

ČASOPIS
STUDIA OECOLOGICA
Ročník VIII
Číslo 1/2014

Redakční rada:

doc. Ing. Pavel Janoš, CSc. – šéfredaktor
Ing. Martin Neruda, Ph.D. – výkonný redaktor
prof. RNDr. Olga Kontrišová, CSc.
doc. RNDr. Juraj Lesný, Ph.D.
doc. MVDr. Pavel Novák, CSc.
Ing. Jan Popelka, Ph.D.
prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc.

Technický redaktor:

Mgr. Ing. Petr Novák

Recenzenti:

Ing. Jana Hubáčková, CSc., Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, Praha
doc. Ing. Petr Kotlík, FCHT Vysoké školy chemicko-technologické v Praze
Ing. Jan Matkovič, FŽP Univerzity J. E. Purkyně v Ústí nad Labem
prof. Ing. Svatopluk Matula, CSc., FAPPZ České zemědělské univerzity v Praze
Mgr. Antonín Roušar, ZŠ Ekoškola Údlice, Chomutov
RNDr. Michal Řehoř, Ph.D., Výzkumný ústav pro hnědé uhlí a.s., Most
Mgr. Martin Šlachta, Ph.D., ZF Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích
Ing. Josef Trögl, Ph.D., FŽP Univerzity J. E. Purkyně v Ústí nad Labem

Foto obálky

Mgr. Diana Holcová, Ph.D.

Vydává: FŽP UJEP v Ústí nad Labem

Tisk: AZ Media Ústí n.L.

Toto číslo bylo dáno do tisku v prosinci 2014

ISSN 1802-212X

MK ČR E 17061

STUDIUM METOD IDENTIFIKACE KOROZI PODPORUJÍCÍCH BAKTERIÍ U PALEONTOLOGICKÝCH MATERIÁLŮ

STUDY OF METHODS OF IDENTIFICATION OF CORROSION EVOKED BACTERIA IN PALEONTOLOGICAL MATERIALS

Jana ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ^{1,2}, Anna URBANOVÁ¹, Sandra
ONDRČKOVÁ¹, Vladimíra ŠKOPOVÁ¹

¹VŠCHT FTOP ÚTVP Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, jana.ambrozova@vscht.cz, skopovav@vscht.cz

²Univerzita J. E. Purkyně v Ústí nad Labem, Fakulta životního prostředí, Katedra přírodních věd, Králova
Výšina 3132/7, 400 96 Ústí nad Labem

Abstrakt

Paleontologické materiály mají pro lidstvo značnou hodnotu, umožňují nám studium jak přírody okolo nás (např. nálezy fosilií), tak historie naší civilizace. Není proto divu, že se projevuje stále větší snaha tyto materiály ochránit před přirozeným rozkladem, aby mohly být využívány nejen dnešními badateli, ale snad i generacemi dalšími. Pozornost byla zaměřena na oxidaci pyritu, který je součástí fosilií, k jehož degradaci dochází oxidací za tvorby síranů, železnatých a vodíkových iontů. Pro zjištění nejvhodnějších metod způsobu uchování takovýchto materiálů je nejprve potřeba porozumět procesům jejich degradace a faktorům, které se na ní podílí. Mezi faktory abiotické patří například vzduch, voda, hodnota pH. Pod biotické faktory potom řadíme činnost bakterií. Při studiu exemplářů odebraných z půdního prostředí lze očekávat vysoký výskyt acidofilních mikroorganismů, které mají významný vztah ke koloběhu síry. Mezi nejčastěji se vyskytující rody patří *Thiobacillus*, *Leptospirillum*, *Acidiphilium* apod. Pomocí metod kultivačních a molekulární biologie byla stanovována přítomnost acidofilních bakterií na paleontologických exemplářích, konkrétně byla zaměřena pozornost na mikroorganismus *Thiobacillus ferrooxidans*. K identifikaci mikroorganismů byly použity kultivační metody využívající různé druhy médií, mikroskopické metody identifikace narostlých kolonií a buněk bakterií (fluorescenční značení) a metody molekulární biologie (PCR). Kultivačními metodami a metodami molekulární biologie byla prokázána přítomnost thionových bakterií na některých poškozených exemplářích, lze usuzovat na vlivu bakterií při degradaci povrchů. Dalším zjištěním je vhodnost současného použití kultivačních, mikroskopických i amplifikačních metod pro identifikaci korozi způsobujících bakterií.

Abstract

Paleontological materials are of utter importance for today's civilisation. They enable us to study the nature around us (for example findings of fossils) and also our own history. Therefore, it is not surprising, that we try to preserve these materials and protect them from their natural degradation, in order to use them not only by the current researchers, but also by the next generations. The focus was on pyrite oxidation. Pyrite is a part of fossils and its oxidation causes the production of sulphates, ferrous and hydrogen ions. To find the best methods of material preservation, we need further understanding of the degradation processes and factors that are causing the oxidation. Factors are divided in abiotic (air, water and acidity) and biotic factors (bacterial activity). When studying soil examples, the presence of acidophilic bacteria can be found. *Thiobacillus*, *Leptospirillum* and *Acidiphilium* are acidophilic microorganisms who have a very important role in the sulphur cycle. Using cultivation methods and methods of molecular biology, the microorganism *Thiobacillus ferrooxidans* was detected on some of the studied paleontological materials. In this work were used cultivation methods based on various types of culture media, microscopic methods of bacteria colonies and cells identification (fluorescence dyeing) and molecular biology methods (PCR). Used cultivation procedures and PCR amplification method verified and identified the presence of thio-bacteria on paleontological materials; hereby it is possible discussed impact of bacteria in process of biodegradation. Another re-

sult there is availability of synchronous usage of cultivation, microscopic and amplification methods for detection and identification of corrosion evoked bacteria.

