sterilūs Whatman No. 1

filtrinio popieriaus diskeliai, kurie suvilgomi atitinkamai 10 µl naktine bakterijų, mielių kultūra ar pelėsinio grybelio sporų suspensija. Taip pat naudojama teigiama kontrolė – 100 mg/ml ampicilinas ir distiliuotas vanduo – neigiama kontrolė. Steriliu pincetu filtrinio popieriaus diskeliai uždedami ant skirtingomis bakterijomis pasėtų lėkštelių, kurios vėliau inkubuojamos 24-48 valandas 25-37 °C temperatūroje. Praėjus inkubaciniam laikotarpiui stebima ar tikrinti mikroorganizmai pasižymi antimikrobinėmis savybėmis. Kiekvieno mikroorganizmo inhibicijos zona matuojama iš 3 pakartojimų, išvedamas vidurkis ir apskaičiuojamos paklaidos.

2.2.12. Jautrumo antigrybeliniam vaistui tyrimas diskelių difuzijos metodu

Iš literatūros analizės žinoma, kad kai kurie mielių *Rhodotorula mucilaginosa* ir pelėsinių grybelių *Sarocladium killiense* kamienai pasižymi jautrumu antifungicidinio poveikio preparatui – amfotericinui B (Khan et al., 2011; Seifi et al., 2013).

Jautrumo antigrybeliniam vaistui tyrimas atliktas diskelių difuzijos metodu, remiantis ankstesniu metodu jį šiek tiek modifikuojant (Seifi et al., 2013). 100 µl mielių kultūros ar pelėsinio grybelio sporų suspensijos stikliniu glaistytuvu pasėjama ant Saboro ir Kazeino agarizuotų terpių. Paruošiamos skirtingos amfotericino B koncentracijos: 10, 20 ir 32 µg/ml, o kontrolei naudojamas distiliuotas vanduo. Sterilūs filtrinio popieriaus diskeliai suvilgomi atitinkamos koncentracijos amfotericinu B arba distiliuotu vandeniu. Steriliu pincetu filtrinio popieriaus diskeliai uždedami ant mielėmis ar pelėsiniu grybeliu pasėtų lėkštelių, kurios vėliau inkubuojamos 48 valandas 30 °C temperatūroje. Praėjus inkubaciniam laikotarpiui stebima ar tikrinti mikroorganizmai pasižymi jautrumu amfotericinui B.

2.2.13. Karotenoidų ekstrakcija iš raudonųjų mielių

Tyrimas atliktas remiantis ankstesniu metodu jį šiek tiek modifikuojant (Martínez, Delso, Aguilar, Álvarez, & Raso, 2019). Pirmiausia į 500 ml auginimo kolbas su 250 ml skystos YM terpės inokuliuojama viena *Rhodotorula mucilaginosa* (G1 ir G3) kolonija ir auginama 72 valandas 25 °C temperatūroje, purtant 180 rpm. Tada paaimama po 1 ml iš minėtų kolbų ir įpilama į 500 ml auginimo kolbas su 250 ml skystos YM terpės bei vėl auginama 72 valandas 25 °C temperatūroje, purtant 180 rpm. Siekiant palyginti ląstelės sienelės suardymą, atliekamas žinomas ir modifikuotas tyrimas – prieš ardant ultragarsu, mėginiai 3 kartus pakartotinai užšaldomi-atšildomi. Mėginiai po 5 ml centrifuguojami 3000 xg 5 minutes, nupilamas supernatantas, resuspenduojama 5 ml citratiniame fosfatiniame pH 7,0 McIlvaine buferyje. Tada vykdomas ardymas ultragarsu 3 minutes, intervalais kas 30 sekundžių, ultragarso energija 1,03 kJ. Po ultragarso mėginiai centrifuguojami 3000 xg

5 minutes, nuosėdos suspenduojamos 5 ml DMSO, 1 minutę vorteksuojama ir inkubuojama 1 valandą kambario temperatūroje, purtant 200 rpm. Tada pridedama 5 ml heksano bei 1 ml dietileterio, vorteksuojama 1 minutę ir vėl inkubuojama 30 minučių kambario temperatūroje, purtant 200 rpm. Po inkubacijos pridedama 1 ml NaCl sotaus tirpalo, centrifuguojama 4000 xg 10 minučių ir surenkama viršutinė fazė, kurios sugertis matuojama 400-600 nm bangos ilgiuose.

Karotenoidų ekstrakcijos išeiga apskaičiuojama naudojant β -karoteno heksane molinį ekstinkcijos koeficientą ($\epsilon=2592$), esant 453 nm bangos ilgiui ir išreiškiama mg karotenoidų/l suspensijos, naudojant (4) lygtį (Isler, Lindlar, Montavon, Rüegg, & Zeller, 1956; Martínez et al., 2020):

$$Karotenoidai (mg/l) = \frac{Abs \times 10 \times 1000}{\epsilon}, \quad (4)$$

čia Abs – sugertis, O.V.; 10 – kiuvetės kelio ilgis, mm; ϵ – molinis ekstinkcijos koeficientas heksane; 1000 – mastelio faktorius

Taip pat apskaičiuojamos ekstrakcijos išeigos toruleno heksane ($\epsilon=2680$) esant 485 nm bangos ilgiui ir torularodino heksane ($\epsilon=2040$) esant 468 ir 502 nm bangos ilgiui (Zoz et al., 2015).

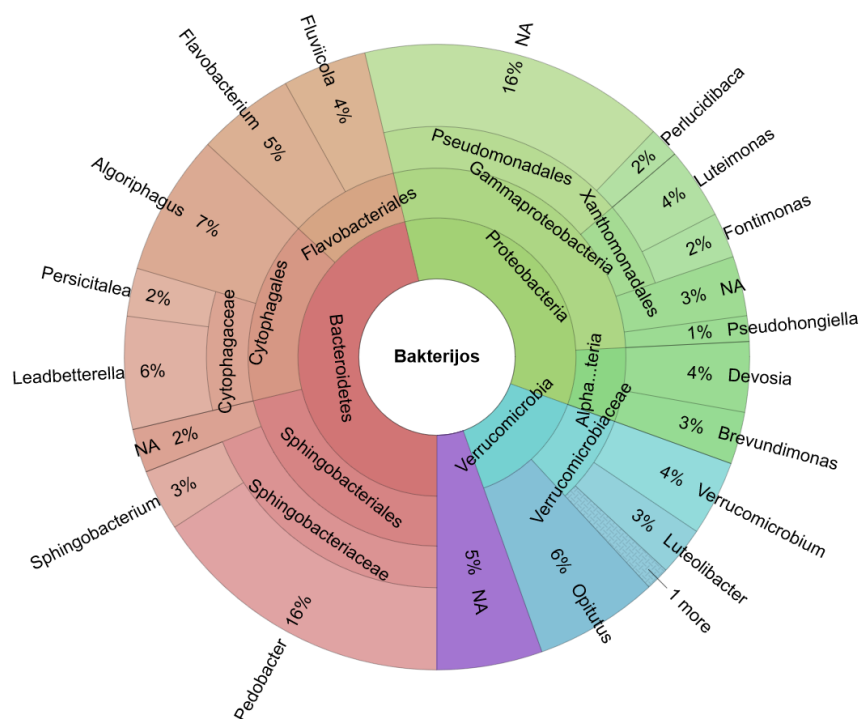
2.2.14. Mielių karotenoidų antibakterinių savybių tyrimas

Išskirtų karotenoidų pigmentų antibakterinės savybės tikrinamos diskelių difuzijos metodu, remiantis ankstesniu metodu jį šiek tiek modifikuojant (Yolmeh, Hamed, & Khomeiri, 2016). Ant LB agarizuotos terpės stikliniu glaistytuvu pasėjama 100 μ l naktinės *E. coli* DH10 β 10⁹ ląst./ml kultūros. Paruošiami sterilūs filtrinio popieriaus diskeliai, kurie sudrėkinami po ekstrakcijos gautu karotenoidų mišiniu. Kontrolei naudojamas filtrinio popieriaus diskelis suvilgytas distiliuotu vandeniu, kuris dedamas Petri lėkštelės viduryje. Lėkštelės inkubuojamos 24 valandas 37 °C temperatūroje. Jeigu po inkubacijos aplink filtrinio popieriaus diskelius matoma halo zona, manoma, kad tiriami karotenoidai pasižymi antibakterinėmis savybėmis.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Naujos kartos sekoskaita

Nuo perdirbto popieriaus gamtinės termoizoliacinės medžiagos padaromos nuoplovos, naudojant rinkinį išskiriama bendroji genominė DNR. Mėginiai siunčiami į biotechnologijų kompaniją „Macrogen“, Pietų Korėjoje, kur atliekama naujos kartos sekoskaita (angl. *next-generation sequencing*) (NGS). Išanalizavus gautus duomenis nustatytos mėginyje aptiktos bakterijos, kurios pavaizduotos 4 paveiksle.

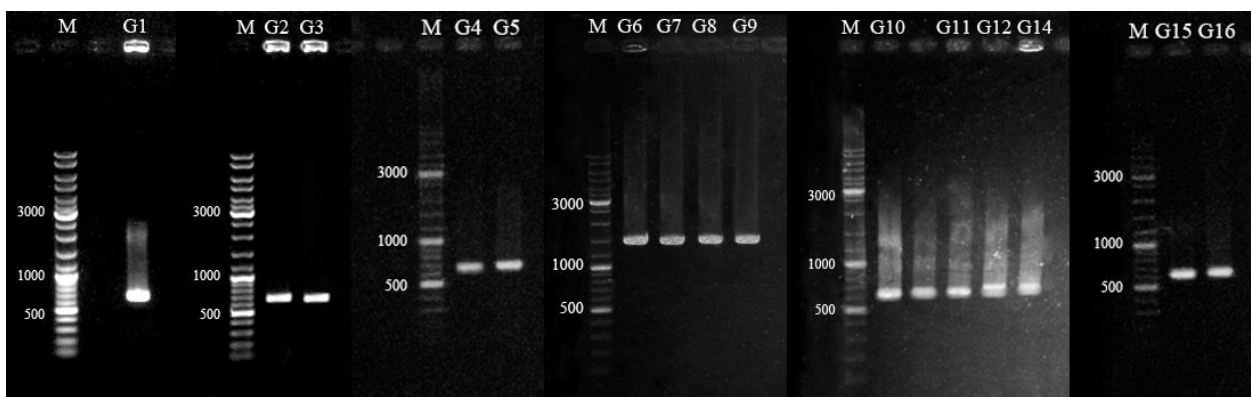


4 pav. Krona diagrama, vaizduojanti bakterijų bendrijos pasiskirstymą mėginyje

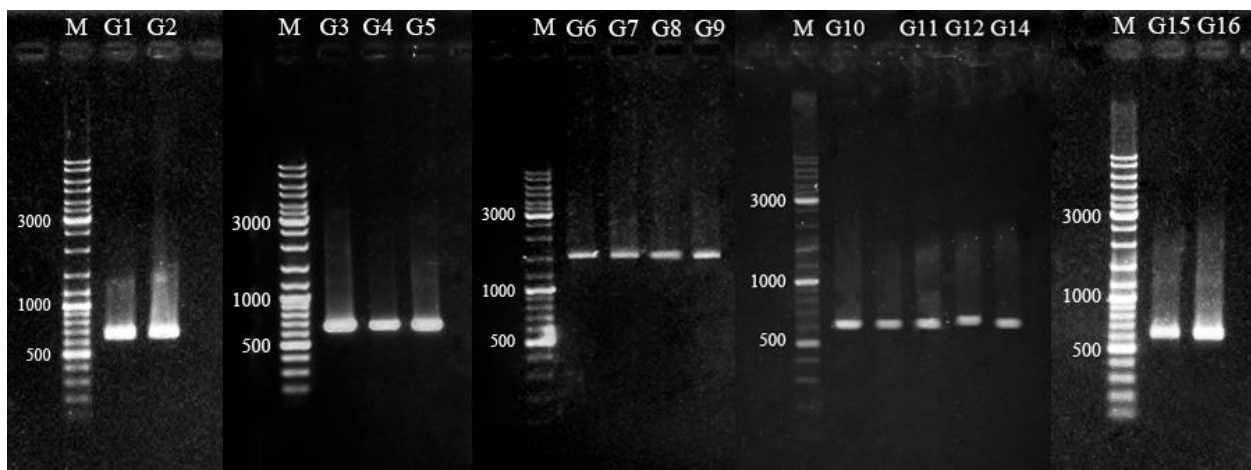
Identifikuota bakterijų gentis, tačiau iki rūšies išskirti nepavyko. NGS sekoskaitos metodu identifikuoti grybelių bendrijos pasiskirstymo mėginyje nepavyko.

3.2. Mikroorganizmai

Nežinomi mikroorganizmai pasėjami ant LB, CZ, YEPD, YM, MEA, PDA, CZ, SDA terpių. Mikroorganizmai persėjami kelis kartus, jeigu reikia atliekami skiedimai, mėginiai vėl persėjami, kol gaunamos pavienės kolonijos. Tada atitinkamai paruoštų mikroorganizmų DNR amplifikuojama PGR metodu su universaliais bakteriniais W001 ir W002 ar grybeliams specifiniais ITS-1F ir ITS-4 pradmenimis. Norint patikrinti ar amplifikacija pavyko, atliekama DNR elektroforezė agarozės gelyje.



