

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**



**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**IZOLACE BAKTERIE *THIOBACILLUS DENITRIFICANS* Z KYSELÝCH  
LESNÍCH PŮD ŠUMAVY**

**HANA BOŠKOVÁ**

**VEDOUcí PRÁCE: ING. JIŘÍ BÁRTA, Ph.D.**

**ČESKÉ BUDĚJOVICE**

**2011**

Bošková H. (2011): Izolace bakterie *Thiobacillus denitrificans* z kyselých lesních půd Šumavy [Isolation of Bacteria *Thiobacillus denitrificans* from acidic forest soil on Šumava. Bc. Thesis, in Czech.] - 35 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Anotace:**

The aim of this work was to gather the information about bacteria *Thiobacillus denitrificans*. Various methods of cultivation were tested and specific probes were verified.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval/a samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

.....  
Hana Bošková

V Českých Budějovicích, 29. 4. 2011

**Poděkování:**

Ráda bych na tomto místě poděkovala Ing. Jiřímu Bártovi, Ph.D. za jeho trpělivost, ochotu, pomoc při práci v laboratoři a za cenné rady. Dále patří můj dík všem z laboratoře, kteří mi jakkoliv pomohli během práce. V neposlední řadě děkuji své rodině za podporu během studia.

## Obsah:

1. Úvod .....	1
2. Rod <i>Thiobacillus</i> .....	2
2.1. Koloběh síry .....	2
2.2. Koloběh dusíku.....	4
2.2.1. Denitrifikace .....	6
2.3. Metabolismus a genová exprese.....	7
2.3.1. Genom .....	7
2.3.2. Oxidace sloučenin síry .....	8
2.3.3. Exprese genů za aerobních a denitrifikačních podmínek .....	10
2.3.4. Aerobní respirace .....	12
2.3.5. Metabolismus vodíku .....	13
2.3.6. Oxidace uranu .....	13
2.4. Morfologie a životní nároky.....	14
2.5. Kultivace a citlivost na antibiotika.....	14
2.6. Izolace pomocí obohacovací techniky.....	14
3. Detekce <i>Thiobacillus denitrificans</i> pomocí molekulárně biologických metod .....	17
3.1. Metoda FISH .....	17
3.2. CARD-FISH.....	17
3.3. Vývoj specifické 23S rRNA proby.....	18
3.4. PCR.....	21
3.5. Kvantitativní PCR .....	21
3.6. RT-PCR.....	22
3.7. Konkrétní využití PCR metod při molekulárně biologických analýzách genomu bakterie <i>Thiobacillus denitrificans</i> .....	22
4. Materiály a metody .....	24
5. Předběžné výsledky .....	27
5.1. Optimalizace teploty nasedání primerů .....	28
5.2. Testování specifity primerů.....	28
6. Závěr .....	30
7. Seznam zkratk .....	31
8. Seznam literatury.....	32

## 1. Úvod

Vlivem opadu smrkového porostu a díky výrazným síranovým a dusičnanovým depozicím došlo během 20.století v oblastech Šumavy k výrazné acidifikaci půd. Chemické analýzy spodních anaerobních půdních horizontů ukazují zvýšené množství síranů, což nahrává hypotéze, že by zde mohla probíhat ve větší míře biologicky řízená anaerobní oxidace redukovaných forem síry na sírany, za kterou bývá zodpovědná bakterie *Thiobacillus denitrificans*, přestože optimální pH pro růst této bakterie je přibližně neutrální. Izolace a následná kultivace chemolitotrofních mikroorganismů za anaerobních podmínek je obecně velmi obtížná a zdlouhavá. K prokázání výskytu těchto bakterií v daném prostředí mohou dobře posloužit biologické molekulární metody, které nevyžadují klasické kultivační obohacovací techniky.

### Cíle:

- Z dostupné literatury získat podrobné znalosti o biochemii a ekologii bakterie *Thiobacillus denitrificans*, možnosti její izolace a detekce v přirozeném prostředí
- Otestovat různá kultivační media
- Zvolit vhodné medium pro obohacovací techniku izolace *Thiobacillus denitrificans* z reálných vzorků
- Otestovat specificky navržené primery vhodné pro její kvantifikaci

## 2. Rod *Thiobacillus*

Bakterie rodu *Thiobacillus* byly poprvé popsány roku 1904. Tyto chemolitotrofní bakterie získávají energii z anorganických sloučenin síry. Zdrojem uhlíku je pro ně oxid uhličitý, jedná se tedy autotrofní organismy. Jsou bezbarvé a schopné pohybu, který je umožněn jedním polárně umístěným bičíkem. Patří do skupiny gramnegativních bakterií. Jejich buněčná stěna obsahuje pouze jednu vrstvu peptidoglykanu a je překrytá vnější lipopolysacharidovou membránou. Tyto bakterie se reprodukuje klasickým binárním dělením.

Rostou v širokém rozmezí pH i teploty, proto je relativně snadné je v přírodě najít. Vyskytují se v prostředí, kde je přítomen kyslík a síra (např. přechod mezi okysličenou vodou a anaerobními sedimenty). Najdeme je i v zamokřených půdách, ve vodě, v říčních usazeninách, v kyselých sulfátových půdách, v kyselých a hydrotermálních pramenech nebo v odpadních vodách.

Tato skupina bakterií je geneticky i fyziologicky velmi heterogenní. Široká diverzita se projevuje například v obsahu G+C v DNA (50-68%), v zastoupení mastných kyselin nebo možnosti hybridizace DNA (Kelly & Wood 2000).

V půdě jsou často *Thiobacilli* zodpovědné za rozpouštění sírých sloučenin jako je pyrit a další kovové sulfidy, což dělá síru dostupnou pro asimilaci jinými organismy a rostlinami.

Mezi nejznámější druhy patří *T. ferrooxidans* ( $\gamma$  - Proteobakterie), *T. acidophilus* ( $\alpha$ - Proteobakterie) nebo *T. denitrificans* ( $\beta$  - Proteobakterie), který se od ostatních *Thiobacillů* odlišuje svou schopností růst jako fakultativně anaerobní chemolitotrof.

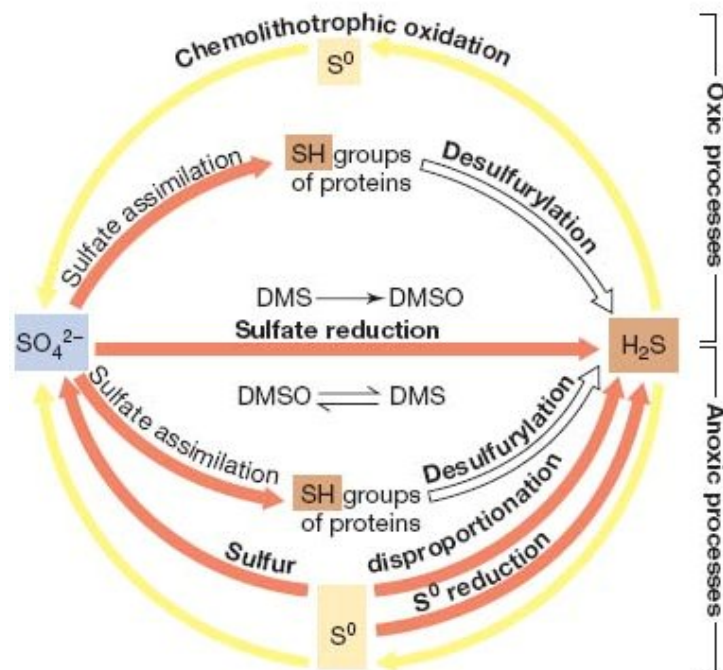
### 2.1. Koloběh síry

Síra se v životním prostředí vyskytuje v několika podobách a to převážně jako čistá síra, ve formě síranů a sulfidů. Tento důležitý prvek je také součástí organismů, kde se podílí na stavbě proteinů (aminokyseliny cystein a methionin), koenzymů a dalších organických látek. Složitost koloběhu síry je dána velkým množstvím oxidačních stavů, od -2 do +6 (Obr.1). V přírodě jsou nejvýznamnější sírné sloučeniny s oxidačním číslem -2 (sulfidy), 0 (elementární síra) a +6 (síran). Největší zásobárnou anorganicky vázané síry v podobě síranů jsou oceány. V terestrických ekosystémech se

převážná část vyskytuje v sedimentech a horninách ve formě síranových minerálů (sádrovec,  $\text{CaSO}_4$ ) nebo sulfidů (pyrit,  $\text{FeS}_2$ ). Celkový obsah síry v půdě kolísá v rozmezí 0,01 - 2%.