Klíčová slova: mikrobiální koroze; paleontologické materiály; acidofilní mikroorganismy; kultivace; epifluorescenční metody; PCR

Key words: microbial corrosion; paleontological materials; acidophilic microorganisms; cultivation; epifluorescence methods; PCR

1. Úvod

Pyrit (FeS_2), který je součástí kamenů či fosilií se působením abiotických i biotických faktorů rozkládá, např. oxidací sulfidů ve vodném prostředí může docházet až k tvorbě kyseliny sírové, která může exempláře dále poškozovat. Tato degradace představuje problém při snaze uchovat paleontologické exempláře. V rámci hledání vhodného způsobu uchovávání paleontologických vzorců a snahy o lepší porozumění průběhu degradace těchto materiálů, je řešen projekt DF12P01OVV031, jehož cílem je vylepšit metodiku preventivní i akutní konzervace sbírkových předmětů z oblasti paleontologie a mineralogie, které mohou být ohroženy produkty degradace sulfidů. Degradace materiálů je pozorovatelná na základě bílého, žlutého až zeleného zbarvení na povrchu materiálu (většinou doprovázeného sirným zápachem). Také mohou být sledovány trhliny v materiálu [1]. Řídicími faktory oxidace jsou velikost povrchu, jeho homogenita a struktura, přítomnost vody, teplota, hodnota pH, koncentrace kyslíku ať již vzdušného či rozpuštěného ve vodě a v neposlední řadě činnost mikroorganismů (bakterií a plísní) [1, 2].

Předložená práce byla zaměřena na problematiku studia mikrobiální koroze povrchu paleontologických nálezů a možnosti studia (kultivaci a stanovení) přítomných mikroorganismů podílejících se na biodeterioraci, speciálně thionových bakterií (a přímo *Thiobacillus ferrooxidans*).

2. Bakteriální koroze pyritů

Mikroorganismy se účastní přímo i nepřímo mnoha chemických reakcí a rozklad minerálů využívají při svém růstu [3]. Z dosud získaných poznatků lze předpokládat, že mezi nejdůležitější organismy, které oxidují sulfidické minerály, patří mikroorganismy produkující kyselinu sírovou [4]. V souvislosti s oxidací pyritu jsou velmi důležité, kromě mikroorganismů oxidujících sirné sloučeniny, i bakterie využívající pro svůj metabolismus ionty železa. Představiteli takovýchto mikroorganismů jsou chemolitotrofní bakterie. Aktivita bakterií může způsobit precipitaci minerálů, adsorpci či uvolnění kovů, a tvorbu či rozklad organokovových sloučenin. Rozpuštěné minerály mohou sloužit jako oxidovatelné substráty, donory či akceptory elektronů v redoxních reakcích a mohou být také přímou součástí buněčného metabolismu [3]. Vzhledem ke schopnosti produkovat kyselinu sírovou vyhovuje těmto mikroorganismům nízká hodnota pH, řazeny jsou tedy k mikroorganismům acidofilním. Další z charakteristických vlastností je schopnost vázat vzdušný oxid uhličitý. Zdrojem akceptorů elektronů je vzdušný kyslík v prostředí aerobním. V anaerobním prostředí jsou akceptory elektronů železité ionty. Zdrojem metabolické energie jsou rozdíly v potenciálu mezi redoxním párem elektronových donorů ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ či $\text{S}^0/\text{SO}_4^{2-}$) a akceptorem elektronů (např. $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$) [5].

Acidofilní mikroorganismy je možno z průmyslového hlediska rozdělit do několika skupin, ať už se jedná o mezofilní proteobakterie, grampozitivní mírně termofilní bakterie či termofilní archea. Většina průmyslově využívaných proteobakterií má nejvyšší aktivitu metabolismu při teplotách nižších než $45\text{ }^\circ\text{C}$. Mezi nejznámější a nejvíce prostudovaný acidofilní mikroorganismus patří *Thiobacillus ferrooxidans*, který dokáže metabolizovat za aerobních i anaerobních podmínek [6]. Genom tohoto mikroorganismu byl intenzivně zkoumán, proto je *Thiobacillus ferrooxidans* často uváděn jako modelový organismus při studiu biooxidace [7]. Kromě tohoto mikroorganismu se na biooxidaci sulfidických minerálů podílí například bakterie *Leptospirillum* [5]. Mezi významné grampozitivní bakterie, které výhradně oxidují železo (nikoliv sloučeniny síry), patří bakterie *Acidimicrobium*

ferrooxidans. Mezi termofilní archea s vysokým potenciálem biooxidace minerálů, patří *Acidianus brierleyi*, *Metallosphaera* a *Sulfobolus* [8].

Na oxidaci železnatých iontů na železité se mohou v přírodě podílet thionové bakterie, které mají zásadní vztah ke koloběhu síry [9, 10]. Mezi nejčastěji se vyskytující taxony patří rody *Thiobacillus*, *Leptospirillum* či *Acidiphilium*. Thionové bakterie získávají energii oxidací železa či síry, přičemž železo musí být v dvojmocné formě, zatímco síra může být v mnoha podobách, ať už se jedná o rozpuštěné či nerozpuštěné sulfidy, elementární síru a rozpustné sloučeniny, které inkorporují buď thio-síran ($S_2O_3^{2-}$) nebo tetrathionanový ion ($S_4O_6^{2-}$). Produktem transformace je potom sloučenina síry, která vlastní menší množství valenčních elektronů, konečným produktem jsou sírany [3].