5 pav. Mikroorganizmų DNR amplifikuota PGR metodu. *M* pažymėtas molekulinio dydžio žymeklis.



6 pav. Iš PGR mišinio išgrynintas PGR produktas. *M* pažymėtas molekulinio dydžio žymeklis.

Iš penkto paveikslo matoma, kad DNR padauginimas PGR metodu pavyko. Palyginus su mokslinės literatūros duomenimis, gautas bakterinio 16S rRNR geno ilgis (G6-G9 mėginiai) atitinka teorinį – apie 1500 bp (Manaka, Tokue, & Murakami, 2017). Tuo tarpu likusių mėginių DNR amplifikuota naudojant grybeliams specifinius pradmenis, o grybeliams specifinis ITS regionas yra 600-800 bp ilgio, taigi gauti rezultatai taip pat atitinka literatūroje pateiktą informaciją (Larena, Salazar, Gonza, Julian, & Rubio, 1999). Pavykus DNR amplifikacijai PGR produktas išgryninamas naudojant komercinį rinkinį. Iš pateikto paveikslo nr. 6 matome, kad PGR produkto gryninimas pavyko, o gauti bazių porų dydžiai atitinka teorinius.

3.3. Identifikuoti mikroorganizmai

Sekoskaitai siunčiami mėginiai, kurių amplifikavimas PGR metodu pavyko. Mėginiai siunčiami į biotechnologijų kompaniją „MacroGen“, Nyderlanduose. Po sekoskaitos gauti rezultatai analizuojami programine įranga ApE, nustatomos genų sekos, kurios tikrinamos NCBI 16S rRNR (bakterijų ir archėjų) bei ITS (grybelių) nukleotidų duomenų bazėse. Nustatomi nukleotidų sekos

palyginiai, pagal juos identifikuojami mikroorganizmai (bakterijos, grybeliai) aptikti termoizoliacinių medžiagų, pagamintų iš perdirbto popieriaus, mėginiuose. Analizės rezultatai pateikiami 1 ir 2 lentelėse.

1 lentelė. Identifikuotos bakterijos, remiantis NCBI duomenų baze

Mėginio pavadinimas	16S rRNR bakterijos	Dydis, bp	Identiškumas, %
G6	<i>Pantoea agglomerans</i> JCM1236	1152	97,18
G7	<i>Pantoea agglomerans</i> JCM1236	1061	98,68
G8	<i>Pantoea agglomerans</i> JCM1236	1131	98,33
G9	<i>Pantoea agglomerans</i> JCM1236	1091	99,54

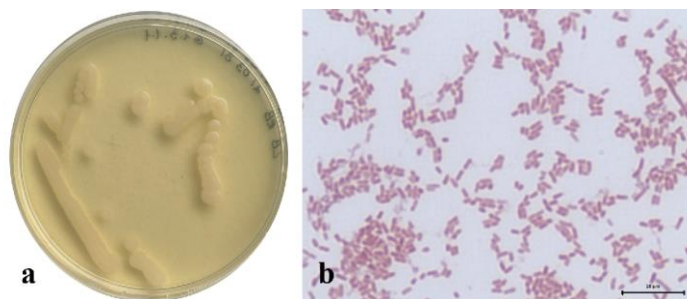
2 lentelė. Identifikuotos mielės ir pelėsiai grybeliai, remiantis NCBI duomenų baze

Mėginio pavadinimas	ITS grybeliai	Dydis, bp	Identiškumas, %
G1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CBS 316	581	99,17
G3	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CBS 316	581	99,07
G4	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CBS 316	581	98,91
G5	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CBS 316	576	97,96
G10	<i>Penicillium citreonigrum</i> NRRL 761	491	99,80
G11	<i>Penicillium rubens</i> CBS 129667	418	99,17
G12	<i>Trichoderma simmonsii</i> CBS 130431	541	99,82
G14	<i>Sarocladium kiliense</i> MUCL 9724	471	99,79
G15	<i>Sarocladium kiliense</i> MUCL 9724	491	99,19
G16	<i>Sarocladium kiliense</i> MUCL 9724	511	99,79

Analizuojant lentelėse pateiktus duomenis matoma, kad sekoskaitos metu identifikuoti 6 skirtingų rūšių mikroorganizmai, iš kurių 1 bakterijų ir 5 grybelių rūšys. Toliau pristatoma kiekviena aptiktų mikroorganizmų rūšis.

***Pantoea agglomerans* JCM1236**

Baigiamojo darbo metu identifikuota bakterijų rūšis – *Pantoea agglomerans*. Šios bakterijos kolonijų vaizdas ant LB agarizuotos terpės lėkštelių ir mikroskopinis vaizdas pateikiami 7 paveiksle.

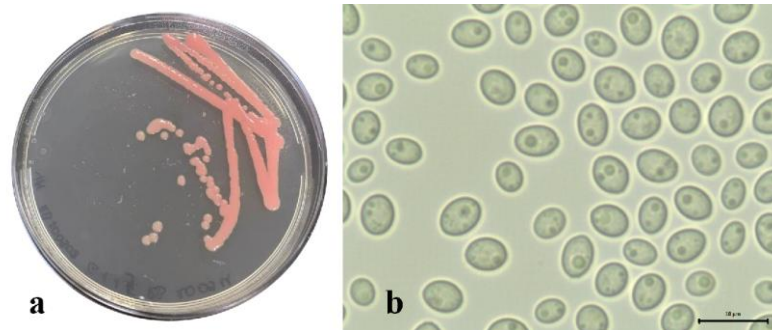


7 pav. *Pantoea agglomerans* (G7): a) augimas ant LB terpės, b) mikroskopinis vaizdas (padidinimas 1000x)

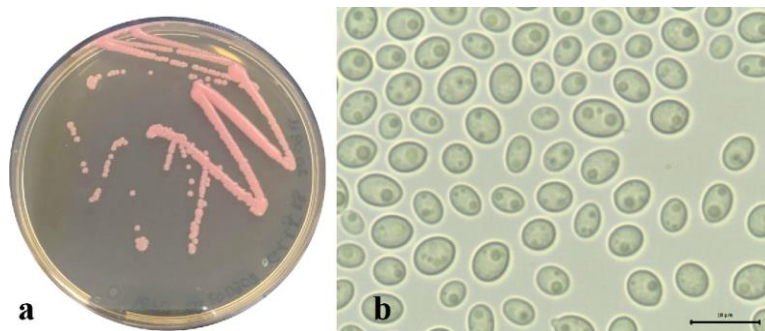
Mokslinėje literatūroje pateikiama *P. agglomerans* charakteristika atitinka gautus rezultatus. Kaip minėta ankstesniame skyriuje, dažant bakterijas Gramo būdu siekiama jas diferencijuoti. 7 paveiksle matoma, kad *P. agglomerans* bakterijų ląstelės nusidažė raudona spalva, vadinasi, tai Gram-neigiamos bakterijos. Jų ląstelės yra tiesios lazdelės formos $0,5-1,3 \times 1,0-3,0 \mu\text{m}$. Šių bakterijų kolonijos yra lygios, permatomos, gelsvos spalvos (Acioly et al., 2017; Grimont & Grimont, 2015).

***Rhodotorula mucilaginosa* CBS 316**

Atliekant mieliagrybių atranką, išskirti raudonos spalvos mikroorganizmai, kuriuos identifikavus su grybeliams specifiniais ITS pradmenimis patvirtinta, kad tai yra grybeliai. Toliau atliekama morfologinė analizė (8 ir 9 paveikslai). Po sekoskaitos duomenų analizės nustatyta, kad tai yra mieliagrybis *Rhodotorula mucilaginosa*.



8 pav. *Rhodotorula mucilaginosa* (G1): a) kolonijos ant YM terpės, b) mikroskopinis vaizdas (padidinimas 1000x)

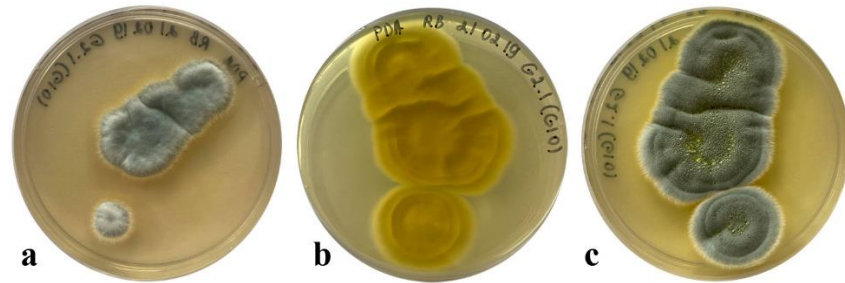


9 pav. *Rhodotorula mucilaginosa* (G3): a) kolonijos ant YEPD terpės, b) mikroskopinis vaizdas (padidinimas 1000x)

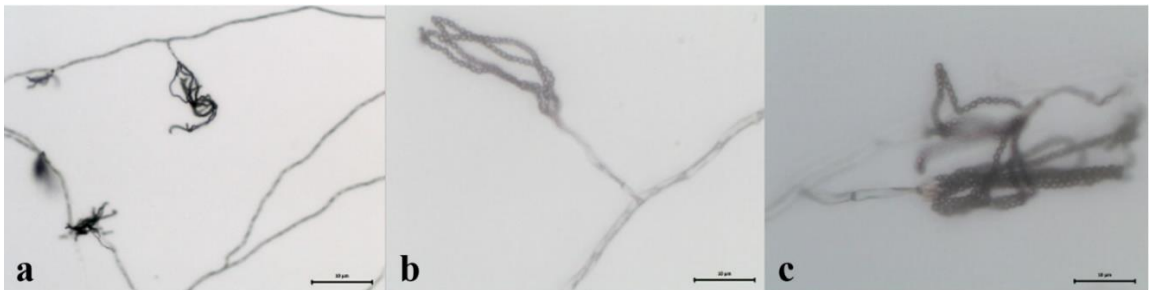
R. mucilaginosa morfologija sutampa su literatūroje pateikta informacija: kolonijos yra lygaus paviršiaus, blizgančios arba matinės, minkštos, sviestinės arba gleivėtos tekstūros, rausvos, koralų raudonos spalvos (Hu et al., 2016; Marova et al., 2011). Kaip galima pastebėti 8a ir 9a paveiksluose, raudonųjų mielių kolonijos ant YEPD terpės yra labiau matinės ir sviestinės tekstūros, o augančios ant YM terpės – blizgančios ir turi gleivėtą tekstūrą. Ląstelių mikroskopinė morfologija elipsoidinės formos (žr. 8b, 9b) (Hu et al., 2016; Marova et al., 2011).

Penicillium citreonigrum NRRL 761

Vienas iš identifikuotų pelėsinių grybelių – *Penicillium citreonigrum*. Šio grybelio kolonijos ant PDA terpės pavaizduotos 10 paveiksle.



10 pav. *Penicillium citreonigrum* (G10) ant PDA terpės: a) kolonija po 4 dienų, b) antroji kolonijos pusė po 7 dienų, c) kolonija po 7 dienų.

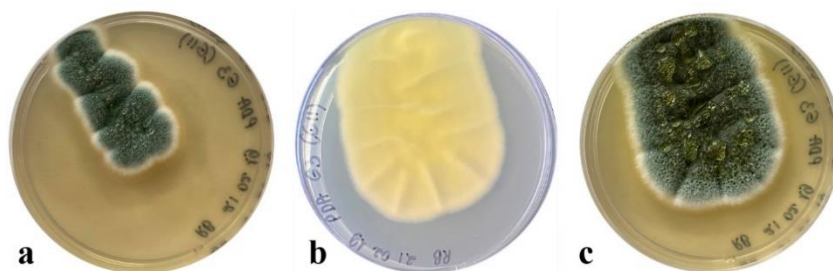


11 pav. *Penicillium citreonigrum* (G10) mikroskopinis vaizdas a) padidinimas 100x, b) padidinimas 400x, c) padidinimas 400x

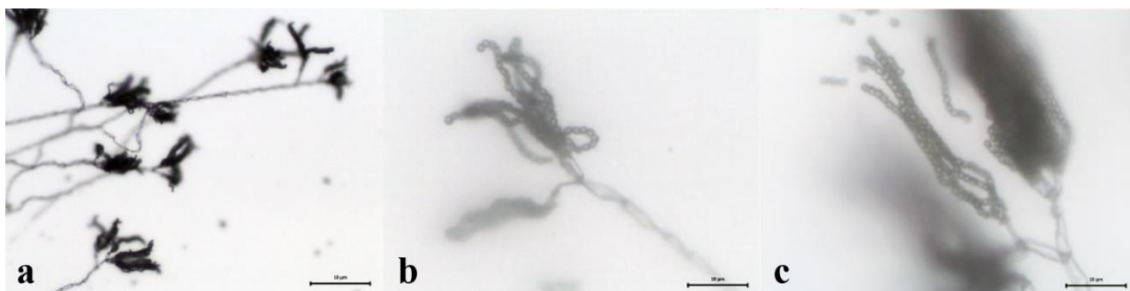
Mokslinėje literatūroje pateikiama *P. citreonigrum* charakteristika atitinka gautus rezultatus. Šių pelėsinių grybelių kolonijų diametras po 7 dienų yra 24-31 mm, kolonijos pilkšvai žalsvos arba melsvos su baltu miceliu, vidutiniškai sporuliuoja, tekstūra vilnonė-aksominė, eksudatas skaidrus, šviesiai geltonos spalvos, antrosios kolonijos pusės spalva rusvai geltona (žr. 10 pav.) (Park et al., 2020). Konidijakočiai tiesūs arba dvišakiai (žr. 11 pav.), fialidės $6,0-9,0 \times 2,0-3,0 \mu\text{m}$, konidijų sienelės lygios, konidijos rutuliškos arba elipsės formos $1,8-2,6 \mu\text{m}$ skersmens (žr. 9 pav.) (Park et al., 2020; Peterson, Pérez, Vega, & Infante, 2003).