Koloběh organicky vázané síry závisí do značné míry na intenzitě mineralizace organických látek, podmíněné činností mikroorganismů. V půdě se uplatňuje obrovské množství různých mikroorganismů, které tento prvek metabolizují. Bakterie hrají roli jak v oxidačních, tak i v redukčních pochodech koloběhu síry. Síru- a sulfid-oxidující bakterie produkují sírany, zatímco síran-redukující bakterie spotřebovávají sírany a produkují sirovodík. Vzhledem k tomu, že je toxický a reaguje s různými kovy, redukce síranů je důležitý biochemický proces.

V anaerobních podmínkách se síra v půdě vyskytuje zejména ve formě sulfidů a při přechodu k aerobním podmínkám dochází k její postupné oxidaci. Jako meziprodukt může být vytvořena elementární síra. Ta je chemicky poměrně stabilní, ale chemolitotrofní bakterie jako *Thiobacillus* a *Acidithiobacillus* ji snadno oxidují dále až na kyselinu sírovou, která je neutralizována bázemi ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ). V případě jejich nedostatku silně okyseluje prostředí a výrazně snižuje pH půdy (v extrémních případech až na  $\text{pH} = 2$ ).



Obr.1.: Na obrázku jsou zobrazeny klíčové procesy koloběhu síry. Oxidace je znázorněna žlutými šipkami, redukce červenými. Reakce bez redoxních přeměn jsou bílé (Biology of Microorganisms, 12.edice; kapitola 24.4).

## 2.2. Koloběh dusíku

Dusík se podobně jako síra v přírodě vyskytuje v různých oxidačních stavech a s tím opět souvisí složitost jeho koloběhu (Obr.2). Hlavní zásobárnou elementárního dusíku je atmosféra. Dusík se vyskytuje ve významných organických sloučeninách (především v aminokyselinách) a ve všech živých organismech.

Vzhledem k rozpustnosti prakticky všech anorganických solí dusíku se téměř nevyskytuje v běžných horninách. Výjimkou je např. čilský ledek ( $NaNO_3$ ). V půdě tvoří zásobu minerálního dusíku amonné a dusičnanové ionty.

Velkou roli v koloběhu dusíku hrají mikroorganismy. Hlavní přeměny, na kterých se podílejí, jsou fixace dusíku, nitrifikace, denitrifikace, a nově objevené anaerobní přeměny dusíku, jako je anaerobní oxidace amoniaku (anammox).

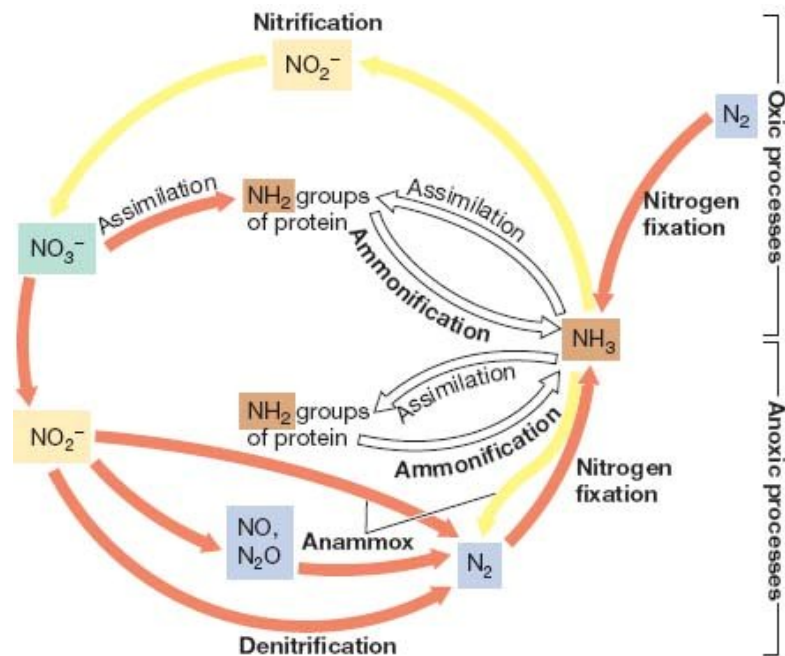
Pouze velmi málo prokaryot je schopno využít  $N_2$  jako zdroj dusíku pro buňku. Díky trojně vazbě mezi atomy dusíku je molekula  $N_2$  chemicky velmi inertní.



Tzv. diazotrofní bakterie (např. *Rhizobium*, *Azotobacter*) mohou pomocí enzymu nitrogenázy a za dodání energie adenosintrifosfátu (ATP) tuto trojnou vazbu v molekule atmosférického dusíku přeměnit na amoniakální N-H vazbu a začlenit jej do organické sloučeniny. Většinou je však dusík přijímán jako amoniak ( $\text{NH}_3$ ) nebo dusičnan ( $\text{NO}_3^-$ ).

Při nitrifikaci dochází k oxidaci  $\text{NH}_3$  na  $\text{NO}_3^-$ . Podílejí se na ní nitrifikační bakterie (např. *Nitrosomonas*). V prvním kroku dochází k oxidaci  $\text{NH}_3$  na  $\text{NO}_2^-$  (tzv. nitritace), ve druhém pak k oxidaci  $\text{NO}_2^-$  na  $\text{NO}_3^-$  (tzv. nitratace).

Proces, ve kterém je amoniak oxidován anaerobně, se nazývá anammox. Elektronovým akceptorem je zde nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ), který oxiduje amoniak. Konečným produktem je  $\text{N}_2$ , který se uvolňuje do atmosféry. S touto přeměnou dusíku se můžeme setkat například u bakterie *Brocadia anammoxidans*.



Obr.2.: Na obrázku jsou zobrazeny klíčové procesy koloběhu dusíku. Oxidace je znázorněna žlutými šipkami, redukce červenými. Reakce bez redoxních přeměn jsou bílé (Biology of Microorganisms, 12.edice; kapitola 24.3).

### 2.2.1. Denitrifikace

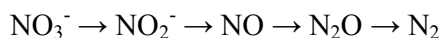
Při anaerobní respiraci jsou finálními receptory elektronů místo kyslíku dusičnany. Při jejich redukci dochází ke vzniku plyných dusíkatých sloučenin ( $N_2$ , NO nebo  $N_2O$ ), které jsou uvolňovány z prostředí.

Denitrifikace je hlavní cestou, při které dochází k biologické tvorbě plynného dusíku. Na druhou stranu, tento proces může být i škodlivý. V zamokřené půdě, hnojené dusičnany nebo zvýšenými dusíkovými depozicemi může dojít k vytvoření anoxických podmínek a tedy ke zvýšené denitrifikaci, což způsobí odstraňování dusičnanu z půdy v podobě plyných produktů.