Bakterie druhu *Thiobacillus ferrooxidans* jsou acidofilní, litotrofní, mezofilní, obligátně chemolitotrofní, nesporulující tyčinky, vyhovuje jim kyselé prostředí, aktivnější jsou v prostředí vlhkém. Uhlík získávají fixací atmosférického CO_2 . Vhodná teplota pro život se pohybuje v rozmezí 20 – 35 °C. V přírodních podmínkách se vyskytují na místech, která by pro jiné bakterie byla naprosto neobyvatelná. Najdeme je v horkých pramenech, sopečných puklinách a sulfidických rudách s vysokou koncentrací kyseliny sírové [3]. Další druh bakterie z rodu *Thiobacillus*, který je schopen mikrobiální koroze je *Thiobacillus thiooxidans*. Tato bakterie dokáže oxidovat síru a rozpustné sirmé sloučeniny. Studiemi bylo zjištěno, že koroze je účinnější, pokud se výše zmíněné druhy bakterií podílí na korozi společně, než když oxidují sloučeniny každý zvlášť.

Bakterie druhu *Leptospirillum ferrooxidans* se jeví jako pohyblivé, zakřivené tyčinky. Tyto bakterie jsou schopny fixovat oxid uhličitý, organické látky zpracovávat neumí, zdrojem energie jsou železnaté ionty, akceptorem elektronů je molekulární kyslík. Výskyt těchto bakterií je zaznamenáván převážně v aerobním prostředí (byl však nejednou popsán i případ fakultativně anaerobního chování). Celkově se jedná o vysoce specializované acidofilní mikroorganismy [3].

Bakterie rodu *Acidiphilium* jsou organotrofní, acidofilní, žijí převážně v půdním prostředí a využívají organické látky i CO_2 jako zdroj uhlíku a energie. Dále využívají redukovanou síru a železnaté ionty [11].

V prostředí s vyšší aciditou se kromě bakterií způsobujících korozi mohou vyskytovat i jiné, organotrofní mikroorganismy (např. houby), které jsou schopny žít z produktů litotrofního metabolismu jiných mikroorganismů. Role těchto organismů v korozních procesech je prozatím nejasná [3].

Z výše uvedeného lze shrnout, že největší podíl na procesu biologického vyluhování kovových rud, je přisuzován bakteriím *Thiobacillus ferrooxidans* a *Leptospirillum ferrooxidans* [6]. Oba uvedené druhy bakterií, pokud jsou současně přítomné v prostředí, spolupracují navzájem při degradaci pyritu a chalkopyritu (literární údaje uvádí, že samy o sobě nejsou schopny zmíněné degradace) [3].

3. Experimentální část práce

3.1 Charakteristika vzorků

Všechny vzorky analyzované během této práce byly dodány Národním muzeem. U hodnocených mineralogických vzorků byly zjištěny výrazné projevy alterace a degradace předmětů zejména pro vzorky Fe-sulfidů (pyrit, markazit). Jedna sada vzorků byla označena NAKI0003 – NAKI0011. Tyto vzorky sloužily pro první fázi zpracování, během které došlo k seznámení s materiálem, výběru vhodného média a zvolení vhodných metod kultivace a detekce mikroorganismů. Vzorky byly odebrány v rámci čerstvého terénního odběru v lokalitě Ahníkov II. Materiál byl sbírán těsně pod povrchem a po nálezu byl každý vzorek za původní vlhkosti uzavřen do zipovaného sáčku, týž den byl uložen do lednice. (Vzorek NAKI0003: silně degradovaný úlomek kosti, charakterizován bílým práškem. Vzorek NAKI0004: střední část masivní, kompaktní, protáhlé, duté kosti na povrchu se slabým žlutavým popraškem. Vzorek NAKI0005: úlomek delší trubkovité kosti s černohnědou vnitřní hmotou a povlakem síranů, silně degradovaný, bez patrné původní struktury, pokrytý volnými degradačními produkty makroskopicky práškovými, bílými až mírně žlutavými. Vzorek NAKI0006: silně degradovaný úlomek kosti pokrytý mikroskopicky drůzkami, makroskopicky práškem bělavé až žlutavé barvy. Vzorek NAKI0007: úlomek po-

rézní kosti s houbovitou tkání. Vzorek NAKI0011: krunýř želvy se silnou, tmavou krustou produktů degradace s podílem jílu z prostředí.)

Vzorky používané ve druhé fázi experimentů pocházely z lokality Lenešice (Louny) a byly označeny jako NAKI167 - NAKI175. Vzorky NAKI167 - NAKI171 sestávaly z vápnatého jílovce. Od doby sběru byly tyto vzorky souvisle chlazeny až do doby analýzy. Jednalo se o limonitovaná jádra plžů. Vzorek NAKI170 byl jemně porušen puklinami, ostatní vzorky byly bez puklin. Vzorky NAKI172 - NAKI175 byly získány v období 30. - 70. let 20. století. Od 90. let byly uloženy v muzeu v Lounech, nejspíše od roku 2008 v Národním muzeu. V obou institucích byly uchovávány v pokojových podmínkách bez konzervace. U vzorku NAKI172 (slín) byly pravděpodobně přítomny produkty rozpadu pyritu. Vzorek NAKI173 (slín) byl silně limonitovaný. NAKI174 byl vzorkem plže. Povrch vzorku vykazoval silné narušení prasklinami. Povrch vzorku plže NAKI175 byl narušen prasklinami.

3.2 Možnosti detekce mikroorganismů

Ke studiu mikroorganismů, přítomných na/ve vzorcích exemplářů byly zvoleny kultivační metody, využívající pomnožení mikroorganismů v tekutých médiích (přítomnost - vizualizaci barevné reakce) a na pevných médiích. K detekci těchto bakterií se tradičně využívá stanovení pomocí kultivace na selektivních kapalných nebo pevných médiích [14]. Aby bylo možné přítomné mikroorganismy studovat a popř. i zhodnotit jejich vliv na materiál, byly mikroorganismy získány louhováním vzorků exemplářů za definovaných podmínek. Kultivace thionových bakterií představují způsob zahrnující mnohá úskalí, kterými jsou např. dlouhá doba kultivace, nemožnost spolehlivě kultivovat čistý kmen či kulturu bakterií apod., a proto byly voleny i jiné způsoby identifikace pomocí metody molekulární biologie PCR.