Penicillium rubens CBS 129667 (G11)

Kaip minėta ankstesniame skyriuje, *P. rubens* – dažnai vidaus patalpose aptinkamas grybelis, kurio kolonijos po 4 ir 7 dienų inkubacijos pavaizduotos 12 paveiksle. 10 parų ant PDA agaro kubelio augintas pelėsinis grybelis mikroskopuotas su 100x ir 400x didinimu, gauti rezultatai pateikti 13 paveiksle.



12 pav. *Penicillium rubens* (G11) ant PDA terpės: a) kolonija po 4 dienų, b) antroji kolonijos pusė po 7 dienų, c) kolonija po 7 dienų.

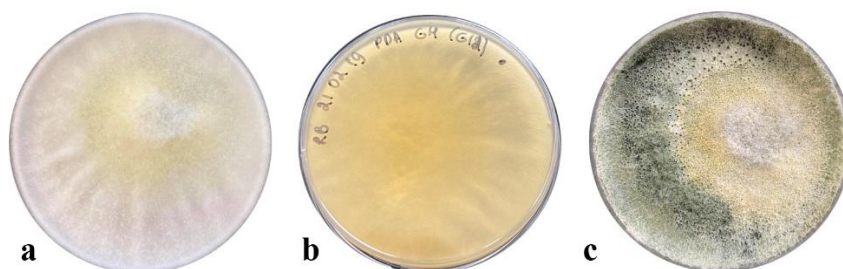


13 pav. *Penicillium rubens* (G11) mikroskopinis vaizdas a) padidinimas 100x, b) padidinimas 400x, c) padidinimas 400x

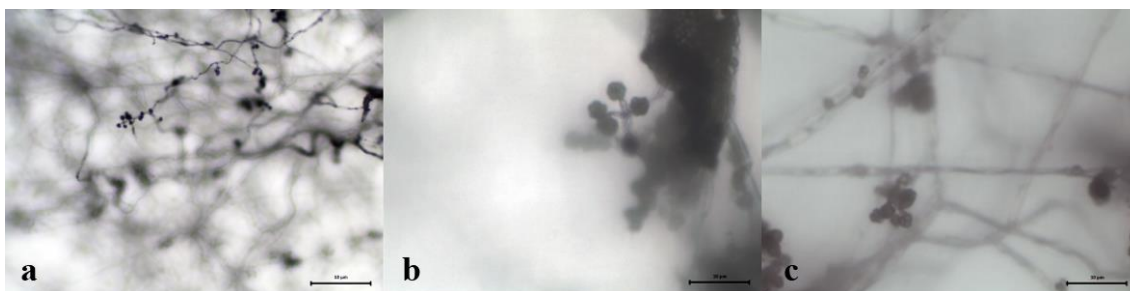
Penicillium rubens morfologija atitinka aprašytą mokslinėje literatūroje: kolonijos po 7 dienų 25-30 mm, pilkai žalsvos spalvos su baltu pakraščiu, aksominės-vilnonės tekstūros, stipriai sporuliuoja, pastebimi dideli skaidrūs geltonos spalvos eksudato lašeliai, o antroji kolonijos pusė – geltonos spalvos (žr. 10 pav.) (Sawant et al., 2019). Kaip matoma 13 paveiksle, šis pelėsinis grybelis pasižymi trišakiais arba keturšakiais skirtingai išsišakojusiais konidijokočiais, lygių sienelių, nuo apvalios iki elipsoidinės formos $1,9-2,0 \times 2,2-2,5 \mu\text{m}$ dydžio konidijomis, cilindrinėmis fialidėmis $5,7-5,9 \times 1,9-2,2 \mu\text{m}$ (Houbraken et al., 2012; Sawant et al., 2019).

***Trichoderma simmonsii* CBS 130431**

Trichoderma simmonsii pelėsinis grybelis išsiskiria nuo kitų identifikuotų grybelių savo morfologija. Šis pelėsinis grybelis greitai auga ir gali kolonizuoti ne tik terpės paviršių, bet ir Petri lėkštelės šonus, šio grybelio kolonija ant PDA terpės pateikta 14 paveiksle.



14 pav. *Trichoderma simmonsii* (G12) ant PDA terpės: a) kolonija po 4 dienų, b) antroji kolonijos pusė po 7 dienų, c) kolonija po 7 dienų.

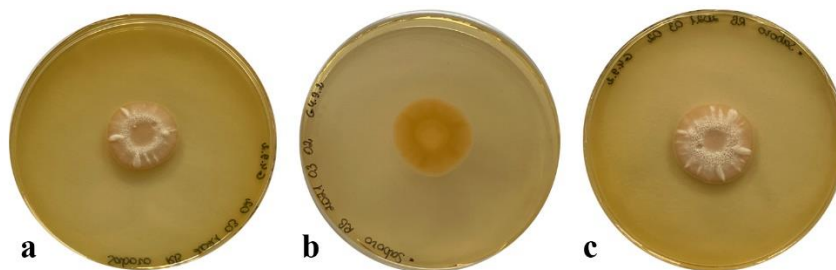


15 pav. *Trichoderma simmonsii* (G12) mikroskopinis vaizdas a) padidinimas 100x, b) padidinimas 400x, c) padidinimas 400x

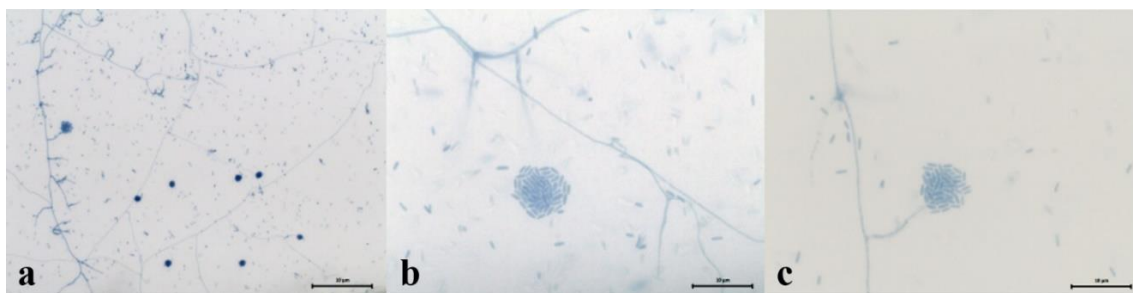
T. simmonsii pelėsinio grybelio morfologija atitinka pateiktą literatūroje: grybų hifų tankus raizginys, iš kurio išauga vaisiakūniai arba konidijakočiai yra tamsiai rudos-juodos, o nesubrendęs – žalios spalvos. Kolonijos spindulys po 4 parų augimo 25 °C ant PDA terpės siekia 55-65 mm. Konidijos formuojasi dideliame tamsiai žaliame diske aplink inokuliatą ir koncentrinuose žieduose. Konidijokočiai piramidės formos su priešingomis šakomis, kurios baigiasi kryžminių sūkuriumi iki penkių fialidžių (žr. 15 pav.). Fialidės $6,1-6,5 \times 3,3-3,4 \mu\text{m}$ dydžio. Konidija lygi, apvali link kiaušinio formos $3,0 \times 3,1 \mu\text{m}$ (Chaverri et al., 2015).

***Sarocladium kiliense* MUCL 9724**

Paskutinis identifikuotas mikroorganizmas – *Sarocladium kiliense* pelėsinis grybelis. Šis mikroorganizmas išsiskiria iš kitų, nes auga gana ilgai ir aukštesnėje temperatūroje negu kiti pelėsiniai grybeliai. Kolonijos po 8-10 dienų inkubacijos pavaizduotos 16 paveiksle.



16 pav. *Sarocladium kiliense* (G16) ant SDA terpės: b) kolonija po 8 dienų, c) antroji kolonijos pusė po 10 dienų, d) kolonija po 10 dienų



17 pav. *Sarocladium kiliense* (G16) mikroskopinis vaizdas a) padidinimas 100x, b) padidinimas 400x, c) padidinimas 400x

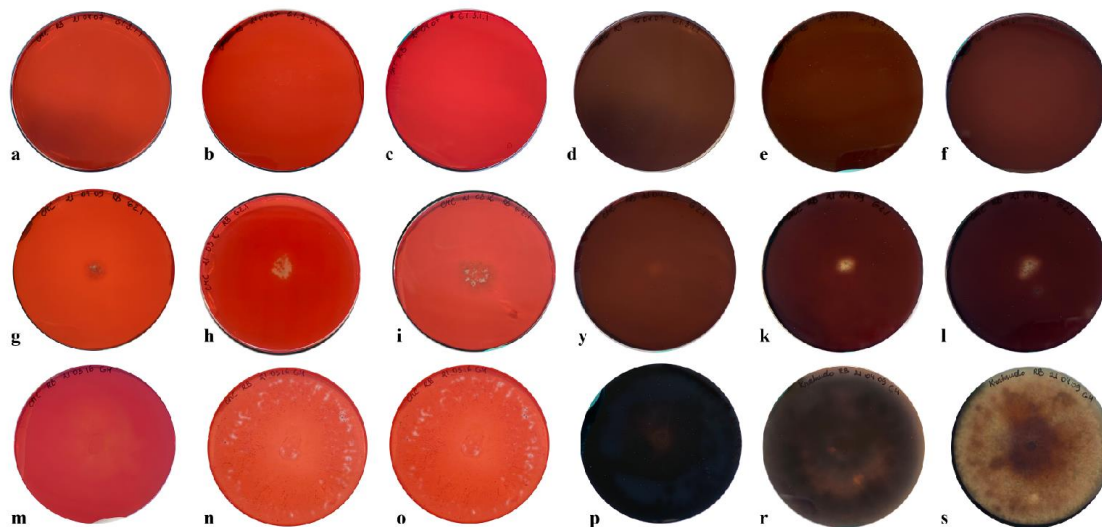
S. kiliense morfologija pavaizduota 16 paveiksle ir sutampa su aprašyta mokslinėje literatūroje: kolonijos yra plokščios, purvinai baltos-šviesiai oranžinės arba šviesiai rausvos spalvos, šiek tiek raukšlėtos drėgnu paviršiumi, o vėliau tampa labiau raukšlėtos (Júnior et al., 2013; Khan et al., 2011; Pérez-Cantero & Guarro, 2020; Sciortino, 2017). Antrosios kolonijos pusės spalva šviesiai oranžinė, kuri vėliau tampa intensyvesnė. Kolonijų diametras po 10-14 dienų siekia 36-46 mm (Giraldo et al., 2015; Sciortino, 2017).

Sarocladium kiliense konidijokočiai susideda iš pavienių fialidžių arba trumpų šoninių šakų, turinčių iki keturių fialidžių, dažnai atsirandančių iš virvinių gijų su keliais sujungtais hifais. Fialidės yra adatos formos ir labai siauros ($10,0-54,0 \mu\text{m} \times 1,6-3,0 \mu\text{m}$), o jų konidijos yra elipsoidinės ar cilindro formos ($3,0-8,0 \mu\text{m} \times 1,2-2,4 \mu\text{m}$), kaip ir minima literatūroje, dažniausiai aptinkamos grupėmis ant gleivėtų galvų (žr. 17 pav.) (Giraldo et al., 2015; Júnior et al., 2013; Khan et al., 2011; Pérez-Cantero & Guarro, 2020; Sciortino, 2017).