Oxid dusný patří mezi tzv. skleníkové plyny. Absorbuje tepelné záření a toto záření zpětně vyzařuje, což souvisí s globálním oteplováním Země. Jeho potenciál přispívat k intenzifikaci skleníkového efektu je ve srovnání s nejvíce diskutovaným oxidem uhličitým 270 - 310x vyšší ([http://www.irz.cz/repository/latky/oxid\\_dusny.pdf](http://www.irz.cz/repository/latky/oxid_dusny.pdf), 2011). Oxid dusný v současné době představuje největší nebezpečí pro ozonovou vrstvu (Ravishankara *et al.* 2009). Zhruba dvě třetiny celkových ročních emisí se uvolňují z půdy přirozenou cestou, zbývající třetina je výsledkem lidské činnosti.

Se schopností redukovat dusičnany se setkáváme především u některých druhů bakterií (např. *Paracoccus denitrificans*, *Thiobacillus denitrificans*). Denitrifikaci ale dokáží využívat i některá archaea a houby, např. *Fusarium oxysporum* (Shoun *et al.* 1991). Denitrifikace probíhá buď za striktně anaerobních podmínek, nebo jen při velmi nízkých koncentracích rozpuštěného kyslíku (pod  $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ ). Většina denitrifikačních prokaryot je fakultativně aerobní. V přítomnosti kyslíku aerobní respirace probíhá i pokud je v médiu k dispozici nitrát. Denitrifikační enzymy jsou v přítomnosti molekulárního kyslíku reprimovány.

Celý proces denitrifikace se skládá ze čtyř jednotlivých respiračních kroků - respirace dusičnanu (tzv. nitrátové respirace), respirace dusitanu (nitritové respirace), respirace oxidu dusnatého a respirace oxidu dusného. Reakce jsou katalyzovány denitrifikačními enzymy.



Nitrátoreduktáza katalyzuje přeměnu dusičnanu na dusitan. Existují dva druhy, periplazmatická nitrátoreduktáza a membránově vázaná nitrátoreduktáza. Nitritoreduktáza katalyzuje přeměnu dusitanu na oxid dusnatý. Membránově vázaný enzym reduktáza

oxidu dusnatého je využíván při redukcí oxidu dusnatého na oxid dusný. V posledním kroku denitrifikace katalyzuje reduktáza oxidu dusného oxid dusný na dusík.

V kyselém prostředí probíhá denitrifikace pomaleji, optimální je pH kolem 7. Kyselost prostředí má vliv i na konečné produkty denitrifikace. Při nižším pH se tvoří více oxidů dusíku, zatímco při zvýšení pH nad 6 převažuje produkce elementárního dusíku (Šimek *et al.* 2002).

### 2.3. Metabolismus a genová exprese

*Thiobacillus denitrificans* je široce rozšířená chemolitoautotrofní bakterie s neobvyklým metabolismem, spojující výše zmíněné biogeochemické cykly dusíku a síry. Kromě toho může katalyzovat nitrát-dependentní oxidaci  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{U}^{4+}$  a oxidovat minerální elektronové donory jako je FeS (Straub *et al.* 1996) a  $\text{UO}_2$  (Beller 2005). Metabolický repertoár této bakterie tedy může ovlivňovat nejenom biogeochemické cykly dusíku, síry, ale i železa a uranu. Z hlediska životního prostředí je *Thiobacillus denitrificans* významným činidlem při bioremediaci *in situ*. Podílí se na odstraňování dusičnanů, hlavních kontaminantů znečištěných vod.

#### 2.3.1. Genom

*Thiobacillus denitrificans* patří mezi  $\beta$  - Proteobakterie. Obsahuje typický bakteriální genom, tedy jeden kruhový chromosom. Jedná se o haploidní organismus. Velikost genomu sekvenovaného kmene ATCC 25259 je 2 909 809 bp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=18750>). Průměrný obsah G+C je 66,1%. Počet repetitivních sekvencí, inzerčních sekvencí a transposonů je ve srovnání s dodnes sekvenovanými bakteriálními genomy nízký. Pravděpodobný počátek replikace chromozomu je na jedné straně ohraničen geny *dnaA* (Tbd0001 - chromosomal replication initiator protein DnaA), *dnaN* (Tbd0002 - DNA polymerase III subunit beta) a *gyrB* (Tbd0003 - DNA gyrase subunit B), na straně druhé geny *rpmH* (Tbd2827 - 50S ribosomal protein L34P) a *rnpA* (Tbd2826 - ribonuclease P protein component).

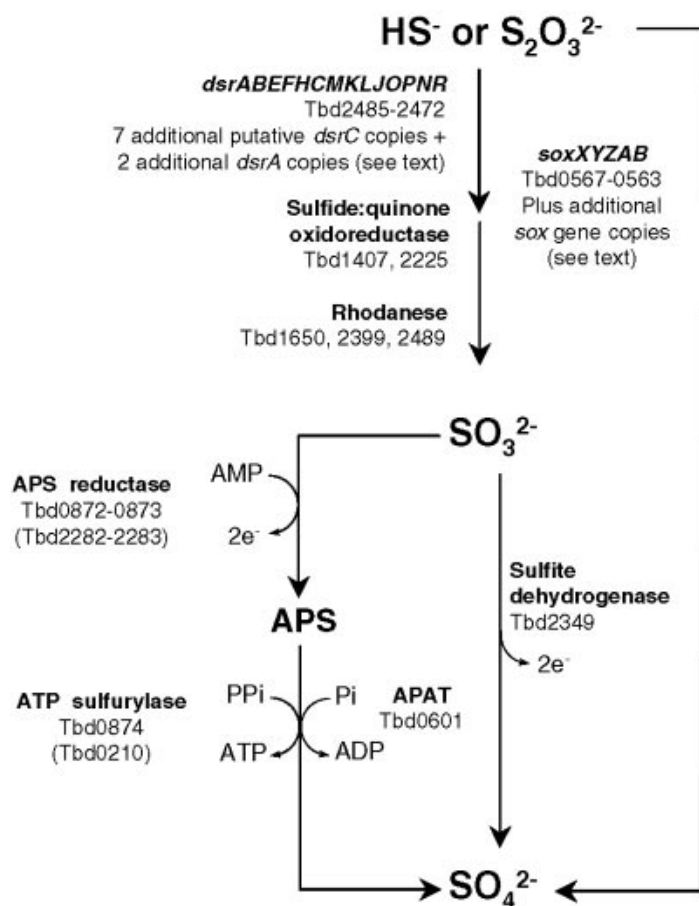
Při sekvenaci genomu (Beller *et al.* 2006) bylo identifikováno 2 827 genů, které kódují proteiny. Průměrná délka těchto genů byla 952 bp, což zahrnuje asi 92,5% genomu. Z toho 644 genů (22,8%) kóduje proteiny s dosud neznámou funkcí. 2183 genů (77,2%) kóduje proteiny, jejichž funkce je známa. Nejčastěji jsou to proteiny, které se podílí na energetickém metabolismu (6,6%), tvorbě buněčných obalů (6,0%) a transportu anorganických iontů (5,7%).

Na základě určitého sestavení bazí (importovaných z různých evolučních zdrojů) se předpokládá, že některé geny byly do genomu začleněny horizontálním přenosem. Minimálně 13 míst (o velikosti až 25 kb) vykazuje nápadné odchylky v tripletové signatuře a v obsahu G+C. Tyto úseky zřejmě neměly dostatek času k tomu, aby se přiblížily genomovému průměru. Z toho vyplývá, že byly integrovány do genomu poměrně nedávno. Několik z těchto oblastí je dokonce z obou stran ohraničováno tRNA geny. Ty jsou mnohými bakteriofágy využívány jako integrační místa. To by vedlo k závěru, že téměř všechny tyto oblasti přineslo do genomu začlenění fága nebo jeho zbytků.