3.2.1 Kultivační metody

Exempláře vzorků byly vloženy do sterilních plastových 100ml lahvíček obsahujících 50 ml fyziologického roztoku (9 g NaCl na 1 litr destilované vody). Lahvičky s exempláři vzorků byly za účelem louhování uloženy na 24 h do termostatu při teplotě 25 °C až 30 °C. Vzorky výluhů byly použity pro následné pomnožení, izolaci a kultivaci přítomných acidofilních mikroorganismů.

Pro pomnožení, subkultivaci a izolaci byla použita 2 tekutá média: dle Fjodorova (předpis č. 76 [15]) a Thiobacillus broth – ThioB (M789 [16]), dle doporučení byla dodržena 7denní inkubace vzorků při teplotě 25 °C až 30 °C. Růst bakterií ve Fjodorovově médiu se projevuje mléčným zbarvením média, bílý zákal indikuje přítomnost vysrážené síry (barevná reakce = žlutavé zbarvení). Růst bakterií v ThioB médiu se projevuje vysrážením síry na povrchu média nebo na stěnách lahvičky/zkumavky použité pro kultivaci. Pro izolaci kolonií pomnožených v tekutém médiu bylo použito již připravené pevné médium ThioA (M788 [17]) určené speciálně pro bakterie rodu *Thiobacillus*. Kolonie thiobacilů jsou pozorovány jako malé, sírou impregnované kolonie s čirými zónami indikujícími oxidaci thiosíranu.

Spolu se vzorky výluhů byl nasazen bakteriální kmen *Thiobacillus ferrooxidans* CCM 4253 (zakoupen od Přírodovědecké fakulty Masarykovy Univerzity v Brně). Kultivace čistého bakteriálního kmene byla zvolena proto, aby bylo možné posoudit vzhled kolonií vyrostlých ze vzorků NAKI se vzhledem k čistému bakteriálnímu kmenu. Přítomnost bakteriálního kmene CCM 4253 byla například v médiu dle Fjodorova indikována železitým zbarvením. Dalším důvodem pro kultivaci čistého bakteriálního kmene bylo jeho využití při optimalizaci postupů týkajících se molekulární biologie.

3.2.2 Metoda PCR

Za účelem detekce bakterií byly využity metody molekulární biologie, speciálně PCR. Výluhy vzorků byly nejprve odstředěny a získaná peleta byla použita pro izolaci DNA. K tomuto účelu byly použity Chemagic DNA Bacteria Kit a MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit. Při použití Chemagic DNA Kitu byla zvolena varianta postupu pro gramnegativní bakterie. Pro namíchání směsi pro PCR byl použit komerční kit Fast Start *Taq* DNA polymerase dNTPack. Použitá směs pro PCR byla vybrána z literatury a upravena [18]. Doporučeno bylo složení: libovolné množství vody bez nukleotidů, PCR pufr s MgCl₂ o finální koncentraci 2 mM MgCl₂, 1 μl směsi dNTP (každý

nukleotid 200 μ M), primery 200 nM každý, *Taq* DNA polymeráza 0,4 μ l. Vzorke byly následně vlo-
ženy do termocykléru, kde došlo k pomnožení DNA řetězců. K identifikaci byly použity specifické
primery pro *Thiobacillus ferrooxidans* F1_thio (sense) ATGCGTAGGAATCTGTCTTT a R1_Thio
(antisense) GGACTTAACCCAACATCTCA. Program se skládal ze tří kroků, které se cyklicky opa-
kovaly. Denaturace DNA probíhala při 95 °C po dobu 30 s. Nasedání primerů probíhalo od 65 °C do
58 °C po dobu 30 s, teplota se snižovala o 1 stupeň ob jeden cyklus. Posledním krokem
byla polymerace, která probíhala při 72 °C po dobu 2 min. Po dosažení teploty 58 °C probí-
hal celý cyklus 20krát (celým cyklem míněno denaturace 95 °C po 30 s, nasedání primerů
58 °C 30 s, polymerace 72 °C 2 min). Následovalo 10 min při 72 °C. Na konci byla teplota snížena na
4 °C. Po pomnožení DNA řetězců v termocykléru následovala agarózová elektroforéza. Byl použit
2% agarózový gel. Do agarózového média bylo přidáno červené barvivo Nancy 520. Elektroforéza
byla spuštěna při napětí 100 V po dobu 60 - 100 min. Detekce vznikajících fragmentů byla potvrzena
na transiluminátoru a fotograficky zdokumentována.

4. Výsledky

Z výluhu vzorku byl pipetován 1 ml do 30 ml kapalného média dle Fjodorova, 1 ml do 30 ml
kapalného ThioB média a 1 ml výluhu vzorku pipetován na pevné médium ThioA. Kultivace tr-
vala 7 dní. Vzhledem k tomu, že takto navržený postup měl za následek masivní nárůst plísní,
které pravděpodobně potlačily růst thionových bakterií, byl postup upraven. Pro kultivaci byly
použity výluhy vzorků po 7 denním louhování, objem 2 ml výluhu vzorku byl přidán k 8 ml te-
kutého média dle Fjodorova, dále byly 2 ml pipetovány k 8 ml tekutého ThioB média. Objem
1 ml výluhu vzorku byl rovněž pipetován na povrch pevného ThioA média. Tímto postupem se zvý-
šila pravděpodobnost záchytu a pomnožení acidofilních mikroorganismů ve/na zvolených médiích.
To znamená, že pro zjištění přítomnosti a schopnosti růstu acidofilních mikroorganismů byla použita
3 média a 2 různé poměry objemu vzorku výluhu z exempláře a kultivačního média.