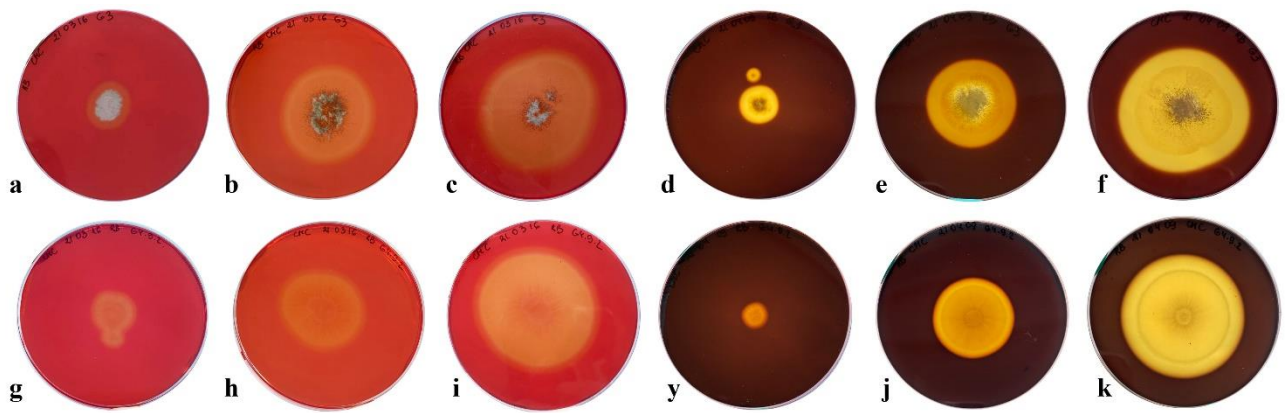
3.4. Mikroorganizmų fermentinio aktyvumo nustatymas

3.4.1. Kokybiniai metodai – dažymas Gramo jodu ir Kongo raudonuoju

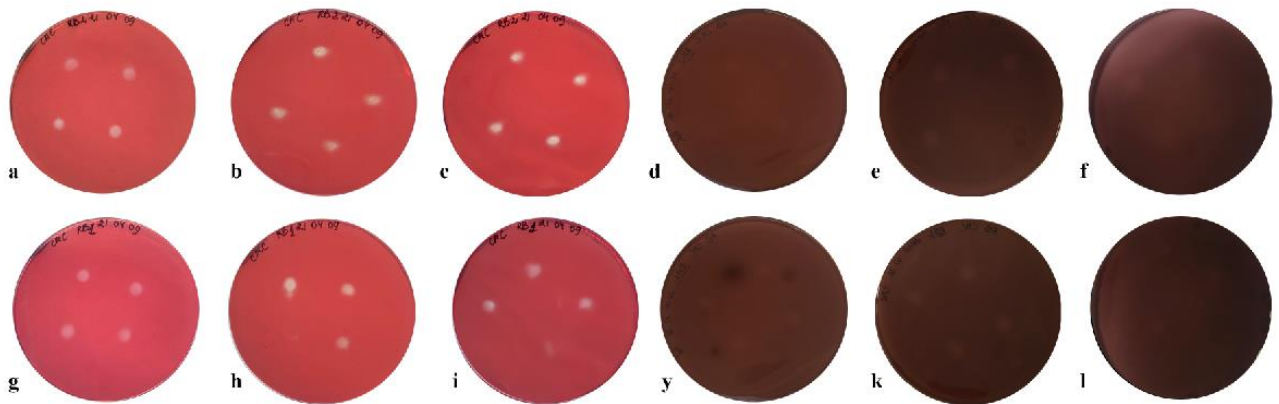
Celiuliazės producentų atranka vykdoma ant agarizuotos terpės lėkštelių, kuriose kaip anglies šaltinis yra tik karboksimetilceliuliozė. Taškiniu būdu užnešama naktinės bakterijų, mielių kultūros arba pelėsinių grybelių sporų suspensijos ir inkubuojama nuo 1 iki 10 parų. Praėjus inkubaciniam laikotarpiui lėkštelės užpilamos Kongo raudonuoju arba Gramo jodu. Mikroorganizmų celiuliazinio aktyvumo patikrinimas pateiktas 18-20 paveiksluose.



18 pav. Mikroorganizmų celiuliazinio aktyvumo tikrinimas. G7 dažant Kongo Raudonuoju, po: a) 1 d., b) 3 d., c) 7 d., dažant Gramo jodu, po: d) 1 d., e) 3 d., f) 7 d.; G10 dažant Kongo Raudonuoju, po: g) 3 d., h) 7 d., i) 10 d., dažant Gramo jodu, po: y) 3 d., j) 7 d., k) 10 d.; G12 dažant Kongo Raudonuoju, po: m) 3 d., n) 7 d., o) 10 d., dažant Gram jodu, po: p) 3 d., r) 7 d., s) 10 d



19 pav. Grybelių celiulazinio aktyvumo tikrinimas. G11 dažant Kongo Raudonuoju, po: a) 3 d., b) 7 d., c) 10 d., dažant Gramo jodu, po: d) 3 d., e) 7d., f) 10 d.; G16 dažant Kongo Raudonuoju, po: g) 3 d., h) 7d., i) 10 d., dažant Gramo jodu, po: y) 3 d., j) 7d., k) 10 d



20 pav. Mieliagrybių celiulazinio aktyvumo tikrinimas. G1 dažant Kongo Raudonuoju, po: a) 3 d., b) 7 d., c) 10 d., dažant Gramo jodu, po: d) 3 d., e) 7d., f) 10 d.; G3 dažant Kongo Raudonuoju, po: g) 3 d., h) 7d., i) 10 d., dažant Gramo jodu, po: y) 3 d., j) 7d., k) 10 d

18-20 paveiksluose matoma, kad tik aplink *Penicillium rubens* (G10) ir *Sarocladium kiliense* (G16) (žr. 19 pav.) pelėsinius grybelius susidarė skaidri halo zona, vadinasi šie mikroorganizmai geba skaidyti celiuliozę. Išryškėjusi skaidri zona matuojama norint apskaičiuoti fermentinį indeksą, kuris skaičiuojamas pagal (1) formulę, o rezultatai pateikiami 3 lentelėje.

3 lentelė. Mikroorganizmų fermentinis indeksas, naudojant Kongo raudonąjį ir Gramo jodą

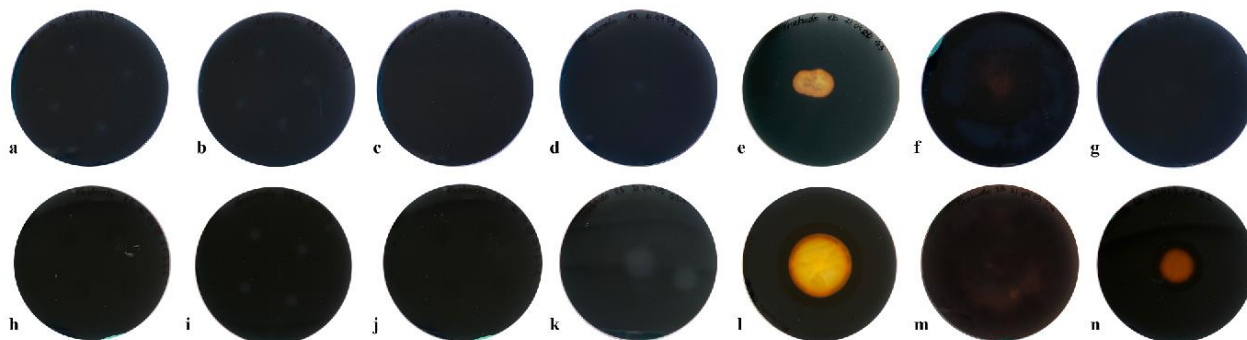
Mikroorganizmas	Auginimo laikas, d.	FI dažant Kongo Raudonuoju	FI dažant Gramo jodu
<i>Penicillium rubens</i> (G11)	3	1,58±0,07	1,44±0,03
	7	1,31±0,01	1,43±0,01
	10	1,30±0,01	1,42±0,02
<i>Sarocladium kiliense</i> (G16)	3	1,18±0,02	1,23±0,04
	7	1,19±0,02	1,26±0,02
	10	1,45±0,01	1,36±0,01

Trečioje lentelėje pateikti rezultatai rodo, kad lėkšteles dažant skirtingais būdais gaunami panašūs rezultatai, nors vizualiai atrodo, kad dažant Gramo jodu susidaro didesnės halo zonos. Šie tyrimai parodė, kad Gramo jodo naudojimas stipriai padidina halo zonos ryškumą, todėl celiuliazę gaminančių mikroorganizmų atrankos procesas tampa lengvas, efektyvus ir greitas. Nors šis metodas yra kokybinis tyrimas, didžiausi jo privalumai – paprastumas ir efektyvumas. Be to, taip išvengiama nuodingų cheminių medžiagų naudojimo (Kasana et al., 2008).

Nors Gramo jodu nudažytų lėkščių rezultatai vizualiai atrodė labiau pastebimi negu Kongo raudonojo, vis dėlto, literatūroje teigiama, kad naudojant dažiklius taikomi lėkščių atrankos metodai nėra pakankamai kiekybiniai ar jautrūs dėl blogos koreliacijos tarp fermentų aktyvumo ir halo zonos dydžio (Maki, Leung, & Qin, 2009).

3.4.2. Kokybinis metodas – amilazinio aktyvumo tikrinimas

Amilazės producentų paieška vykdoma tokiu pat principu kaip ir celiulazinio aktyvumo tikrinimas ant lėkščių, tik šiam tyrimui naudojama krakmolo agarizuota terpė. Skirtingais mikroorganizmais užsėtos lėkštelės inkubuojamos 3 ir 7 dienas, tada tikrinamas amilazinis aktyvumas lėkštelės užliejant Gramo jodu ir praplaunant distiliuotu vandeniu. Padaromos nuotraukos, gauti rezultatai pateikti 21 paveiksle.



21 pav. Mikroorganizmų amilazinio aktyvumo tikrinimas, po 3 d.: a) G1, b) G3, c) G7, d) G10, e) G11, f) G12, g) G16, po 7 d.: h) G1, i) G3, j) G7, k) G10, l) G11, m) G12, n) G16

Iš 21 paveikslą matoma, kad nei vienas iš mikroorganizmų nepasižymėjo amilaziniu aktyvumu po 3 ir 7 dienų. Gauti rezultatai nesutampa su kai kuriuose literatūros šaltiniuose pateikta informacija, todėl atliekamas amilazinis tyrimas naudojant DNS.

3.4.3. Endo- β -1,4-gliukanazinio aktyvumo tyrimas DNS reagentu

Į kolbą su distiliuotu vandeniu kaip anglies šaltinio pridedama 1 % CMC, vėliau užsėjama atitinkamu mikroorganizmu ir auginama nuo 1 iki 28 parų. Po inkubacijos celiulazinis aktyvumas

matuojamas DNS reagentu, kaip aprašyta ankstesniame skyriuje. Sugertis matuojama esant 540 nm bangos ilgiui, taip kiekybiškai išmatuojant redukuojančio cukraus kiekį. Iš sudarytos gliukozės kalibracinės kreivės apskaičiuojama mėginiuose išsiskyrusi redukuojančio cukraus koncentracija. Endo- β -1,4-gliukanazinis (CMC) aktyvumas skaičiuojamas pagal (2) formulę, o gauti rezultatai pateikiami 4 lentelėje.

3.4.4. Bendrojo celiuliazinio aktyvumo matavimas DNS reagentu

Tyrimas vykdomas analogiškai CMC tyrimui, kaip aprašyta anksčiau. Bendras celiuliazinis (FPU) aktyvumas apskaičiuojamas pagal (2) formulę, o duomenys pateikti ketvirtoje lentelėje.

4 lentelė. Mikroorganizmų celiuliazinis aktyvumas

Mikroorganizmas	Auginimo laikas, d.	CMC, U/ml	FPU, U/ml
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (G1)	3	-	-
	5	-	-
	7	-	-
	10	-	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (G3)	3	-	-
	5	-	-
	7	-	-
	10	-	-
<i>Pantoe agglomerans</i> (G7)	1	-	1,28±0,04
	2	3,21±0,19	1,53±0,07
	5	3,78±0,37	2,44±0,10
	7	6,22±0,31	2,10±0,07
<i>Penicillium citreonigrum</i> (G10)	3	27,53±0,62	8,23±0,51
	7	30,00±0,62	10,68±0,13
	10	33,08±0,62	18,80±0,28
	14	51,60±0,62	24,67±0,03
	28	92,48±0,87	36,07±0,74
<i>Penicillium rubens</i> (G11)	3	55,92±0,62	29,75±0,14
	7	86,78±0,62	42,34±0,31
	10	97,58±0,82	46,42±0,49
	14	93,42±0,29	47,74±0,49
	28	92,33±0,62	40,32±0,15
<i>Trichoderma simmonsii</i> (G12)	3	-	-
	7	-	-
	10	4,23±0,06	-
	14	4,48±0,16	-
	28	3,21±0,44	-
<i>Sarocladium kiliense</i> (G16)	3	11,53±0,33	3,01±0,07
	7	13,68±0,73	6,08±0,09
	10	17,44±0,49	11,46±0,31
	14	22,72±0,75	19,14±0,51
	28	77,99±0,71	30,57±0,94

Iš ketvirtos lentelės galima pastebėti, kad labiausiai celiuliaziniu aktyvumu pasižymėjo trys pelėsiniai grybeliai: *Penicillium citreonigrum* (G10), *Penicillium rubens* (G11) ir *Sarocladium kiliense* (G16), kurių didžiausias endo- β -1,4-gliukanazinis (CMC) aktyvumas nustatytas atitinkamai $92,48 \pm 0,87$ U/ml, $97,58 \pm 0,82$ U/ml ir $77,99 \pm 0,71$ U/ml, o bendrasis celiuliazinis (FPU) – $36,07 \pm 0,74$ U/ml, $47,74 \pm 0,49$ U/ml ir $30,57 \pm 0,94$ U/ml, atitinkamai. Iš gautų rezultatų matoma, kad *P. citreonigrum* ir *S. kiliense* didžiausias CMC aktyvumas pastebėtas praėjus 28 dienoms po inkubacijos, o *P. rubens* – po 10 dienų. Didžiausias FPU aktyvumas minėtuose mikroorganizmuose pastebėtas taip pat po 28 dienų, išskyrus *Penicillium rubens* (G11) – praėjus 14 dienų. Tuo tarpu kiti mikroorganizmai nepasižymėjo arba pasižymėjo nedideliu celiuliaziniu aktyvumu.