### 2.3.2. Oxidace sloučenin síry

Důležitost oxidace sirných sloučenin u bakterie *Thiobacillus denitrificans* je zvýrazněna výskytem vícenásobných oxidačních drah a početnými kopiemi genů spojovaných s touto oxidací (Obr.3). Oxidace thiosíranů nebo  $\text{HS}^-$  vede k tvorbě siřičitanů. Ty mohou být dále oxidovány na sírany buď přímou cestou (za účasti enzymu sulfid dehydrogenázy) nebo nepřímo přes meziproduct adenylsulfát (APS). Tato reakce je katabolizována APS reduktázou. V dalším kroku reakce se uplatňují ATP sulfuryláza a APS:fosfát adenyltransferáza (APAT). Možná je i přímá oxidace výchozích látek ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  nebo  $\text{HS}^-$ ) na sírany.

Otázkou je, zda při neobvyklé schopnosti oxidovat anorganické sirné sloučeniny za aerobních i anaerobních podmínek, bakterie využívá stejné nebo odlišné enzymy.



Obr.3.: Schematický přehled genů a enzymů spojených s oxidací siřných sloučenin u bakterie *Thiobacillus denitrificans* (Beller *et al.* 2006a).

Nejdůležitější enzymy potřebné pro oxidaci siřných sloučenin u bakterie *Thiobacillus denitrificans* jsou APS reduktáza, AMP-dependentní sulfit-oxidáza, APAT a Fe-S protein sulfit-reduktáza.

*Thiobacillus denitrificans* ATCC 25259 obsahuje geny kódující všechny enzymy nutné ke katalýze adenosinmonofosfát (AMP) - dependentní oxidace siřčitanu na síran. Až na jeden jsou všechny tyto enzymy využívány v opačném směru u síran - redukujících bakterií k přeměně síranu na APS a dále až na siřčitan. Při této redukci dochází k zisku energie. APS reduktáza,  $\alpha\beta$ -heterodimerický železo-siřný flavoenzym, naopak katalyzuje AMP-dependentní oxidaci siřčitanu na APS. Je kódována geny Tbd0872 (adenylylsulfate reductase subunit alpha) a Tbd0873 (adenylylsulfate reductase subunit beta). Také další pár genů, Tbd2282 (adenylylsulfate reductase subunit alpha) a Tbd2283 (adenylylsulfate reductase subunit beta), kóduje  $\alpha$  a  $\beta$

podjednotky tohoto enzymu. Výsledky real-time kvantitativní polymerázové řetězové reakce (RT-qPCR) však ukázaly, že Tbd0872-Tbd0873 jsou při oxidaci thiosíranu exprimovány v mnohem větším množství. ATP sulfuryláza katalyzuje substrátovou fosforylací. Při ní dochází ke vzniku ATP a přeměně APS na síran. Je kódována genem Tbd0874 (sulfate adenylyltransferase), exprimován je i gen Tbd0210 (bifunctional sulfate adenylyltransferase subunit 1/adenylylsulfate kinase protein). APAT je kódován genem Tbd0601 (galactose-1-phosphate uridyl transferase, class I). Katalyzuje alternativní substrátovou fosforylací. Zde přeměnou APS na síran dochází k tvorbě ADP. Není reverzibilní.

Mezi nejdůležitější geny odpovědné za oxidaci sirných sloučenin patří sulfur - oxidation system (*sox*) geny, dissimilatory sulfite reductase (*dsr*) geny a geny asociované s AMP-dependentní oxidací siřičitanu na síran.

Při porovnávání genů (zodpovědných za oxidaci sirných sloučenin) s  $\alpha$ -proteobakteriemi *Paracoccus pantotrophus*, *Starkeya novella* a *Pseudaminobacter salycilatoxidans* vykazovaly *sox* geny bakterie *Thiobacillus denitrificans* různou úroveň sekvenční shody. Ovšem genové cluster (v takové délce, ve které je můžeme najít u těchto fakultativně chemolitotrofních, aerobních, thiosíran-oxidujících bakterií) se zde nevyskytovaly. V genomu můžeme najít ještě další geny, které pravděpodobně hrají roli v oxidaci sirných sloučenin. Kódují sulfid:chinon oxidoreduktázu. V genomu bakterie *Thiobacillus denitrificans* jsou přítomné geny kódující dimethyl sulfoxid (DMSO) reduktázu a tetrathionát reduktázu. Spíše než při oxidaci sirných sloučenin ale slouží jako anaerobní elektronové akceptory.

### 2.3.3. Exprese genů za aerobních a denitrifikačních podmínek

*Thiobacillus denitrificans* je schopen získávat energii oxidací anorganických sloučenin za aerobních i anaerobních podmínek. Tento fakultativní anaerob využívá oxidace sloučenin síry pro fixaci oxidu uhličitého. Podle toho, zda je terminálním akceptorem elektronů nitrát nebo kyslík, může exprimovat ribulózu-1,5-bisfosfát-karboxylázu (RubisCO) I nebo RubisCO II. Tyto dvě formy mají rozdílnou afinitu k CO<sub>2</sub> a konkurenčnímu O<sub>2</sub>. Proto se účinnost fixace CO<sub>2</sub> za aerobních a anaerobních podmínek liší. Některé geny těchto bakterií se shodují s geny aerobních

chemolitotrofních síru-oxidujících bakterií, některé naopak s geny přítomnými u anaerobních fototrofních sírných bakterií.

Bylo identifikováno 277 genů (tedy asi 10% genomu), které jsou za aerobních a anaerobních podmínek rozdílně exprimovány (Beller *et al.* 2006b). Většina z nich se vyskytuje jako genové clustery. Ty mohou být klasifikovány podle funkce do několika kategorií (Tab.I).

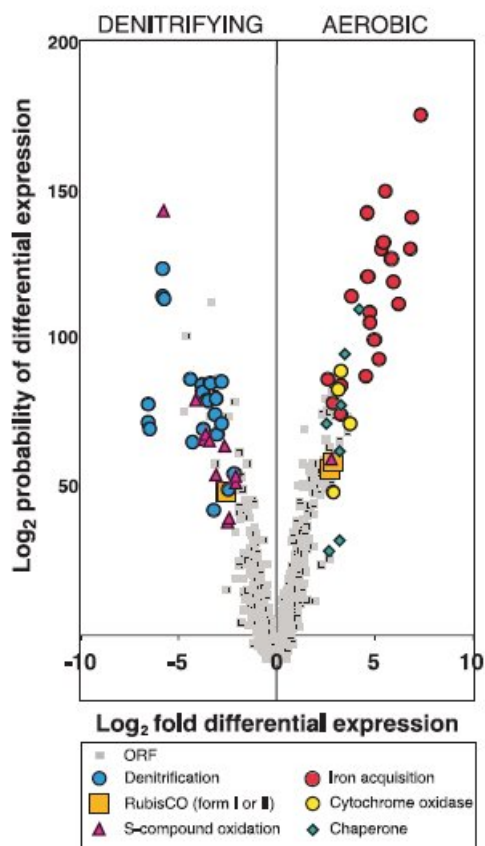
Tab.I.: Funkce genových clusterů rozdílně exprimovaných za aerobních a anaerobních podmínek.

GENOVÉ CLUSTERY ZE ZNÁMOU FUNKCÍ	
AEROBNÍ PODMÍNKY	ANAEROBNÍ PODMÍNKY
spojované se získáním železa geny Tbd0705–Tbd0725	asociované s nitrát-reduktázou: <i>nar</i> cluster geny Tbd1401–Tbd1406
kódující cytochrom <i>cbb<sub>3</sub></i> oxidázu geny Tbd0638–Tbd0643	asociované s nitrit-reduktázou: <i>nir</i> cluster geny Tbd0070–Tbd0077
kódující chaperony geny Tbd1537–Tbd1539	asociované s reduktázou oxidu dusičného: <i>nor</i> cluster geny Tbd0554–Tbd0562
	asociované s oxidací sírných sloučenin geny Tbd1407–Tbd1408

Za anaerobních podmínek je exprimován gen *cbbM* (Tbd2638 - ribulose biphosphate carboxylase), který kóduje RubisCO II. Naopak v přítomnosti kyslíku jsou exprimovány geny kódující malou a velkou podjednotku RubisCO I.