4.1 Vzorke NAKI0003 - NAKI0011

Při kultivaci (trvajících 21 dní) ve zkumavkách v tekutém médiu dle Fjodorova a ThioB médiu byl
pozorován bílý zákal a zbarvení vzorků. Bakterie rodu *Thiobacillus* provádí metabolickou činnost
v slabě kyselém (či neutrálním) prostředí, jejich činností klesá hodnota pH v prostředí až na 4,5.
Může docházet k produkci kyseliny sírové, způsobující pokles hodnoty pH až na 1,0. Z výše uvede-
ného důvodu byla zjišťována i hodnota pH použitých tekutých médií a médií se vzorky výluhů. Lze
předpokládat, že pokles hodnot pH indikoval přítomnost acidofilních mikroorganismů (viz tabulka
1). Hodnota pH média dle Fjodorova byla před přidáním výluhu 9,17 a hodnota pH ThioB média
4,85.

Tabulka 1. Aktivita bakterií ve Fjodorovově médiu a ThioB médiu

Vzorek / Médium	NAKI0003	NAKI0004	NAKI0005	NAKI0006	NAKI0007	NAKI0011
Výluh + Fjod.méd. (2 ml + 8 ml)	Zákal pH 4,33	- pH 5,60	Zákal pH4,28	Zákal pH4,34	- pH 5,36	Zákal pH 3,45
Výluh + ThioB méd. (2 ml + 8 ml)	Zákal pH 4,55	- pH 5,57	Zákal pH 3,48	Zákal pH4,93	- pH 3,38	Zákal pH 4,53

Komentář k tabulce 1: pH bylo měřeno pomocí přístroje VOLTCRAFT PH-100 ATC

Vysrážení síry na pevném ThioA médiu mělo indikovat růst bakterií. Acidofilní mikroorganismy
byly určovány na základě typického mléčného zbarvení kolonií s čirým okrajem či krémového
zbarvení kolonií s bílým okrajem. Okraje kolonií indikovaly sirný metabolismus mikroorganismu.
Nevýhodou média ThioA byla jeho konzistence, po delší době kultivace docházelo k narušení povr-
chu a tvoření brázd. Heterotrofní acidofilní bakterie byly růžové a na okrajích vybarvené, nebo béžo-
vé s bílým okrajem typické pro rod *Acidiphilium*. Dále bylo možné pozorovat i blíže nespecifikované
velké oválné a krémově zbarvené kolonie heterotrofních acidofilních bakterií. Kolonie bakterií oxi-
dujících železo byly oranžovohnědé s paprskovitými okraji (viz tabulka 2).

Tabulka 2. Kultivace na pevném ThioA médiu (z výluhů ve Fjodorovově a ThioB médiu), vzhled a charakter kolonií přítomných mikroorganismů

Vzorek	Výluh + tekuté Fjodorovo médium (2 ml výluhu a 8 ml média)	Výluh + tekuté ThioB médium (2 ml výluhu a 8 ml média)
	Následně aplikace 1 ml vzorku výluhu po subkultivaci (v tekutém Fjodorovo nebo ThioB médiu) na pevné ThioA médium v Petriho misce	
NAKI0003	Přítomné zlatavě zabarvené kolonie plísni a bílé lesklé kolonie acidofilních bakterií, drobné mírně narezlé kolonie bakterií.	Přítomné zlatavě zabarvené kolonie plísni a blíž neidentifikovatelné kolonie acidofilních bakterií.
NAKI0004	Přítomné rezavě zabarvené kolonie bakterií s bílým okrajem.	Přítomné kolonie plísni a blíž neidentifikovatelné kolonie acidofilních bakterií.
NAKI0005	Přítomné rezavě zabarvené drobné kolonie bakterií.	Přítomné bílé krémové kolonie s průsvitným okrajem, mírně narezlé kolonie bakterií.
NAKI0006	Přítomné rezavě zabarvené drobné kolonie bakterií.	Přítomné kolonie plísni a bílé drobné kolonie bakterií.
NAKI0007	Přítomné bílé krémově zabarvené rozplízlé kolonie bakterií.	Přítomné lesklé bílé krémové kolonie s průsvitným okrajem, s hrbolky, mírně narezlé kolonie bakterií.
NAKI0011	Přítomné plísně a rezavě zabarvené drobné kolonie bakterií.	Přítomné plísně a mírně narezlé kolonie bakterií.

Pro stanovení thionových bakterií pomocí metod molekulární biologie byly testovány 2 DNA izolační kity, a to 1: Chemagic DNA Bacteria Kit a 2: MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit. Na základě testování byl pro izolaci zvolen Chemagic DNA Bacteria Kit, který vykazoval dostatečně intenzivní signál. Jako pozitivní kontrola přítomného DNA sloužil bakteriální kmen CCM 4253 (očekávaná velikost vznikajících fragmentů po PCR při použití specifických primerů pro *T. ferrooxidans* je cca 1000 bp). Současně byl použit i obecný bakteriální *Bac* primer (očekávaná velikost vznikajících fragmentů po PCR při použití obecných bakteriálních primerů je cca 600 bp). Sumarizaci výsledků uvádí tabulka 3. Pro zajímavost je možné porovnat výsledky aplikované metody PCR s výsledky kultivačních stanovení, uvedených v tabulce 2 a současně i posoudit výpovědní hodnotu kultivačních stanovení, postupů louhování, úpravy vzorků a použitých médií.