3.4.5. Amilazinio aktyvumo tyrimas DNS reagentu

Siekiant pamatuoti amilazinį aktyvumą kaip substratas naudojamas 1 % krakmolos. Amilazinis aktyvumas matuojamas DNS reagentu, kaip aprašyta ankstesniame skyriuje. Iš sudarytos maltozės kalibracinės kreivės apskaičiuojama mėginiuose išsiskyrusi redukuojančio cukraus koncentracija. Amilazinis aktyvumas apskaičiuojamas pagal (3) formulę, o rezultatai pateikiami lentelėje.

5 lentelė. Mikroorganizmų amilazinis aktyvumas

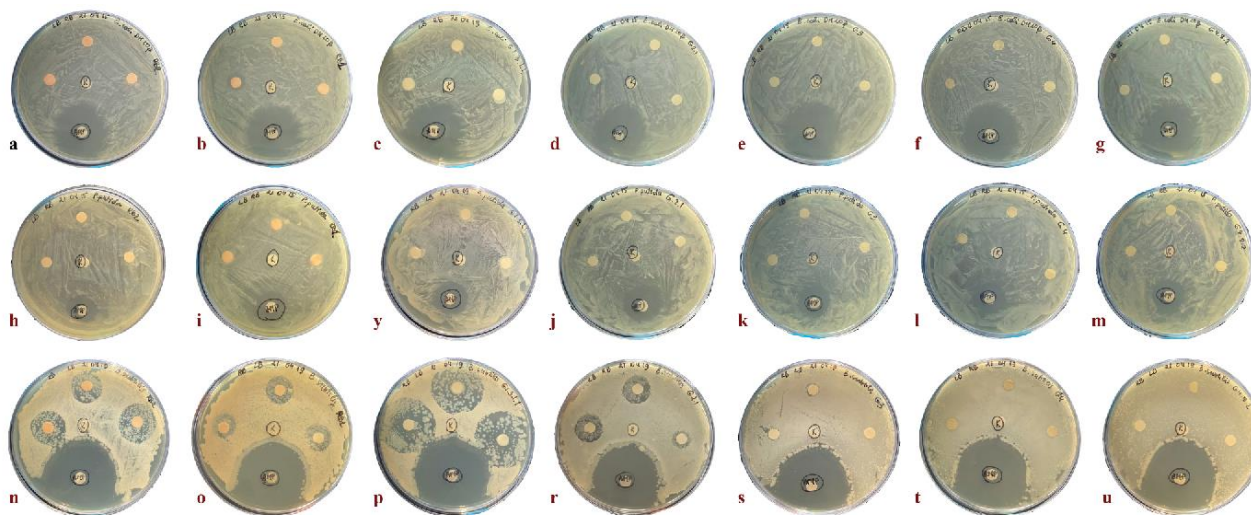
Mikroorganizmas	Amilazinis aktyvumas, U/ml
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (G1)	$20,74 \pm 0,34$
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (G3)	$32,46 \pm 0,42$
<i>Pantoe agglomerans</i> (G7)	$1,47 \pm 0,14$
<i>Penicillium citreonigrum</i> (G10)	$2,91 \pm 0,20$
<i>Penicillium rubens</i> (G11)	$2,09 \pm 0,24$
<i>Trichoderma simmonsii</i> (G12)	$2,13 \pm 0,03$
<i>Sarocladium kiliense</i> (G16)	$12,11 \pm 0,08$

Remiantis 5 lentelėje pateiktais duomenimis matoma, kad didžiausiu amilaziniu aktyvumu pasižymėjo *Rhodotorula mucilaginosa* (G1 ir G3) mielės bei *Sarocladium kiliense* (G16) pelėsinis grybelis.

Taigi, amilazinio (žr. 5 lentelę) ir celiuliazinio (žr. 4 lentelę) tyrimo duomenys sutampa su Robledo-Mahon ir kt. atliktais tyrimais, kuriuose *Rhodotorula mucilaginosa* (G1 ir G3) pasižymėjo amilaziniu ir nepasižymėjo celiuliaziniu aktyvumu (Robledo-Mahón et al., 2020). Taip pat ir kitų autorių straipsniuose teigiama, kad kai kurie *R. mucilaginosa* kamienai geba skaidyti krakmolą (Ana et al., 2015; Buzzini & Martini, 2002).

3.5. Antimikrobinių savybių tyrimas

Diskelių difuzijos metodu patikrintos tiriamų mikroorganizmų antimikrobinės savybės. Tam naudotos Gram-neigiamos (*E. coli*, *P. putida*) bei Gram-teigiamos (*B. subtilis*) bakterijos. Lėkštelės inkubuojamos 24-48 valandas, po kurių stebima ar susidarė inhibicijos zonos, rodančios mikroorganizmų antimikrobinės savybės prieš atitinkamas bakterijas. Tyrimo rezultatai pateikti 22 paveiksle.



22 pav. Mikroorganizmų antimikrobinių savybių tyrimas prieš: a) *E. coli*, b) *P. putida*, c) *B. subtilis*

Kaip minėta anksčiau, Gram-neigiamas bakterijas slopina mažiau mikroorganizmų negu Gram-teigiamas bakterijas. Tokią tendenciją iš esmės atspindi ir šio tyrimo rezultatai. Apibendrinant 22 paveiksle pateiktus rezultatus galima teigti, kad nei vienam iš tikrintų mikroorganizmų, Gram-neigiamos bakterijos (*E. coli* ir *P. putida*) jautrumo neparodė. Tuo tarpu Gram-teigiamų *Bacillus subtilis* bakterijų augimą slopino *Rhodotorula mucilaginosa* (G1 ir G3), *Pantoe agglomerans* (G7) ir *Penicillium citreonigrum* (G10) mikroorganizmai. Didžiausią aktyvumą parodė būtent *P. agglomerans* (G7) bakterijos. Išmatuota antimikrobinėmis savybėmis pasižymėjusių mikroorganizmų inhibicijos zona, o gauti rezultatai pateikti 6 lentelėje.

6 lentelė. Mikroorganizmų antimikrobinių savybių tyrimo prieš *B. subtilis* rezultatai

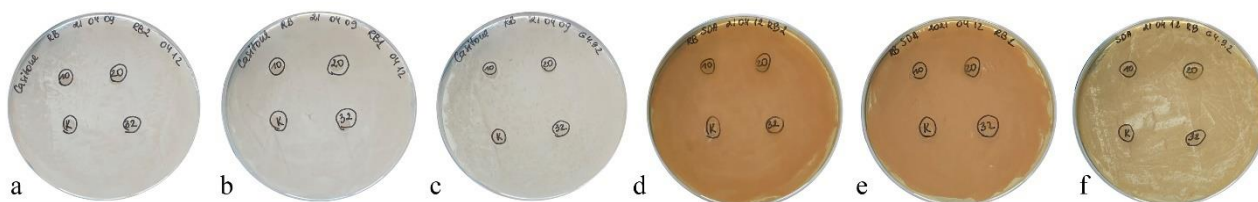
Mėginys	Inhibicijos zona, mm
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (G1)	20,00±1,15
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (G3)	15,67±1,30
<i>Pantoe agglomerans</i> (G7)	33,00±0,58
<i>Penicillium citreonigrum</i> (G10)	14,33±1,76

Remiantis šeštoje lentelėje pateiktais duomenimis galima patvirtinti, kad labiausiai *B. subtilis* bakterijas slopino *P. agglomerans* (G7). Kaip minėta ankstesniame skyriuje, *P. agglomerans* geba

gaminti antibiotikus, kurie *in vitro* veikia anaerobines bakterijas. Nors mokslinėje literatūroje nepavyko rasti informacijos apie *B. subtilis* bakterijų jautrumą *P. agglomerans*, tačiau iš gautų rezultatų matoma, kad *Pantoea agglomerans* slopino Gram-teigiamų *B. subtilis* bakterijų augimą.

3.6. Jautrumo antifungicidiniam vaistui tyrimas

Kaip minėta ankstesniame skyriuje, kai kurie *Rhodotorula mucilaginosa* mieliagrybių bei *Sarocladium killiense* pelėsinių grybelių kamienai yra jautrūs antifungicidiniam vaistui amfotericinui B. Siekiant patikrinti *Rhodotorula mucilaginosa* (G1 ir G3) ir *Sarocladium killiense* (G16) grybelių jautrumą minėtam vaistui, atliktas diskelių difuzijos metodas naudojant 10, 20 ir 32 µg/ml amfotericino B koncentracijas. Naudotos Saboro, Kazeino agarizuotos terpės bei inkubuota 48 valandas 30 °C temperatūroje.

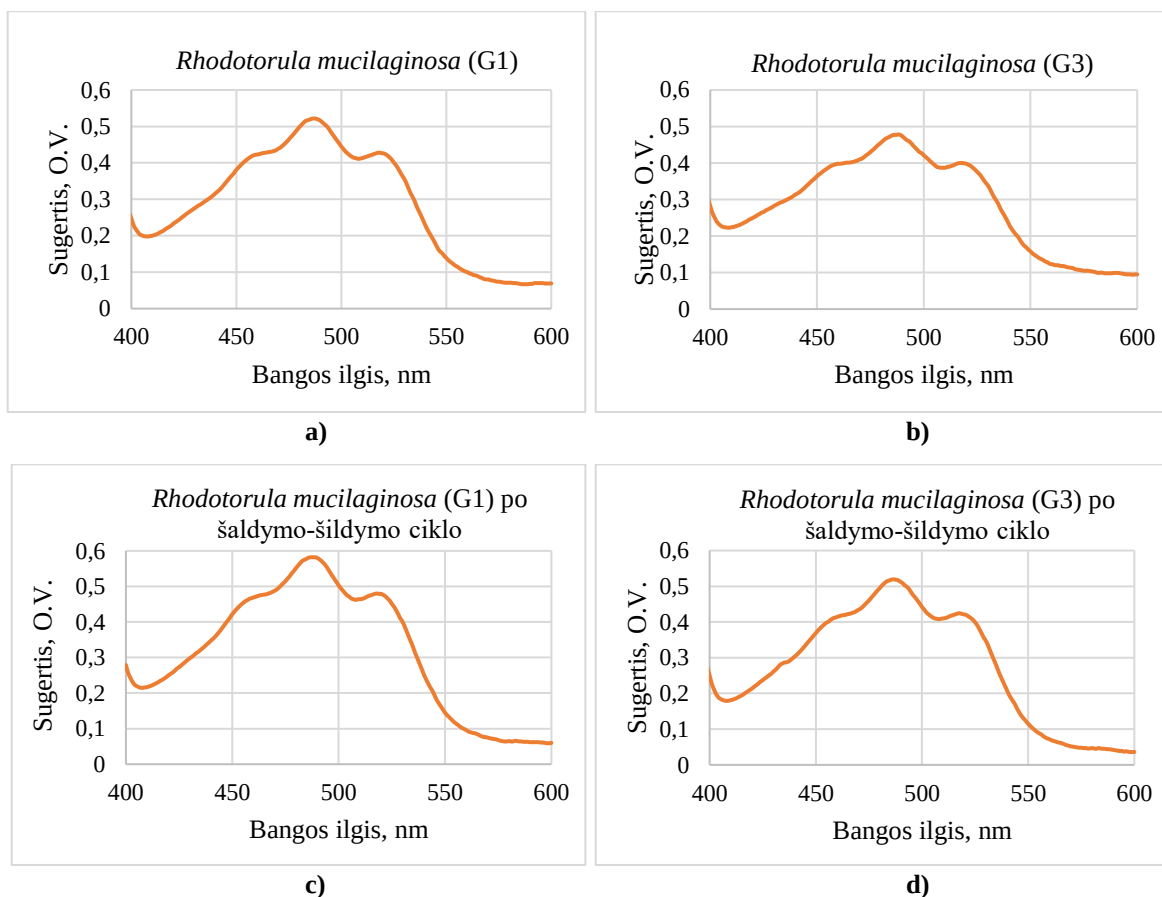


23 pav. Grybelių jautrumas amfotericinui B ant Kazeino agaro: a) G1, b) G3, c) G16; ant SDA: d) G1, e) G3, f) G16

23 paveiksle matoma, kad *Rhodotorula mucilaginosa* (G1 ir G3) bei *Sarocladium killiense* (G16) nepasižymėjo jautrumu antifungicidui. Tyrimo rezultatai sutampa su Khan ir kt. autorių rezultatais, kadangi *S. killiense* pasirodė atsparus net ir 32 µg/ml amfotericinui B (Khan et al., 2011). Tuo tarpu gauti rezultatai nesutampa su Seifi ir kt. rezultatais, kadangi autorių tyrime naudotas *R. mucilaginosa* kamienas pasižymėjo jautrumu amfotericinui B (Seifi et al., 2013). Galima to priežastis – tyrime naudoti grybelių kamienai nėra jautrūs naudotam antifungicidiniam vaistui.