Některé genové clustery jsou exprimovány jak za aerobních tak za anaerobních podmínek. Jejich funkce ale dosud není známa. Stejně tak např. exprese genu *dsrC* (Tbd1365- sulfite reductase, dissimilatory-type subunit gamma), který je také spojován s oxidací síry, je na přítomnosti kyslíku nezávislá.

Rozdílná exprese genů je znázorněna také na obr.4.



Obr.4.: Zobrazení rozdílné exprese genů a genových clusterů (viz tab.I.) identifikovaných v genomu bakterie *Thiobacillus denitrificans* v anaerobním a aerobním prostředí (Beller *et al.* 2006b). ORF – open reading frames.

### 2.3.4. Aerobní respirace

Genom bakterie *Thiobacillus denitrificans* kóduje všechny potřebné mechanismy pro aerobní respiraci, včetně NADH:CoQ<sub>10</sub> oxidoreduktázy (Tbd1142–Tbd1155), sukcinát dehydrogenázy (Tbd1182–Tbd1185) a cytochrom *bc<sub>1</sub>*- CoQ<sub>10</sub> oxidoreduktázy (Tbd1831–Tbd1833). Terminální respirace kyslíku je spojována se třemi cytochrom *c*-oxidázami, které jsou kódovány dvěma genovými clustery. První cluster kóduje *aa<sub>3</sub>* cytochrom *c*-oxidázu (Tbd0325, Tbd0326, Tbd0328, Tbd0330) a *cbb3* cytochrom *c*-oxidázu (Tbd0338–Tbd0341). Druhý cluster (Tbd0640–Tbd0643)



kóduje druhou *cbb<sub>3</sub>* cytochrom *c*-oxidázu. Přítomnost *aa<sub>3</sub>* i *cbb<sub>3</sub>* umožňuje bakterii snášet široké rozpětí redoxních podmínek. Při vysoké kyslíkové tenzi pravděpodobně pracuje *aa<sub>3</sub>* oxidáza, v mikroaerofilních podmínkách pak funguje *cbb<sub>3</sub>* oxidáza (Beller *et al.* 2006a).

### 2.3.5. Metabolismus vodíku

Sekvenace genomu dále odhalila přítomnost genů kódujících dvě [NiFe]hydrogenázy (Beller *et al.* 2006a). Tyto metaloenzymy katalyzují reverzibilní oxidaci H<sub>2</sub> na protony a jsou zásadními složkami energetického metabolismu mnohých mikrobů. Jejich výskyt v bakteriích *Thiobacillus denitrificans* ale nebyl dříve znám. Pokud je výhradním elektronovým donorem za denitrifikačních podmínek vodík, bakterie nejsou schopny růstu. Předpokládá se, že oxidace vodíku je vyžadována pro nitrát-dependentní oxidaci uranu, se kterou se u této bakterie můžeme také setkat.

### 2.3.6. Oxidace uranu

Při oxidaci U<sup>4+</sup> dochází k přeměně relativně rozpustného UO<sub>2</sub> na nerozpustný minerál, obsahující U<sup>6+</sup>. To může ztěžovat remediaci uranem-kontaminovaných prostředí. Tento proces probíhá pouze za anaerobních podmínek a v přibližně neutrálním pH. Vyžaduje přítomnost dusičnanu a silně koreluje s jeho spotřebou (Beller 2005). Schopnost mikroorganismů provádět anaerobní nitrát-dependentní oxidaci UO<sub>2</sub> byla poprvé uveřejněna v roce 2002 (Finneran *et al.* 2002; Senko *et al.* 2002). Doposud byla prokázána jen u dvou bakterií - chemoorganotrofní *Geobacter metallireducens* a chemilitoautotrofní *Thiobacillus denitrificans*. Hlavní roli v této oxidaci hrají dva membránově asociované cytochromy, zřejmě *c<sub>4</sub>* a *c<sub>5</sub>*. Inzerční mutace v genech kódujících tyto cytochromy (Tbd0187 - cytochrome *c* oxidase a Tbd0146 - cytochrome *c<sub>5</sub>*) způsobily více než 50% pokles oxidace (Beller *et al.* 2009).

## 2.4. Morfologie a životní nároky

Bakterie má tyčinkovitý tvar a pomocí jednoho polárně umístěného bičíku je schopna se pohybovat. Velikost je přibližně  $0.5 \times 1.0\text{--}3.0 \mu\text{m}$ . Dává přednost vlhčímu prostředí (patří mezi mezofilní organismy), přibližně neutrálnímu pH (6.8 – 7.4) a teplotě kolem  $30^\circ\text{C}$ . Je široce rozšířená, najdeme ji v půdě, sladkovodních i mořských sedimentech nebo v odpadní vodě. Není patogenní. K rozmnožování bakteriálních buněk dochází pomocí binárního dělení, tedy nepohlavně. Spóry netvoří (Kelly & Harrison, 1989).

## 2.5. Kultivace a citlivost na antibiotika

*Thiobacillus denitrificans* lze kultivovat na různých typech kultivačních médií. Při kultivaci za anaerobních podmínek a teplotě  $30^\circ\text{C}$ , lze pozorovat viditelné bakteriální kolonie po 7 - 10 dnech. Zpočátku průhledné nebo slabě opalescentní kolonie později vlivem síry zbledají. Při anaerobní kultivaci může díky uvolňování dusíku na pevných médiích dojít k popraskání agaru, v tekutých médiích pak vidíme jeho uvolňování v podobě bublinek.

Růst lze inhibovat použitím různých antibiotik. Při kultivaci na pevných médiích bakterie vykazovaly citlivost na chloramfenikol, gentamicin, kanamycin, streptomycin a tetracyklin. Při kultivaci na kapalném médiu vykazovaly navíc citlivost k ampicilinu. Oproti pevnému médiu, kde doba růstu byla asi 10 dní, na tekutém médiu bakterie rostly mnohem rychleji, přibližně 2 dny (Letain *et al.* 2007).

## 2.6. Izolace pomocí obohacovací techniky

Většina přírodních prostředí obsahuje početnou populaci mikroorganismů různých druhů. Některé bakterie ale mohou růst pomaleji než ostatní přítomné druhy nebo mohou být ve vzorku přítomny v malém množství. Při kultivaci takovýchto druhů se používá tzv. obohacovací metoda, kdy díky určitým kultivačním podmínkám a složení média můžeme zvýhodnit růst dané bakterie. Principem této metody je tedy přirozená selekce. Pokud na kultivační medium naočkujeme smíšenou bakteriální

kulturu, organismus, pro kterého je medium selekční, bude vykazovat nejlepší růst. Opakovanou subkultivací do nového media stejného složení je tedy možné získat čistou kulturu. Protože některé bakterie mají velmi specifické požadavky pro růst, je nutné vytvořit kultivační podmínky tak, jak určitý druh vyžaduje. Růst konkrétní bakterie můžeme zvýhodnit např. vhodnou úpravou pH kultivačního media, teplotou inkubace, přítomností kyslíku při inkubaci nebo složením kultivačního média (podle nároků daného organismu na živiny). Jedno z doporučených složení media pro kultivaci *Thiobacillus denitrificans* je uvedeno v tab.II.

Výhodou této metody je relativně jednoduchá cesta k izolaci čisté kultury málo početně zastoupených bakteriálních druhů ze smíšené kultury. Počet izolovaných mikroorganismů ovšem nikdy nerepresentuje skutečný počet nalezený v prostředí. Další nevýhodou je častá kontaminace obohacovaných kultur.