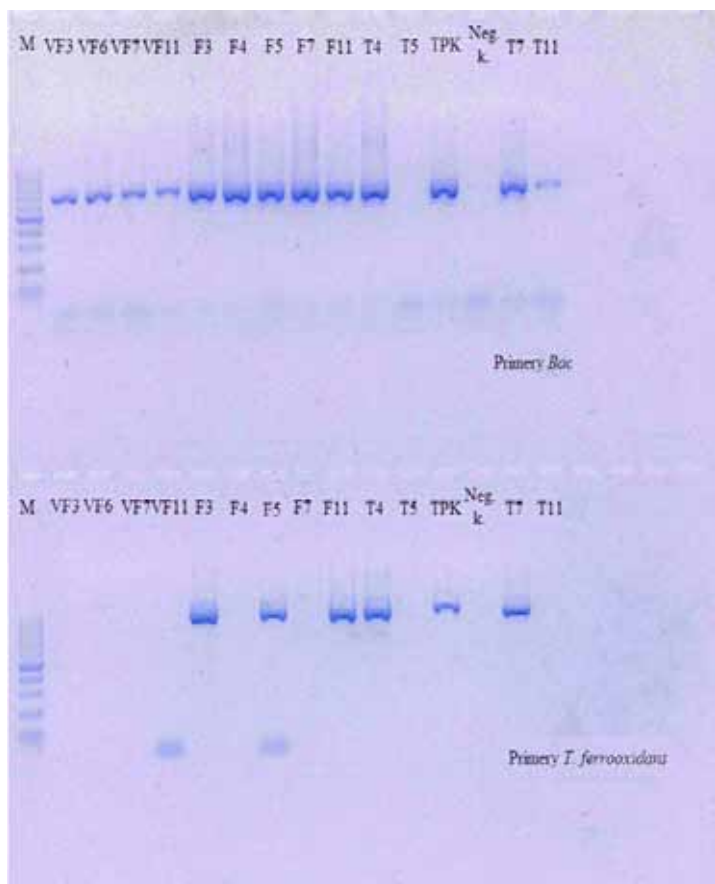
Tabulka 3. Výsledky PCR a odezva na přítomnost bakterií (*Bac* primer) a bakterií *Thiobacillus ferrooxidans*

Vzorek	Výluh + tekuté Fjodorovo médium (2 ml výluhu a 8 ml média)	Výluh + tekuté ThioB médium (2 ml výluhu a 8 ml média)
	Pozitivní/negativní výsledek PCR reakce	
NAKI0003	+ bakterie <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	- bakterie <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>
NAKI0004	+ bakterie <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	+ bakterie <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>
NAKI0005	+ bakterie <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	- bakterie <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>
NAKI0006	- bakterie <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	- bakterie <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>
NAKI0007	+ bakterie <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	+ bakterie <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>
NAKI0011	+ bakterie <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	+ bakterie <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>

Pozitivní výsledek elektroforetické analýzy byl pozorován v případě, že vzorek po louhování, kultivaci a izolaci obsahoval bakteriální DNA. Po přidání PCR směsi a proběhnutí PCR reakce, během

kteřé došlo k namnožení DNA řetězců, bylo možné pozorovat fragment o velikosti cca 600 bp, odpovídající fragmentu bakteriální DNA. To bylo pozorováno u vzorků NAKI0003, NAKI0004, NAKI0005, NAKI0006, NAKI0007 a NAKI0011.

Pozitivní odezva na přítomnost DNA bakterie *Thiobacillus ferrooxidans* byla pozorována v případě, že vzorek po louhování, kultivaci a izolaci obsahoval templátovou DNA tohoto mikroorganismu. Po přidání PCR směsi a proběhnutí PCR reakce, během které došlo k namnožení DNA řetězců, bylo možné pozorovat fragment o velikosti cca 1000 bp, odpovídající specifickému fragmentu DNA při použití primerů pro bakterii *Thiobacillus ferrooxidans*. To bylo pozorováno u vzorků NAKI0003, NAKI0004, NAKI0005, NAKI0007 a NAKI0011. Bylo tedy možné předpokládat, že ve výše zmiňovaných vyluzích vzorků byly přítomny bakterie *Thiobacillus ferrooxidans* (viz Obr. 1).



M = Marker, Neg. k. = negativní kontrola (bez templátové DNA).

VF = 1 ml vzorku ve 30 ml média dle Fjodorova.

F = 2 ml vyluhu vzorku v 8 ml média dle Fjodorova.

T = 2 ml vyluhu vzorku v 8 ml ThioB média.

Vzorky NAKI0003 – NAKI0011, pro přehlednost psáno pouze poslední číslo označující vzorek.

FPK = pozitivní kontrola kmene v médiu dle Fjodora.

TPK = pozitivní kontrola v médiu ThioB.

Bac = obecné bakteriální primery (očekávaná velikost vznikajících fragmentů po PCR při použití obecných bakteriálních primerů je cca 600 bp).

Primery *T. ferrooxidans* (očekávaná velikost vznikajících fragmentů po PCR při použití specifických primerů pro *T. ferrooxidans* je cca 1000 bp).

Obr. 1 Agarózová elektroforéza PCR produktů u vzorků NAKI

4.2 Vzorky NAKI167 - NAKI175

V tabulce 4 je uvedena aktivita bakterií a hodnota pH u nasazených vzorků vyluhů. Na Obr. 2 je zdokumentován vzhled barevné reakce ve Fjodorově médiu a v ThioB médiu a následně pak kolonií rostoucích na ThioA médiu.