3.7. Karotenoidų ekstrakcija iš mielių

Siekiant išskirti karotenoidus, kolbos su YM terpe ir mėginiais augintos purtant 3 paras 25 °C temperatūroje. Norint palyginti ląstelės sienelės suardymą, atliekamas žinomas ir modifikuotas tyrimas – prieš ardant ultragarsu, mėginiai 3 kartus pakartotinai užšaldomi-atšildomi. Ultragarsas 30 sekundžių intervalais vykdomas 3 minutes. Gauto karotenoidų ekstrakto spektras matuojamas 400-600 nm bangos ilgio intervale ir yra pateiktas 24 paveiksle. Pagal išmatuotus spektrus apskaičiuotos karotenoidų ekstrakcijos išeigos rezultatai pateikiami 7 lentelėje.



24 pav. Karotenoidų ekstrakcijos spektrai– sugerties priklausomybė nuo bangos ilgio: a) G1, b) G3, c) G1 po šaldymo-šildymo ciklo, d) G3 po šaldymo-šildymo ciklo

Kaip minėta ankstesniame skyriuje, karotenoidų ekstrakcijos išeiga apskaičiuojama naudojant β -karoteno heksane molinį ekstinkcijos koeficientą esant 453 nm bangos ilgio, išreiškiama mg karotenoidų/l suspensijos, naudojant (4) lygtį. Naudojant tą pačią lygtį apskaičiuojamos toruleno (esant 485 nm) bei torularodino (esant 468 ir 502 nm bangos ilgiui) ekstrakcijos išeigos heksane.

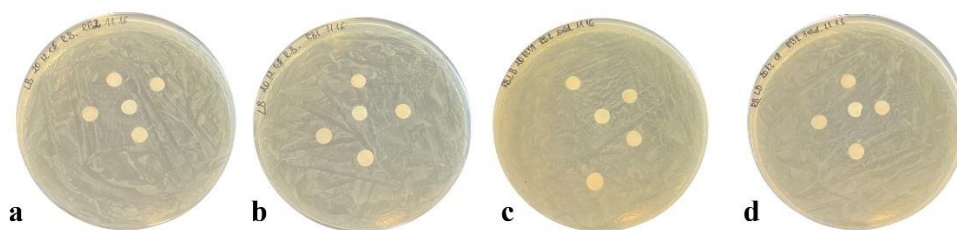
7 lentelė. Karotenoidų ekstrakcijos išeigos

Mikroorganizmas	Karotenoidai (mg/l)	Torulenas (mg/l)	Torularodinas (mg/l) (468 nm)	Torularodinas (mg/l) (502 nm)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (G1)	1,57±0,03	1,80±0,06	2,07±0,03	2,03±0,07
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (G3)	1,73±0,15	1,93±0,09	2,27±0,18	2,27±0,15
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (G1) po šaldymo-šildymo ciklo	1,76±0,07	2,07±0,07	2,43±0,03	2,43±0,03
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (G3) po šaldymo-šildymo ciklo	1,97±0,33	2,20±0,21	2,57±0,42	2,57±0,37

Apibendrinant (24 pav.) diagramoje pateiktus duomenis, galima pasakyti, kad didžiausias pikas visuose grafikuose matomas esant 485 nm, o tai atitinka toruleno sugerties bangos ilgį, tačiau iš 7 lentelės matome, kad didžiausia torularodino išeiga (esant 468 nm ir 502 nm bangos ilgiui) gauta būtent tuose *Rhodotorula mucilaginosa* raudonųjų mielių G1 ir G3 mėginiuose, kurie prieš ardant ultragarsu buvo tris kartus paveikti šaldymo-šildymo ciklais.

3.8. Mielių karotenoidų antibakterinių savybių tyrimas

Išskirtų karotenoidų antibakterinės savybės tikrinamos prieš *E. coli* DH10 β kamieną diskelių difuzijos metodu. Lėkštelės inkubuojamos 24 valandas 37 °C temperatūroje.



25 pav. Karotenoidų antibakterinių savybių tyrimas: a) G1, b) G3; po šaldymo-šildymo ciklo: c) G1, d) G3

25 paveiksle pavaizduotos karotenoidų, išskirtų ardant mielių ląsteles ultragarsu, tiek įprastu metodu, tiek modifikuotu – prieš veikiant ultragarsu mėginiai buvo 3 kartus pakartotinai užšaldomi-atšildomi, antibakterinės savybės prieš Gram-neigiamų bakterijų *E. coli* DH10 β kamieną. Iš pateikto paveikslo galima pastebėti, kad nėra matomų halo zonų, vadinasi išskirti karotenoidai nepasižymi antibakterinėmis savybėmis prieš *E. coli* DH10 β kamieną.

IŠVADOS

1. Iš 14 pavienių mikroorganizmų identifikuoti 6 skirtingi: po vieną bakteriją, mielių ir 4 pelėsinių grybelių rūšys.
2. Nustatytas mikroorganizmų celiuliazinis ir amilazinis aktyvumai.
 - Labiausiai celiuliaziniu aktyvumu pasižymėjo pelėsiniai grybeliai *Penicillium citreonigrum* NRRL 761 (G10) ir *Penicillium rubens* CBS 129667 (G11), kurių didžiausias CMC aktyvumas $92,48 \pm 0,87$ U/ml ir $97,58 \pm 0,82$ U/ml, o FPU – $36,07 \pm 0,74$ U/ml ir $47,74 \pm 0,49$ U/ml, atitinkamai.
 - Didžiausiu amilaziniu aktyvumu ($32,46 \pm 0,42$ U/ml) pasižymėjo mieliagrybis *Rhodotorula mucilaginosa* CBS 316 (G3).
3. Iš išskirtų mikroorganizmų stipriausiomis antimikrobinėmis savybėmis pasižymėjo *Pantoea agglomerans* JCM1236 (G10) bakterijos, kurios sudarė $33,00 \pm 0,58$ mm inhibicijos zoną prieš *B. subtilis*.
4. Išskirti bendrieji karotenoidai, nustatytas torularodino ir toruleno kiekis mišinyje. Didžiausias toruleno ($2,20 \pm 0,21$ mg/l) ir torularodino ($2,57 \pm 0,37$ mg/l) kiekis nustatytas *Rhodotorula mucilaginosa* CBS 316 (G3) po šaldymo-šildymo ciklo. Išskirtas karotenoidų mišinys nepasižymėjo antibakterinėmis savybėmis prieš Gram-neigiamų bakterijų *E. coli* DH10β kamieną.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Abedin, J. I. (2015). *Isolation and identification of cellulose degrading bacteria from soil sample*. BRAC University.
- Acioly, L. M. L., Carlos, V. J., Barbosa da Silveira, A., Gomes de Almeida, F. C., Lima e Silva, T. A. de, & Campos Takaki, G. M. de. (2017). Isolation, Identification, Characterization and Enzymatic Profile of the New Strain of *Pantoea agglomerans*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(11), 4152–4163. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.611.487>
- Aciu, C., Varvara, D. A. I. –, Cobirzan, N., & Balog, A. (2014). Recycling of Paper Waste in the Composition of Plastering Mortars. *Procedia Technology*, 12, 295–300. <https://doi.org/10.1016/j.protcy.2013.12.489>
- Al-Turki, A. I., Al-Hassan, A., & M.M., A.-R. (2016). Isolation and characterization of carotenoid producing yeasts from Qassim region. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 14, 20–23.
- Albores, S., Sanguinedo, P., Held, B. H., Cerdeiras, M. P., & Blanchette, R. A. (2018). Biodiversity and antimicrobial activity of Antarctic fungi from the Fildes Peninsula, King George Island. *Sydowia*, 70(August), 185–192. <https://doi.org/10.12905/0380.sydowia70-2018-0185>
- Ana, P. A. de O., Maria, A. S., Heloiza, F. A.-P., Andre, R., Marcelo, F. da P., Gustavo, G. F., & Rodrigo, S. R. L. (2015). Bioprospecting of yeasts for amylase production in solid state fermentation and evaluation of the catalytic properties of enzymatic extracts. *African Journal of Biotechnology*, 14(14), 1215–1223. <https://doi.org/10.5897/ajb2014.14062>
- Arundel, A. V., Sterling, E. M., Biggin, J. H., & Sterling, T. D. (1986). Indirect Health Effects of Relative Humidity in Indoor Environments. *Environmental Health Perspectives*, VOL. 65(3), 351–361. <https://doi.org/10.1289/ehp.8665351>
- Barman, D., & Dkhar, M. S. (2015). Amylolytic activity and its parametric optimization of an endophytic bacterium *Bacillus subtilis* with an ethno-medicinal origin. *Biologia*, 70(3), 283–293. <https://doi.org/10.1515/biolog-2015-0047>
- Batt, C. A. (2016). Food Safety, Defense, and Microbiology. In *Reference Module in Food Science*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.03422-3>
- Baughman, A. V., & Arens, E. A. (1996). Indoor Humidity and Human Health--Part I: Literature Review of Health Effects of Humidity- Influenced Indoor Pollutants. *ASHRAE Transactions*, 102(1), 193–211.

- Bekker, M. (2014). *Growth of Penicillium rubens after desiccation* (Technische Universiteit Eindhoven). <https://doi.org/10.6100/IR774541>
- Bekker, M., Erich, S. J. F., Hermanns, S. P. M., van Maris, M. P. F. H. L., Huinink, H. P., & Adan, O. C. G. (2015). Quantifying discoloration caused by the indoor fungus *Penicillium rubens* on building material at controlled humidity. *Building and Environment*, 90, 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2015.03.020>
- Bekker, M., Huinink, H. P., Adan, O. C. G., Samson, R. A., Wyatt, T., & Dijksterhuis, J. (2012). Production of an Extracellular Matrix as an Isotropic Growth Phase of *Penicillium rubens* on Gypsum. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(19), 6930–6937. <https://doi.org/10.1128/AEM.01506-12>
- Benjamin, S., Smitha, R. B., Jisha, V. N., Pradeep, S., Sajith, S., Sreedevi, S., ... Josh, M. K. S. (2013). A monograph on amylases from *Bacillus* spp. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4(2), 227–241. <https://doi.org/10.4236/abb.2013.42032>
- Bishop, J., & McCue, P. M. (2014). Microbiology: Gram Stain. In J. J. Dascanio & P. M. McCue (Eds.), *Equine Reproductive Procedures* (pp. 51–52). <https://doi.org/10.1002/9781118904398.ch15>
- Bougnoux, M. E., Brun, S., & Zahar, J. R. (2018). Healthcare-associated fungal outbreaks: New and uncommon species, New molecular tools for investigation and prevention. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0338-9>
- Bozsaky, D. (2019). Nature-Based Thermal Insulation Materials From Renewable Resources – A State-Of-The-Art Review. *Slovak Journal of Civil Engineering*, 27(1), 52–59. <https://doi.org/10.2478/sjce-2019-0008>
- Buzzini, P., & Martini, A. (2002). Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. *Journal of Applied Microbiology*, 93(6), 1020–1025. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01783.x>
- Carrasco, M., Villarreal, P., Barahona, S., Alcaíno, J., Cifuentes, V., & Baeza, M. (2016). Screening and characterization of amylase and cellulase activities in psychrotolerant yeasts. *BMC Microbiology*, 16(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0640-8>
- Chaverri, P., Branco-Rocha, F., Jaklitsch, W., Gazis, R., Degenkolb, T., & Samuels, G. J. (2015). Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*, 107(3), 558–590. <https://doi.org/10.3852/14-147>
- Chinedu, S. N., Okochi, V. I., & Omidiji, O. (2011). Cellulase Production By Wild Strains of