Čistá kultura bakterie *Thiobacillus denitrificans* byla touto metodou získána poprvé v roce 1904 (M. Beijerinck 1904).

Tab.II.: Doporučené medium pro kultivaci bakterie *T. denitrificans* podle ATCC databáze.

sloučenina	g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1
CaCl <sub>2</sub>	0,03
FeCl <sub>3</sub>	0,02
MnSO <sub>4</sub>	0,02
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	10
NaHCO <sub>3</sub>	0,5
KNO <sub>3</sub>	2,5

Pro přípravu pevného media je nutno přidat 15g agaru. NaHCO<sub>3</sub> je lepší připravit odděleně, tedy danou navážku rozpustit v 10 ml destilované vody, sterilovat zvlášť a s roztokem kultivačního media smíchat až po sterilizaci. Předejdeme tak vysrážení. Pro úpravu pH (optimální je 7) se používá 1M HCl nebo 1M NaOH.

Existuje spousta modifikací kultivačních medií pro *Thiobacillus denitrificans* (Beller 2005; Letain *et al.* 2007; Beller *et al.* 2006b; Baldensperger & Garcia 1975; Ma *et al.* 2006). Liší se přítomností a koncentrací některých anorganických chemických sloučenin, stopových prvků nebo vitamínů. Důležitá je ovšem přítomnost thiosíranu, který je pro tuto bakterii zdrojem energie. Při anaerobní kultivaci je finálním akceptorem elektronů místo kyslíku dusičnan, proto musí být v kultivačním mediu také přítomen. Nejčastěji se přidává ve formě  $\text{KNO}_3$ .

Při konkrétním použití různě chemicky definovaných médií je třeba zohlednit zdroj bakterií (např. při obohacovacích metodách může hrát roli i typ půdy, kde byl vzorek odebrán) a podmínky kultivace (přítomnost kyslíku, pH).

### **3. Detekce *Thiobacillus denitrificans* pomocí molekulárně biologických metod**

Izolace a následná kultivace chemolitotrofních organismů za anaerobních podmínek je obecně velmi obtížná. Proto se často pro detekci bakterií v půdě využívají molekulárně biologické metody, umožňující studium diverzity i kvantity mikrobiálních společenstev bez nutnosti kultivace, např. quantitative polymerase chain reaction (qPCR), catalyzed reporter deposition fluorescence in situ hybridization (CARD - FISH). Pro tyto metody je důležitá znalost sekvenace genomu nebo specifických genů dané bakterie (kvůli navržení specifických prob a primerů).

#### **3.1. Metoda FISH**

FISH se v oblasti mikrobiální ekologie často využívá k identifikaci organismů (např. v biofilmech). Pomocí detekce a lokalizování přítomnosti nebo absence specifických sekvencí DNA na chromosomech můžeme porovnávat genomy různých biologických druhů ([http://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescent\\_in\\_situ\\_hybridization](http://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescent_in_situ_hybridization)). Používají se specifické proby - DNA nebo RNA oligonukleotidy komplementární k sekvenci cílové RNA. Jsou označeny fluorescenčními barvivy a hybridizují s tou částí chromozomu, která vykazuje vysoký stupeň sekvenční podobnosti. Bakteriální fluorescenční proby jsou komplementární k sekvenci rRNA (16S nebo 23S rRNA), se kterou v buňce hybridizují. Ribozomy jsou rozptýleny po celé bakteriální buňce, takže při pozorování vzorku pod fluorescenčním mikroskopem buňka jasně svítí.

#### **3.2. CARD - FISH**

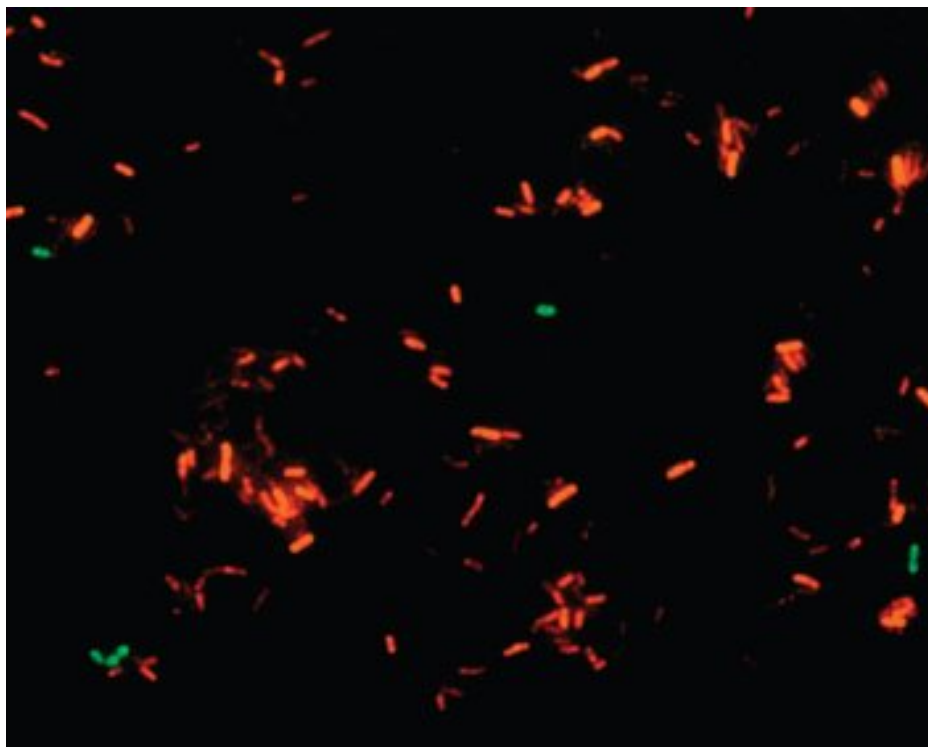
FISH může být použit i k měření genové exprese. Cílovým místem je pak mRNA. Ta se ale v buňce nevyskytuje tak hojně jako rRNA, takže standardní FISH nelze použít. Také buňky, které rostou velmi pomalu nebo za nepříznivých podmínek (nedostatek živin nebo nízké teploty), mají málo ribozómů a FISH vykazuje pouze slabý signál. Pro zesílení tohoto signálu se používá tzv. CARD-FISH. Specifické proby

obsahují konjugované molekuly peroxidázy. Po hybridizaci s cílovou sekvencí se přidává vysoce fluorescenční barvivo - tyramid. Ten je činností přítomné peroxidázy přeměněn na velmi reaktivní produkt a váže se na sousední protein. Každá molekula peroxidázy aktivuje mnoho molekul tyramidu. Dojde tak k dostatečnému zesílení signálu, který už prostřednictvím fluorescenční mikroskopie zachytit lze.

### **3.3. Vývoj specifické 23S rRNA proby pro *Thiobacillus denitrificans***

V předchozích studiích došlo při použití široce aplikované 23S rRNA prob BET42a/GAM42a (Manz *et al.* 1992, Tab. III) k chybnému zařazení *T. denitrificans* jako zástupce Gammaproteobakterií (Haaijer *et al.* 2006).