Tabulka 4. Aktivita bakterií ve Fjodorovově médiu a ThioB médiu

Vzorek	NAKI 167	NAKI 168	NAKI 169	NAKI 170	NAKI 171	NAKI 172	NAKI 173	NAKI 174	NAKI 175
Výluh + Fjod. méd. (2 ml + 8 ml)	Zákal pH 7,68	- pH 7,53	Zákal pH 7,34	Zákal pH 6,94	Zákal pH 8,19	Zákal pH 8,08	Zákal pH 7,83	- pH 8,58	Zákal, sraž. pH 6,71
Výluh + ThioB méd. (2 ml + 8 ml)	- pH 6,76	- pH 6,29	- pH 6,13	Zákal pH 7,3	Zákal pH 7,46	- pH 5,12	Zákal pH 5,16	- pH 5,20	Zákal pH 3,97

Komentář k tabulce 4: pH bylo měřeno pomocí přístroje VOLTCRAFT PH-100 ATC



Obr. 2 Aktivita bakterií v tekutých médiích (zkumavka vlevo „29“ ve Fjodorovově médiu, zkumavka vpravo „39“ v ThioB médiu) a vzhled kolonií bakterií rodu *Thiobacillus*

Tabulka 5. Kultivace vzorku výluhu na pevném ThioA médiu

Vzorek	Přítomnost a vzhled kolonií mikroorganismů
NAKI167	Přítomné krémově zbarvené kolonie bakterií, acidofilní mikroorganismy.
NAKI168	Přítomnost vysrážené síry, drobné bílé kolonie bakterií, převažovaly plísně.
NAKI169	Přítomné krémově zbarvené kolonie bakterií, acidofilní mikroorganismy.
NAKI170	Přítomné krémově a rezavě zbarvené kolonie bakterií.
NAKI171	Přítomné krémově zbarvené kolonie bakterií, acidofilní mikroorganismy.
NAKI172	Přítomné krémově, žlutě a rezavě zbarvené kolonie bakterií, dále plísně.
NAKI173	Přítomné zlatavě žluté kolonie bakterií.
NAKI174	Přítomné krémově a rezavě zbarvené kolonie bakterií.
NAKI175	Přítomné plísně.

Výluhy vzorků v kapalných médiích byly centrifugovány, izolovány pomocí kitů, upraveny pomocí PCR a separovány pomocí gelové elektroforézy. Pozitivní výsledek elektroforetické analýzy byl pozorován v případě, že vzorek po louhování, kultivaci a izolaci obsahoval bakteriální DNA. Po přidání PCR směsi a proběhnutí PCR reakce, během které došlo k namnožení DNA řetězců, bylo možné pozorovat fragment o velikosti cca 600 bp, odpovídající fragmentu bakteriální DNA. To bylo pozorováno u vzorků NAKI167, NAKI168, NAKI169, NAKI171, NAKI172, NAKI173, NAKI174 a NAKI175. Pozitivní odezva na přítomnost DNA bakterie *Thiobacillus ferrooxidans* byla pozorována u vzorku NAKI174, lze tedy předpokládat, že se v uvedeném výluhu vyskytovaly bakterie *Thiobacillus ferrooxidans*.

Tabulka 6. Výsledky PCR a odezva na přítomnost bakterií (*Bac primer*) a bakterií *Thiobacillus ferrooxidans*

Vzorek	Výluh + tekuté Fjodorovo médium (2 ml výluhu a 8 ml média)	Výluh + tekuté ThioB médium (2 ml výluhu a 8 ml média)
	Pozitivní/negativní výsledek PCR reakce	
NAKI167	+ bakterie - <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	+ bakterie - <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>
NAKI168	- bakterie - <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	+ bakterie - <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>
NAKI169	+ bakterie - <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	- bakterie - <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>
NAKI170	- bakterie - <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	- bakterie - <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>
NAKI171	+ bakterie - <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	- bakterie - <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>
NAKI172	+ bakterie - <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	- bakterie - <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>
NAKI173	+ bakterie + <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	+ bakterie - <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>
NAKI174	+ bakterie + <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	+ bakterie - <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>
NAKI175	- bakterie - <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	+ bakterie - <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>

Při posouzení výsledků, uvedených v tabulce 5 a následně 6 je možné usoudit, že zlatavě žluté zbarvení kolonií indikovalo přítomnost železo oxidujících bakterií. Ty byly pozorovány ve vzorcích NAKI172 a NAKI173. Přítomné plísně znesnadňovaly pomnožování pomalu rostoucích bakterií, je možné, že zabránily růstu acidofilních a thionových bakterií ve vzorcích NAKI168, NAKI170 a NAKI175. Přítomnost acidofilních bakterií byla patrná na základě bílého krémového zbarvení kolonií u vzorků NAKI167, NAKI169 – NAKI174.

Závěry

Cílem této práce bylo identifikovat mikroorganismy, které způsobují degradaci pyritu, a tím způsobují poškození paleontologických materiálů. K identifikaci mikroorganismů byly použity jak metody kultivační, tak metody molekulární biologie. Cílem bylo jednak porovnat výsledky získané oběma metodami, zároveň bylo snahou zjistit spolehlivost daných metod a jejich vzájemnou propojenost při určování přítomnosti bakterií ať už obecně, či konkrétně bakterie *Thiobacillus ferrooxidans*. Vhodná volba médií pro kultivaci cílového organismu byla velmi důležitá. Kultivace thionových bakterií, jejichž přítomnost byla na degradovaných materiálech předpokládána, je velmi složitá a ačkoliv existují média doporučená, na kultivaci tohoto druhu bakterií, úspěšnost nebyla vždy zaručena. Acidofilní mikroorganismy potřebují delší čas a dostatek živin, aby se dostatečně pomnožily.

Pro kultivaci byla zvolena tři média. Kapalné médium dle Fjodorova a ThioB a pevné médium ThioA. Ani jedno z použitých médií nebylo zcela specifické. Nelze s určitostí tvrdit, že jedno z vybraných médií by mělo být preferováno při dalších kultivacích. Různé složení kapalných médií a odlišná hodnota pH nabízejí vhodné podmínky pro kultivaci thionových bakterií. Na základě zvoleného způsobu kultivace bylo usouzeno, že nejvhodnější metodou kultivace bude zřejmě kombinace kultivací na všech 3 médiích. Použití pevného média ThioA ke kultivaci výluhu umožnilo sledovat vzhled narostlých kolonií bakterií. Z pohledu pod stereolupou na kolonie narostlé na ThioA médiu však nebylo možné vždy s jistotou určit, zda se jedná o druh *Thiobacillus thiooxidans*, *Thiobacillus ferrooxidans* či jiné mikroorganismy. Nevýhodou ThioA média byla jeho tekutější konzistence, po kultivaci delší než 14 dní docházelo k vytváření brázd na povrchu média a v některém případě i k porušení struktury

kolonie bakterie. Kultivace v obou typech kapalných médií měly tu výhodu, že v nich bylo možné sledovat zákal, který mohl signalizovat metabolickou aktivitu bakterií. Na základě různého vzhledu a zabarvení média, tvorby sraženin, i změny hodnot pH bylo možné přítomnost těchto mikroorganismů předpokládat.