- Aspergillus Niger*, *Penicillium Chrysogenum* and *Trichoderma Harzianum* Grown on Waste Cellulosic Materials. *Cellulase Production By Wild Strains of Aspergillus Niger, Penicillium Chrysogenum and Trichoderma Harzianum Grown on Waste Cellulosic Materials.*, 13(1), 161–174. <https://doi.org/10.4314/ijs.v13i1>
- Collins, C. H., Lyne, P. M., Grange, J. M., & Falkinham III, J. O. (2004). Collins and Lyne's Microbiological Methods. In *Arnold* (8th ed.). Arnold.
- Cologna, N. de M. di, Gómez-Mendoza, D. P., Zanoelo, F. F., Giannesi, G. C., Guimarães, N. C. de A., Moreira, L. R. de S., ... Ricart, C. A. O. (2018). Exploring *Trichoderma* and *Aspergillus* secretomes: Proteomics approaches for the identification of enzymes of biotechnological interest. *Enzyme and Microbial Technology*, 109, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.08.007>
- Coronado-Ruiz, C., Avendaño, R., Escudero-Leyva, E., Conejo-Barboza, G., Chaverri, P., & Chavarría, M. (2018). Two new cellulolytic fungal species isolated from a 19th-century art collection. *Scientific Reports*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24934-7>
- Damaso, M. C. T., Terzi, S. da C., Farias, A. X., de Oliveira, A. C. P., Fraga, M. E., & Couri, S. (2012). Selection of Cellulolytic Fungi Isolated from Diverse Substrates. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55(4), 513–520. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132012000400005>
- Delalibera, I., Handelsman, J., & Raffa, K. F. (2005). Contrasts in Cellulolytic Activities of Gut Microorganisms Between the Wood Borer, *Saperda vestita* (Coleoptera: Cerambycidae), and the Bark Beetles, *Ips pini* and *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Curculionidae). *Environmental Entomology*, 34(3), 541–547. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-34.3.541>
- Dodds, W. K., & Whiles, M. R. (2020). Microbes and Plants. In *Freshwater Ecology*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813255-5.00009-0>
- Dutkiewicz, J., Mackiewicz, B., Lemieszek, M. K., Golec, M., & Milanowski, J. (2016). *Pantoea agglomerans*: A mysterious bacterium of evil and good. Part IV. Beneficial effects. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 23(2), 206–222. <https://doi.org/10.5604/12321966.1203879>
- Dykhuisen, D. (2005). Species Numbers in Bacteria. *Proceedings. California Academy of Sciences*, 56(6 Suppl 1), 62–71.
- Ettenauer, J., Piñar, G., Tafer, H., & Sterflinger, K. (2014). Quantification of fungal abundance on cultural heritage using real time PCR targeting the β -actin gene. *Frontiers in Microbiology*, 5, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00262>
- Fernández-Silva, F., Capilla, J., Mayayo, E., Sutton, D., & Guarro, J. (2014). In Vitro Evaluation of

- Antifungal Drug Combinations against *Sarocladium (Acremonium) kiliense*, an Opportunistic Emergent Fungus Resistant to Antifungal Therapies Fabiola. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(2), 1259–1260. <https://doi.org/10.1128/AAC.02131-13>
- Florencio, C., Couri, S., & Farinas, C. S. (2012). Correlation between Agar Plate Screening and Solid-State Fermentation for the Prediction of Cellulase Production by *Trichoderma* Strains. *Enzyme Research*, 2012(January 2014). <https://doi.org/10.1155/2012/793708>
- Freivalde, L., Kukle, S., Andžs, M., Bukšans, E., & Gravitis, J. (2014). Flammability of raw insulation materials made of hemp. *Composites Part B: Engineering*, 67, 510–514. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2014.08.007>
- Fung, H. B., Martyn, C. A., Shahidi, A., & Brown, S. T. (2009). *Rhodotorula mucilaginosa* lymphadenitis in an HIV-infected patient. *International Journal of Infectious Diseases*, 13(1). <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2008.04.006>
- Garcia, A., Rhoden, S. A., Bernardi-Wenzel, J., Orlandelli, R. C., Azevedo, J. L., & Pamphile, J. A. (2012). Antimicrobial Activity of Crude Extracts of Endophytic Fungi Isolated from Medicinal Plant *Sapindus saponaria* L. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(10), 035–040. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2012.21007>
- Ghose.T.K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Applied Chemistry Division Commission on Biotechnology*, 59(5), 695–702.
- Giraldo, A., Gené, J., Sutton, D. A., Madrid, H., de Hoog, G. S., Cano, J., ... Guarro, J. (2015). Phylogeny of *Sarocladium (Hypocreales)*. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 34, 10–24. <https://doi.org/10.3767/003158515X685364>
- Godon, J. J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F., & Moletta, R. (1997). Molecular Microbial Diversity of an Anaerobic Digester as Determined by Small-Subunit rDNA Sequence Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(7), 2802–2813. <https://doi.org/10.1128/aem.63.7.2802-2813.1997>
- Gohel, H. R., Contractor, C. N., Ghosh, S. K., & Braganza, V. J. (2014). A comparative study of various staining techniques for determination of extra cellular cellulase activity on Carboxy Methyl Cellulose (CMC) agar plates. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(5), 261–266.
- Gonçalves, C., Rodriguez-Jasso, R. M., Gomes, N., Teixeira, J. A., & Belo, I. (2010). Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. *Analytical Methods*, 2(12), 2046–2048. <https://doi.org/10.1039/c0ay00525h>

- Grimont, P. A. D., & Grimont, F. (2015). *Pantoea*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–14. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01157>
- Gusakov, A. V., & Sinitsyn, A. P. (2012). Cellulases from *Penicillium* species for producing fuels from biomass. *Biofuels*, 3(4), 463–477. <https://doi.org/10.4155/bfs.12.41>
- Hajj, N. El, Mboumba-Mamboundou, B., Dheilly, R. M., Aboura, Z., Benzeggagh, M., & Queneudec, M. (2011). Development of thermal insulating and sound absorbing agro-sourced materials from auto linked flax-tows. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 921–928. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.02.012>
- Heggebø, A. C. (2014). *Risk for mould growth in insulation materials*. Norwegian University of Science and Technology.
- Hodges, N. (2003). Identification of micro-organisms. *Handbook of Microbiological Quality Control in Pharmaceuticals and Medical Devices*, 69–85. https://doi.org/10.4324/9780203305195_chapter_5
- Houbraken, J., Frisvad, J. C., Seifert, K. A., Overby, D. P., Tuthill, D. M., Valdez, J. G., & Samson, R. A. (2012). New penicillin-producing *Penicillium* species and an overview of section Chrysogena. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 29, 78–100. <https://doi.org/10.3767/003158512X660571>
- Hu, K., Zhu, X. L., Mu, H., Ma, Y., Ullah, N., & Tao, Y. S. (2016). A novel extracellular glycosidase activity from *Rhodotorula mucilaginosa*: Its application potential in wine aroma enhancement. *Letters in Applied Microbiology*, 62(2), 169–176. <https://doi.org/10.1111/lam.12527>
- Isler, O., Lindlar, H., Montavon, M., Rüegg, R., & Zeller, P. (1956). Synthesen in der Carotinoid-Reihe. 1. Mitteilung. Die technische Synthese von β -Carotin. *Helvetica Chimica Acta*, 39(1), 249–259. <https://doi.org/10.1002/hlca.19560390128>
- Júnior, M. C., de Moraes Arantes, A., Silva, H. M., Costa, C. R., & Silva, M. do R. R. (2013). *Acremonium kiliense*: Case Report and Review of Published Studies. *Mycopathologia*, 176, 417–421. <https://doi.org/10.1007/s11046-013-9700-x>
- Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., & Gulati, A. (2008). A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. *Current Microbiology*, 57(5), 503–507. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9276-8>
- Khan, Z., Al-Obaid, K., Ahmad, S., Ghani, A. A., Joseph, L., & Chandy, R. (2011). *Acremonium kiliense*: Reappraisal of Its Clinical Significance. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(6), 2342–2347. <https://doi.org/10.1128/JCM.02278-10>

- Khetmalas, M. B., Bal, A. K., Noble, L. D., & Gow, J. A. (1996). *Pantoea agglomerans* is the etiological agent for black spot necrosis on beach peas. *Canadian Journal of Microbiology*, 42, 1252–1257. <https://doi.org/10.1139/m96-162>
- Kisová, Z., Šoltýsová, A., Bučková, M., Beke, G., Puškárová, A., & Pangallo, D. (2020). Studying the Gene Expression of *Penicillium rubens* Under the Effect of Eight Essential Oils. *Antibiotics*, 9(6), 1–14. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060343>
- Klamer, M., Morsing, E., & Husemoen, T. (2004). Fungal growth on different insulation materials exposed to different moisture regimes. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 54(4), 277–282. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2004.03.016>
- Kot, A., Błażej, S., Gientka, I., Kieliszek, M., & Bryś, J. (2018). Torulene and torularhodin: “New” fungal carotenoids for industry? *Microbial Cell Factories*, 17(49), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0893-z>
- Krzyściak, P., & Macura, A. B. (2010). Drug susceptibility of 64 strains of *Rhodotorula* sp. *Wiadomości Parazytologiczne*, 56(2), 167–170.
- Lal, R., & Mishra, M. M. (1978). Cellulolytic Activity of Some Soil Fungi. *Folia Microbiologica*, 23(1), 68–71. <https://doi.org/10.1007/BF02876599>
- Larena, I., Salazar, O., Gonza, V., Julian, M. C., & Rubio, V. (1999). Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. *Journal of Biotechnology*, 75, 187–194. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(99\)00154-6](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(99)00154-6)
- Legodi, L. M., La Grange, D., Van Rensburg, E. L. J., & Ncube, I. (2019). Isolation of Cellulose Degrading Fungi from Decaying Banana Pseudostem and *Strelitzia alba*. *Enzyme Research*, 2019, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2019/1390890>
- Libkind, D., Pérez, P., Sommaruga, R., Diéguez, M. del C., Marcela Ferraro, S. B., Zagarese, H., & Broock, M. van. (2004). Constitutive and UV-inducible synthesis of photoprotective compounds (carotenoids and mycosporines) by freshwater yeasts. *Photochemical & Photobiological Sciences : Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 3, 281–286. <https://doi.org/10.1039/b310608j>
- Liu, L. F., Li, H. Q., Lazzaretto, A., Manente, G., Tong, C. Y., Liu, Q. Bin, & Li, N. P. (2017). The development history and prospects of biomass-based insulation materials for buildings. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. 69, pp. 912–932. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.140>
- Maki, M., Leung, K. T., & Qin, W. (2009). The prospects of cellulase-producing bacteria for the

- bioconversion of lignocellulosic biomass. *International Journal of Biological Sciences*, 5(5), 500–516. <https://doi.org/10.7150/ijbs.5.500>
- Manaka, A., Tokue, Y., & Murakami, M. (2017). Comparison of 16S ribosomal RNA gene sequence analysis and conventional culture in the environmental survey of a hospital. *Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences*, 3(8), 1-6. <https://doi.org/10.1186/s40780-017-0074-y>
- Marlida, Y., Saari, N., Hassan, Z., & Radu, S. (2000). Raw starch-degrading enzyme from newly isolated strains of endophytic fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 573–578. <https://doi.org/10.1023/A:1008935814516>
- Marova, I., Certik, M., & Breierov, E. (2011). Production of Enriched Biomass by Carotenogenic Yeasts - Application of Whole-Cell Yeast Biomass to Production of Pigments and Other Lipid Compounds. In D. Matovic (Ed.), *Biomass - Detection, Production and Usage*. <https://doi.org/10.5772/19235>
- Martínez, J. M., Delso, C., Aguilar, D. E., Álvarez, I., & Raso, J. (2019). Organic-solvent-free extraction of carotenoids from yeast *Rhodotorula glutinis* by application of ultrasound under pressure. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 61. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104833>
- Martínez, J. M., Delso, C., Álvarez, I., & Raso, J. (2020). Pulsed electric field-assisted extraction of valuable compounds from microorganisms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(2), 1–23. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12512>
- Martínez, J. M., Delso, C., Angulo, J., Álvarez, I., & Raso, J. (2018). Pulsed electric field-assisted extraction of carotenoids from fresh biomass of *Rhodotorula glutinis*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 47, 421–427. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.04.012>
- Martínez, J. M., Schottroff, F., Haas, K., Fauster, T., Sajfrtová, M., Álvarez, I., ... Jaeger, H. (2020). Evaluation of pulsed electric fields technology for the improvement of subsequent carotenoid extraction from dried *Rhodotorula glutinis* yeast. *Food Chemistry*, 323, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126824>
- Mata-Gómez, L., Montanez, J., Zavala, A., & Aguilar, C. (2014). Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Factories*, 13, 12. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-12>
- Mcdonald, J. E., Rooks, D. J., & Mccarthy, A. J. (2012). Methods for the Isolation of Cellulose-Degrading Microorganisms. In H. J. Gilbert (Ed.), *Cellulases* (Vol. 510, pp. 349–374). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415931-0.00019-7>
- Miller, G. L., Blum, R., Glennon, W. E., & Anne L. Burton. (1960). Measurement of