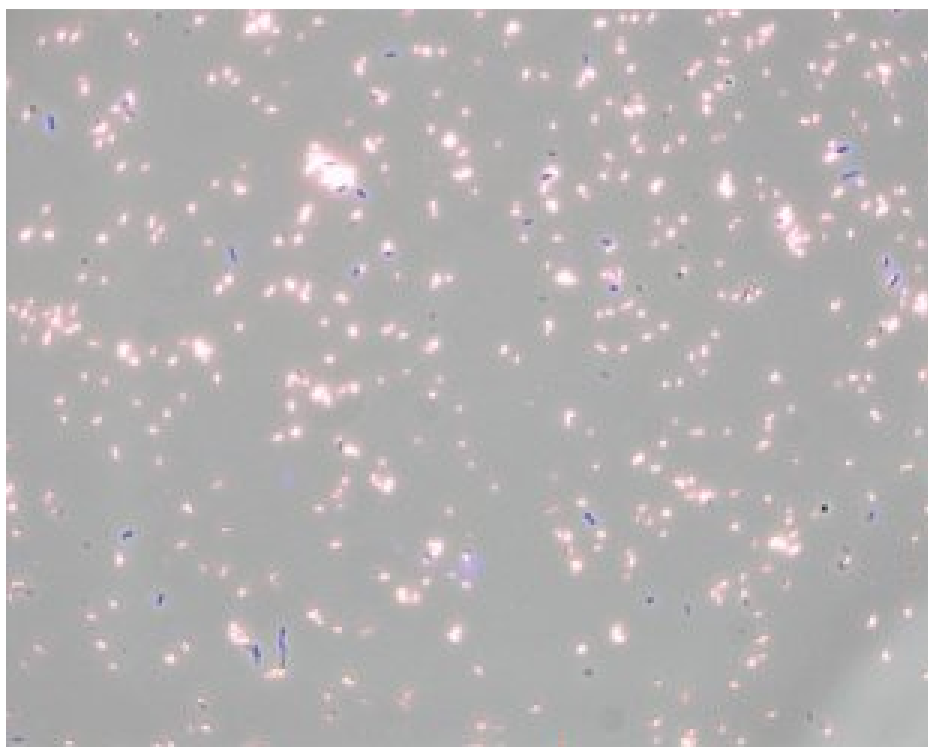
Obohacené kultury *T.denitrificans* ukázaly, že 99% bakterií hybridizovalo s probou GAM42a (Obr.5). Referenční kmen *T.denitrificans* vykazoval s touto probou 100% hybridizaci. Tyto výsledky ovšem zcela odporovaly genovým analýzám 16S rRNA (Bucholz-Cleven *et al.*1997; Straub *et al.* 2004), které *T.denitrificans* zařazují mezi  $\beta$ -proteobakterie.



Obr.5.: FISH obohacené kultury s 23S rRNA probami BET42a/GAM42a. Bakterie hybridizující s BET42a jsou zelené, bakterie hybridizující s GAM42a jsou červené (Haaijer *et al.* 2006).

Výzkum genové sekvence 23S rRNA odhalil, že tato sekvence obsahuje přesnou shodu s probou GAM42a, ačkoliv bakterie patří mezi Betaproteobakterie. Bylo zjištěno, že thymin přítomný v pozici 1033 u betaproteobakteriálního *T. denitrificans* je ve výsledku cílové místo pro FISH probu GAM42a, což vede k chybné identifikaci. Pro vyřešení tohoto problému byla vyvinuta nová proba pro betaproteobakteriální *Thiobacillus* - Bethio 1001 (Haaijer *et al.* 2006, Tab. III). Ta s referenčním kmenem DSM 739 hybridizuje 99,9%.

Bakterie v obohacené kultuře obsahující bakteriální set prob i probu Bethio1001 vykazovaly v 99% hybridizaci s oběma typy prob (Obr.6). Pouze 1% hybridizovalo s bakteriálním setem prob BET42a/GAM42a. Pečlivým zkoumáním morfologie těchto dvou typů bakterií bylo zjištěno, že bakterie hybridizující pouze s BET42a/GAM42a jsou o něco větší a ve fázovém kontrastu mají ve srovnání s bakteriemi hybridizujícími s oběma probami tmavší barvu. 2% všech bakterií přítomných v kultuře nehybridizovalo s žádnou probou.



Obr.6.: FISH obohacené kultury s probami BET42a/GAM42a a probou Betthio1001. Bakterie hybridizující s BET42a/GAM42a jsou červené, bakterie hybridizující s Betthio1001 jsou modré. Dvojitá hybridizace vede k růžovobílému zbarvení (Haaijer *et al.* 2006).

Tab.III.: Specifikace fluorescenčních prob testovaných k identifikaci bakterie *Thiobacillus denitrificans* pomocí FISH (Haaijer *et al.* 2006).

název	sekvence (5'-3')	specifika	značení	odkaz
BET42a	GCCTTCCCACATCGTTT	$\beta$ - proteobakterie	FLUOS	Manz <i>et al.</i> 1999
GAM42a	GCCTTCCCACATCGTTT	$\gamma$ - proteobakterie	Cy-3	Manz <i>et al.</i> 1999
Betthio 1001	CTTAGCACGTCATTTGGG ACC	Betaproteobakteriální <i>Thiobacillus</i>	Cy-3 FLUOS	Haaijer <i>et al.</i> 2006

Pokud vzorek obsahuje značné množství *T. denitrificans*, užití sady prob BET42a/GAM42a je kvůli chybné identifikaci bakterie velmi omezené. Otázkou zůstává, zda všechny betaproteobakteriální zástupci rodu *Thiobacillus* mají stejnou



přeměnu A na T v cílovém místě pro BET42a/GAM42 proby, nebo zda je tento jev omezen pouze na *T.denitrificans*.

Dřívější FISH analýzy ukázaly, že bakteriální 16S rRNA proby vykazují za různých kultivačních podmínek velké odchylky v intenzitě signálu. Například pokud buňka hladoví, vyčerpání živin jako je fosfát, dusík, uhlík nebo  $Mg^{2+}$  vede k dramatické ztrátě ribozomů, v některých studiích se uvádí až 95% úbytek (Deutscher 2003). Počet malých ribozomálních podjednotek tak klesá pod detekovatelnou hranici, ale velké ribozomální podjednotky jsou stále přítomné v detekovatelném množství. Proto 23S rRNA proba Betthio 1001 je mnohem účinnější pro detekci *T.denitrificans* než bakteriální 16S rRNA proby, obzvláště pokud jsou fyziologické podmínky dané bakteriální kultury neznámé.

### **3.4. PCR**

Polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction, PCR) je metoda, která se využívá k amplifikaci určitého úseku DNA. Za objev PCR techniky obdržel Dr. Kary B. Mullis v roce 1993 Nobelovu cenu za chemii.

Jako matrice pro syntézu komplementárních řetězců slouží tzv. templátová DNA. Obsahuje sekvenci, kterou chceme amplifikovat. K amplifikaci určitého úseku DNA pak potřebujeme pufovací roztok s termostabilní DNA polymerasou, specifické primery a čtyři druhy dNTP.

### **3.5. Kvantitativní PCR**

Kvantitativní real-time PCR (RT-qPCR) je moderní technika molekulární biologie, umožňující průběžné sledování množství amplifikovaného produktu během jednotlivých cyklů reakce. Tato rychlá, citlivá a spolehlivá metoda se používá k detekci specifických organismů a kvantifikaci genové exprese.

Klíčové je použití fluorescenční barvy, která po navázání na DNA fluoreskuje (SYBR Green nebo fluorescenčně označené sonda, která se specificky váže na sekvenci mezi použitými primery). Míra fluorescence DNA polymerázy při syntéze komplementárních vláken tuto sondu hydrolyzuje. Tím dochází k uvolnění

fluorescenční látky a k nárůstu fluorescence. Ta je detekována a zaznamenána v reálném čase. Množstevní přírůstek produktu je přímo úměrný intenzitě fluorescenčního záření. Na základě změny intenzity tohoto záření tedy můžeme určit konkrétní množství produktu v daném čase.

### 3.6. RT - PCR

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) slouží k detekci a kvantifikaci mRNA. Z hlediska nižší stability RNA se přepisuje reverzní transkriptázou na cDNA, která je stabilnější a může být dále analyzována. Při dlouhodobějším skladování nebo při opakovaném rozmrazování extrahované RNA hrozí její degradace a tudíž výrazné zkeslení dalších analýz. Detekce a kvantifikace mRNA je pomocí metody RT-PCR velmi citlivá - je možné ji provést již u jediné buňky (Bustin 2004).