Následně po zvolení vhodného poměru výluhu a kapalného média byla analýza pomocí metod molekulární biologie snadná, odezva na elektroforetickém záznamu byla velmi jasná. Použití metod molekulární biologie mohlo přítomnost předpokládaných mikroorganismů potvrdit. V rámci metod molekulární biologie byly výluhy vzorků po kultivaci odstředěny, vzniklé pelety byly použity pro izolaci DNA, PCR reakci a elektroforetickou analýzu. Za použití metod molekulární biologie byl potvrzen výskyt mikroorganismu *Thiobacillus ferrooxidans* (syn. *Acidithiobacillus ferrooxidans*) ve vzorcích NAKI0003, NAKI0005 a NAKI0011 (zvolený poměr 2 ml výluhu a 8 ml média dle Fjodorova), NAKI0004 a NAKI0007 (zvolený poměr 2 ml výluhu a 8 ml média ThioB) a ve vzorku NAKI174 (médiu dle Fjodorova).

Bylo potvrzeno metodami kultivačními i pomocí metod molekulární biologie, že thionové bakterie se nachází na povrchu degradovaných materiálů. Lze tedy předpokládat, že se podílí na oxidaci paleontologických materiálů.

Poděkování: Vypracováno při řešení projektu DF12P01OVV031.

Literatura

1. NEWMAN, A. Pyrite oxidation and museum collections: a review of theory and conservation treatments. *The geological curator*. 1998, 363-371.
2. KOLESÁR, P. Rozklad markasitu ve sbírkách pyritu a a možnost jejich konzervace. In: *Mineral.cz* [online]. 2001 [cit. 2014-01-14]. Dostupné z: <http://www.mineral.cz/view.php?cislocikanku=2001122401>
3. ADAMS, D. J. The role of microorganisms in acid rock drainage. [Http://geoinfo.nmt.edu](http://geoinfo.nmt.edu) [online]. Weber State University, Ogden, Utah, 2005, 2008 [cit. 2014-01-17]. Dostupné z: http://geoinfo.nmt.edu/staff/mclemore/documents/adams_sme.pdf
4. BRIERLEY, C. L. Microbiological mining. *Scientific American*. 1982, č. 247, s. 42-50.
5. URÍK, M., Littera, P., Mikušová, P. Mikrobiálna oxidácia sulfidov. *Chemické Listy*. 2013, č. 107, s. 292-297.
6. RAWLINGS, D. E. Mesophilic, Autotrophic Bioleaching Bacteria: Description, Physiology and Role. *Biomining: Biotechnology Intelligence Unit*. 1997, s. 229-245.
7. ROHWERDER, T., GEHRKE, T., KINZLER, K., SAND, W. Bioleaching review part A. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2003-12-1, vol. 63, issue 3, s. 239-248. DOI: 10.1007/s00253-003-1448-7. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-003-1448-7>
8. GERICKE, M., PINCHES, A. Bioleaching of copper sulphide concentrate using extreme thermophilic bacteria. *Minerals Engineering*. 1999, vol. 12, issue 8, s. 893-904. DOI: 10.1016/S0892-6875(99)00076-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S089268759900076X>
9. SMITH, E. E., SHUMATE, K. S. Sulfide to Sulfate Reaction Mechanism: A Study of the Sulfide to Sulfate Reaction Mechanism as it Relates to the Formation of Acid Mine Waters. Michigan, 1970. Water pollution control research series. Michigan University.
10. NORDSTROM, D. K. *Acid Sulfate Weathering*. Soil Science Society of America, 1982, s. 37-56. ISBN 978-0-89118-905-3.

11. MAHMOUD, M. A., WOODALL, W. H. Phase I Analysis of Linear Profiles With Calibration Applications. *Technometrics*. 2004, vol. 46, issue 4, s. 380-391. DOI: 10.1198/004017004000000455. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1198/004017004000000455>
12. BANG, B. S. Framboidal pyrite and associated organic matrices. A risky composite for preservation of fossils. In: *IIC Nordic Group, Danish Section, XIII Congress preprints. Copenhagen, 7-11 September 1994*. Denmark: Nordisk Konservatorforbund. Danske Sektion, 1994, s. 65-82.
13. RIXON, A. *Fossil animal remains: their preparation and conservation*. [Atlantic Highlands] N.J.: distributed by Humanities Press, 1976. ISBN 04-851-2028-3.
14. JOHNSON, D. B. Selective solid media for isolating and enumerating acidophilic bacteria. *Journal of Microbiology Methods*. 1995, č. 23, s. 205-218.
15. ŠTĚPÁNEK, M. a kol. *Biologické metody vyšetřování vod ve zdravotnictví*. Avicenum, Praha, 1982, 408 s.
16. <http://www.himedia.cz/katalog/product/M789> [online]
17. <http://www.himedia.cz/katalog/product/M788> [online]
18. DEGEN, H. J., DEUFEL, A., EISEL, D. PCR Applications Manual. ROCHE DIAGNOSTICS GMBH. *Www.gene-quantification.de* [online]. Mannheim, Německo, 2006 [cit. 2014-05-02]. Dostupné z: <http://www.gene-quantification.de/ras-pcr-application-manual-3rd-ed.pdf>