- Carboxymethylcellulase Activity. *Analytical Biochemistry*, 1(2), 127–132. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(60\)90004-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(60)90004-X)
- Miller, J. D., & McMullin, D. R. (2014). Fungal secondary metabolites as harmful indoor air contaminants: 10 years on. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(24), 9953–9966. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6178-5>
- Mojsov, K. D. (2016). *Aspergillus* Enzymes for Food Industries. In V. K. Gupta (Ed.), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Aspergillus System Properties and Applications* (pp. 215–222). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63505-1.00033-6>
- Mukesh Srivastava, S. P. (2015). *Trichoderma* species Cellulases Produced by Solid State Fermentation. *Journal of Data Mining in Genomics & Proteomics*, 6(2), 1–4. <https://doi.org/10.4172/2153-0602.1000170>
- Okano, T., Kobayashi, N., Izawa, K., Yoshinari, T., & Sugita-Konishi, Y. (2020). Whole Genome Analysis Revealed the Genes Responsible for Citreoviridin Biosynthesis in *Penicillium citreonigrum*. *Toxins*, 12(2), 1–10. <https://doi.org/10.3390/toxins12020125>
- Park, M. S., Kim, S. H., Lee, J. W., Kim, J. S., Cho, Y., & Lim, Y. W. (2020). Two Unrecorded Species Belonging to *Penicillium* Section *Exilicaulis* in South Korea. *The Korean Journal of Mycology*, 48(3), 175–185. <https://doi.org/https://doi.org/10.4489/KJM.20200019>
- Pérez-Cantero, A., & Guarro, J. (2020). *Sarocladium* and *Acremonium* infections: New faces of an old opportunistic fungus. *Mycoses*, 63(11), 1203–1214. <https://doi.org/10.1111/myc.13169>
- Peterson, S. W., Pérez, J., Vega, F. E., & Infante, F. (2003). *Penicillium brocae*, a new species associated with the coffee berry borer in Chiapas, Mexico. *Mycologia*, 95(1), 141–147. <https://doi.org/10.1080/15572536.2004.11833143>
- Pohl, C., Polli, F., Schütze, T., Viggiano, A., Mózsik, L., Jung, S., ... Driessen, A. J. M. (2020). A *Penicillium rubens* platform strain for secondary metabolite production. *Scientific Reports*, 10(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64893-6>
- Price, D. L., Simmons, R. B., Crow, S. A., & Ahearn, D. G. (2005). Mold colonization during use of preservative-treated and untreated air filters, including HEPA filters from hospitals and commercial locations over an 8-year period (1996-2003). *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32(7), 319–321. <https://doi.org/10.1007/s10295-005-0226-1>
- Quintero, J. A., Rincón, L. E., & Cardona, C. A. (2011). Production of Bioethanol from Agroindustrial Residues as Feedstocks. In A. Pandey, C. Larroche, S. C. Rick, C.-G. Dussap, & E. Gnansounou (Eds.), *Biofuels* (pp. 251–285). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385099-7.00011-5>

- Rahman, M. S., Fernando, S., Ross, B., Wu, J., & Qin, W. (2018). Endoglucanase (EG) Activity Assays. In L. M. (Ed.), *Cellulases: Methods and Protocols* (pp. 169–183). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7877-9_13
- Rapoport, A., Guzhova, I., Bernetti, L., Buzzini, P., Kieliszek, M., & Kot, A. M. (2021). Carotenoids and Some Other Pigments from Fungi and Yeasts. *Metabolites*, 11(2), 1–17. <https://doi.org/10.3390/metabo11020092>
- Robledo-Mahón, T., Calvo, C., & Aranda, E. (2020). Enzymatic Potential of Bacteria and Fungi Isolates from the Sewage Sludge Composting Process. *Applied Sciences (Switzerland)*, 10(21), 1–13. <https://doi.org/10.3390/app10217763>
- Saini, J., Dutta, M., & Marques, G. (2020). Indoor Air Quality Monitoring Systems Based on Internet of Things: A Systematic Review Jagriti. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(14), 1–22. <https://doi.org/10.3390/ijerph17144942>
- Sakthi, S. S., Kanchana, D., Saranraj, P., & Usharani, G. (2012). Evaluation of amylase activity of the amylolytic fungi *Aspergillus niger* using cassava as substrate. *International Journal of Applied Microbiology Science*, 1, 24–34.
- Samson, R. A. (2011). Ecology and general characteristics of indoor fungi. In O. C. G. Adan & R. A. Samson (Eds.), *Fundamentals of mold growth in indoor environments and strategies for healthy living* (pp. 101–116). https://doi.org/10.3920/978-90-8686-722-6_5
- Sandhu, D. K., Vilku, K. S., & Soni, S. K. (1987). Production of α -Amylase by *Saccharomycopsis fibuligera* (Syn. *Endomycopsis fibuligera*). *Journal of Fermentation Technology*, 65(4), 387–394. [https://doi.org/10.1016/0385-6380\(87\)90134-8](https://doi.org/10.1016/0385-6380(87)90134-8)
- Saranraj, P., & Stella, D. (2013). Fungal Amylase-A Review. *International Journal of Microbiological Research*, 4(2), 203–211. <https://doi.org/10.5829/idosi.ijmr.2013.4.2.75170>
- Sassoni, E., Manzi, S., Motori, A., Montecchi, M., & Canti, M. (2015). Experimental study on the physical-mechanical durability of innovative hemp-based composites for the building industry. *Energy and Buildings*, 104, 316–322. <https://doi.org/10.1016/j.enbuild.2015.07.022>
- Sawant, A. M., Vankudoth, R., Navale, V., Kumavat, R., Kumari, P., Santhakumari, B., & Vamkudoth, K. R. (2019). Morphological and molecular characterization of *Penicillium rubens* sp.nov isolated from poultry feed. *Indian Phytopathology*, 72, 461–478. <https://doi.org/10.1007/s42360-019-00165-2>
- Sciortino, C. V. (2017). Dematiaceous Fungi (Septate). In C. V. Sciortino (Ed.), *Atlas of Clinically Important Fungi* (1st ed., pp. 283–458). <https://doi.org/doi.org/10.1002/9781119069720.ch9>

- Segers, F. J. J., van Laarhoven, K. A., Huinink, H. P., Adan, O. C. G., Wösten, H. A. B., & Dijksterhuis, J. (2016). The Indoor Fungus *Cladosporium halotolerans* Survives Humidity Dynamics Markedly Better than *Aspergillus niger* and *Penicillium rubens* despite Less Growth at Lowered Steady-State Water Activity Frank. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(17), 5089–5098. <https://doi.org/10.1128/AEM.00510-16>
- Seifi, Z., Zarei Mahmoudabadi, A., & Hydrinia, S. (2013). Isolation, Identification and Susceptibility Profile of *Rhodotorula* Species Isolated From Two Educational Hospitals in Ahvaz. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 6(6), 1–7. <https://doi.org/10.5812/jjm.8935>
- Shoa, N. (2019). Isolation and Characterization of Amylase Enzyme from Selected Fungal Strains of Wof Washa Forest of. *Scientific Journal of Biology & Life Sciences*, 1–10.
- Shrestha, A., Toyota, K., Okazaki, M., Suga, Y., Quevedo, M. A., Loreto, A. B., & Mariscal, A. A. (2007). Enhancement of Nitrogen-fixing Activity of Enterobacteriaceae Strains Isolated from Sago Palm (*Metroxylon sagu*) by Microbial Interaction with Non-nitrogen Fixers. *Microbes and Environments*, 22(1), 59–70. <https://doi.org/10.1264/jsme2.22.59>
- Starmer, W. T., & Lachance, M. A. (2011). Yeast ecology. *The Yeasts*, 1(1987), 65–83. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00006-9>
- Sterflinger, K., Ettenauer, J., & Piñar, G. (2013). Bio-susceptibility of materials and thermal insulation systems used for historical buildings. *Energy Procedia*, 40, 499–506. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2013.08.057>
- Suchorab, Z., Frąc, M., Guz, Ł., Oszust, K., Łagód, G., Gryta, A., ... Czerwiński, J. (2019). A method for early detection and identification of fungal contamination of building materials using e-nose. *PLoS ONE*, 14(4), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215179>
- Sujeeta, Malik, K., Mehta, S., & Sihag, K. (2017). Isolation and Screening of Amylase Producing Fungi. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(4), 783–788. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.604.098>
- Sunitha, V. H., Ramesha, A., Savitha, J., & Srinivas, C. (2012). Amylase production by endophytic fungi *Cylindrocephalum* sp. isolated from medicinal plant *Alpinia calcarata* (Haw.) Roscoe. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43, 1213–1221. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220120003000049>
- Tkáčová, J., Furdíková, K., Klempová, T., Ďurčanská, K., & Certík, M. (2015). Screening of carotenoid-producing *Rhodotorula* strains isolated from natural sources. *Acta Chimica Slovaca*, 8(1), 34–38. <https://doi.org/10.1515/acs-2015-0007>

- Torres, A. R., Araújo, W. L., Cursino, L., Hungria, M., Plotegher, F., Mostasso, F. L., & Azevedo, J. L. (2008). Diversity of Endophytic Enterobacteria Associated with Different Host Plants. *Journal of Microbiology*, 46(4), 373–379. <https://doi.org/10.1007/s12275-007-0165-9>
- van Laarhoven, K. A., Huinink, H. P., & Adan, O. C. G. (2016). A microscopy study of hyphal growth of *Penicillium rubens* on gypsum under dynamic humidity conditions. *Microbial Biotechnology*, 9(3), 408–418. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12357>
- van Laarhoven, K. A., Huinink, H. P., Segers, F. J. J., Dijksterhuis, J., & Adan, O. C. G. (2015). Separate effects of moisture content and water activity on the hyphal extension of *Penicillium rubens* on porous media. *Environmental Microbiology*, 17(12), 5089–5099. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13012>
- van Laarhoven, K. A., Peeters, L. H. M., Bekker, M., Huinink, H. P., & Adan, O. C. G. (2017). Conidia of *Penicillium rubens* formed at low water activities can attract more water. *MicrobiologyOpen*, 6(6), 1–9. <https://doi.org/10.1002/mbo3.526>
- Vėjelis, S., Gnipas, I., & Keršulis, V. (2006). Performance of Loose-Fill Cellulose Insulation. *MATERIALS SCIENCE (MEDŽIAGOTYRA)*, 12(4), 338–340.
- Vinnere Pettersson, O., & Leong, S. L. (2011). Fungal Xerophiles (Osmophiles). In *eLS* (pp. 1–9). <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000376.pub2>
- Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., ... Samson, R. A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 78(1), 343–371. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>
- Walterson, A. M., & Stavrinides, J. (2015). *Pantoea*: Insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(6), 968–984. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv027>
- Wang, L., Chen, S. S., Tsang, D. C. W., Poon, C. S., & Ok, Y. S. (2017). Enhancing anti-microbial properties of wood-plastic composites produced from timber and plastic wastes. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(13), 12227–12237. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8770-6>
- Wang, Q., Liu, D., Yang, Q., & Wang, P. (2017). Enhancing carotenoid production in *Rhodotorula mucilaginosa* KC8 by combining mutation and metabolic engineering. *Annals of Microbiology*, 67(6), 425–431. <https://doi.org/10.1007/s13213-017-1274-2>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and*

- Applications* (pp. 315–322). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>
- Yang, W., Meng, F., Peng, J., Han, P., Fang, F., Ma, L., & Cao, B. (2014). Isolation and identification of a cellulolytic bacterium from the tibetan pig's intestine and investigation of its cellulase production. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17(6), 262–267. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.08.002>
- Yolmeh, M., Hamed, H., & Khomeiri, M. (2016). Antimicrobial Activity of Pigments Extracted from *Rhodotorula glutinis* Against Some Bacteria and Fungi. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 18(12), 1–5. <https://doi.org/10.17795/zjrms-4954>
- Yue, X., Zhang, T., Yang, D., Qiu, F., Li, Z., Wei, G., & Qiao, Y. (2019). Ag nanoparticles coated cellulose membrane with high infrared reflection, breathability and antibacterial property for human thermal insulation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 535, 363–370. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.10.009>
- Zajc, J., Gostinčar, C., Černoša, A., & Gunde-Cimerman, N. (2019). Stress-Tolerant Yeasts: Opportunistic Pathogenicity Versus Biocontrol Potential. *Genes*, 10(1), 1–25. <https://doi.org/10.3390/genes10010042>
- Zapata, Y. M., Galviz-Quezada, A., & Osorio-Echeverri, V. M. (2018). Cellulases production on paper and sawdust using native *Trichoderma asperellum*. *Universitas Scientiarum*, 23(3), 419–436. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC23-3.cpop>
- Zhao, Y., Guo, L., Xia, Y., Zhuang, X., & Chu, W. (2019). Isolation, Identification of Carotenoid-Producing *Rhodotorula* sp. from Marine Environment and Optimization for Carotenoid Production. *Marine Drugs*, 17(3), 2–9. <https://doi.org/10.3390/md17030161>
- Zheng, C. (2017). *Cellulose-fiber-based thermal insulation materials with fungal resistance , improved water resistance and reaction-to- fire properties*. Stockholm: KTH Royal Institute of Technology.
- Zhou, X. yan, Zheng, F., Li, H. guan, & Lu, C. long. (2010). An environment-friendly thermal insulation material from cotton stalk fibers. *Energy and Buildings*, 42, 1070–1074. <https://doi.org/10.1016/j.enbuild.2010.01.020>
- Zoz, L., Carvalho, J. C., Soccol, V. T., Casagrande, T. C., & Cardoso, L. (2015). Torularhodin and Torulene: Bioproduction, Properties and Prospective Applications in Food and Cosmetics-a Review. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58(2), 278–288. <https://doi.org/10.1590/S1516-8913201400152>