### 3.7. Konkrétní využití PCR metod při molekulárně biologických analýzách genomu bakterie *Thiobacillus denitrificans*

Metoda RT-qPCR byla využita například při analýze exprese genů kódujících rozpustný cytoplazmatický protein *dsrC* (Beller et al. 2006a).

Bakterie byly kultivovány anaerobně, médium obsahovalo thiosíran a dusičnan. Část buněk byla resuspendována s thiosíranem (20mM) a dusičnanem (20mM), část s  $\text{FeCO}_3$  (3,5mmol/l) a dusičnanem (3,5mM). Následné chemické analýzy měly potvrdit, že redukce dusičnanu probíhá buď při současné oxidaci thiosíranu nebo při oxidaci  $\text{Fe}^{2+}$ .

RNA byla reverzně transkribována a amplifikována s genově-specifickými primery. Pro tuto studii byly amplifikovány *dsrC* geny (Tab. IV).

Tab.IV.: Geny zodpovědné za kódování *dsrC* (popis podle National Center for Biotechnology Information; NCBI databáze).

GENE SYMBOL	GENE DESCRIPTION
Tbd2480	putative sulfite reductase
Tbd2488	putative sulfite reductase gamma chain
Tbd2658	DsrC -like protein
Tbd2326	putative sulfite reductase
Tbd2327	putative sulfite reductase
Tbd1365	sulfite reductase, dissimilatory-type subunit gamma
Tbd1408	sulfite reductase gamma chain
Tbd1926	putative dissimilatory sulfite reductase

Všechny tyto geny byly transkribovány jak při oxidaci thiosíranu, tak při oxidaci  $\text{Fe}^{2+}$ . Míra transkripce při oxidaci thiosíranu byla ovšem zhruba o jeden řád vyšší. Relativně vysokou expresi i při oxidaci  $\text{Fe}^{2+}$  vykazoval jen gen Tbd2480, což naznačuje, že by mohl být exprimován konstitutivně.

#### 4. Materiály a metody

Testované specifické primery byly navrženy na gen kodující 16SrRNA a úsek o velikosti 161 bp. Specifičnost primerů byla ověřena pomocí databáze RDP (Ribosomal database project).

Výchozí koncentrace navržených primerů byla 100  $\mu\text{M}$ , koncentrace dNTP 10 mM. Do MasterMixu (Tab.V) byl přidán bovine serum albumin (BSA) a dimethylsulfoxid (DMSO), sloužící jako PCR enhancery. Byla použita FastStart polymeráza (ROSCHE).

Tab.V.: Složení PCR mixu použitého při optimalizaci teploty nasedání i testování primerů s různými kmeny.

	V ( $\mu\text{l}$ )
voda	19,325
puf	2,500
dNTP	0,500
F primer	0,250
R primer	0,250
BSA	0,300
DMSO	0,625
Taq	0,250

Ke 24  $\mu\text{l}$  MasterMixu byl přidán 1  $\mu\text{l}$  DNA templátu (bakteriální suspenze *Thiobacillus denitrificans*). Takto bylo připraveno 12 vzorků - každý sloužil k testování jiné teploty nasedání primerů (rozmezí teplot 50-61°C). Další dva vzorky byly doplněny PCR vodou a sloužily jako negativní kontrola. Všechny 14 vzorků bylo amplifikováno za daných PCR podmínek (Tab.VI).

Tab.VI.: Přehled trvání a teploty jednotlivých PCR cyklů.

fáze	teplota [°C]	čas [s]	počet cyklů
počáteční	95	180	1
denaturace			
denaturace	95	15	
připojení primerů	50-61	30	35
extenze	72	30	
dosyntéza produktů	72	480	1

PCR produkty byly vizualizovány gelovou elektroforézou na 3% agarózovém gelu v 1xTAE pufru, 5V/cm, 60 min s příslušným markerem (Fermentas).

Pro ověření specifity byly primery testovány s různými templáty (Tab.VII). Teplota nasedání primerů byla zvolena 57°C. K testování byly použity buněčné suspenze - zástupci bakterií, archaeí i eukaryot. U reálných vzorků (8-10) a vzorků hub (11-13, 15) byla použita vyextrahovaná DNA.

Tab.VII.: Přehled testovaných kmenů.

číslo	vzorek	číslo	vzorek
1	(B) <i>Methylocystis</i> sp.	10	PM2 – reálný vzorek
2	(B) <i>Klebsiella pneumoniae</i>	11	(E) <i>Aspergillus oryzae</i>
3	(B) <i>Bacillus subtilis</i>	12	(E) <i>Aspergillus terreus</i>
4	(B) <i>Micrococcus luteus</i>	13	(E) <i>Fusarium solani</i>
5	(B) <i>Alcaligenes faecalis</i>	14	marker
6	(B) <i>Pseudomonas fluorescens</i>	15	(E) <i>Fusarium oxysporum</i>
7	(A) <i>Methanosarcina</i> sp.	16	(B) <i>Thiobacillus denitrificans</i>
8	PO2 – reálný vzorek	17	negativní kontrola
9	PA2 – reálný vzorek		

B – bakterie, A – Archaea, E - eukaryota

Jako reálné vzorky byla využita DNA izolovaná ze třech různých horizontů půdy z odběrových lokalit Plešného jezera:

PO2 – opadový horizont

PA2 – humusový horizont

PM2 – minerální horizont

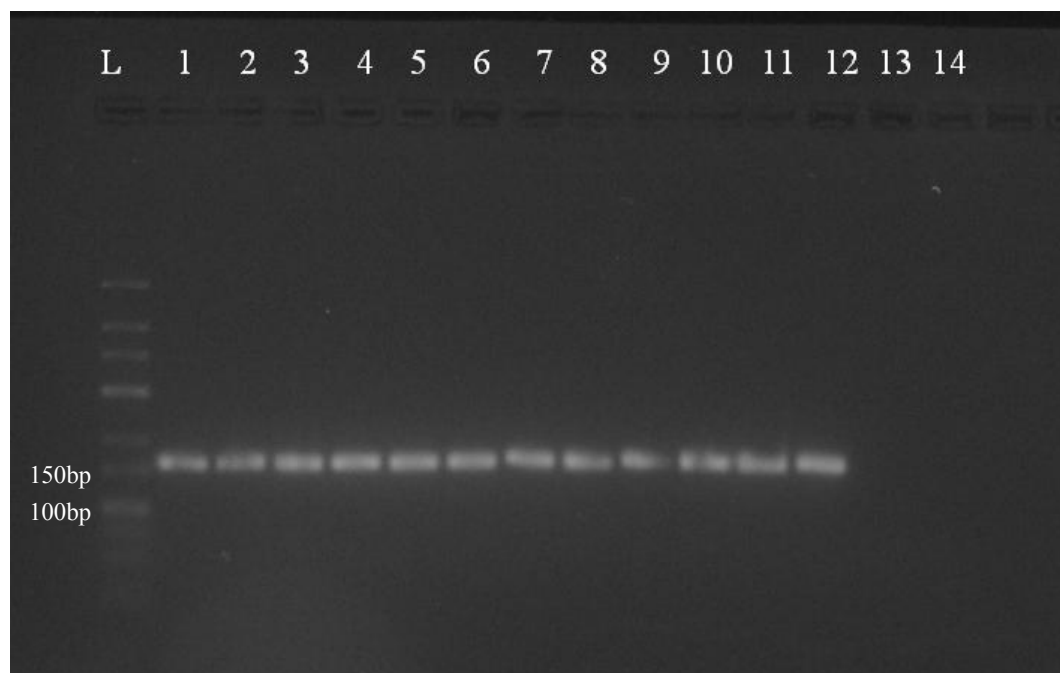
Pro vizualizaci PCR produktů byla použita gelová elektroforéza stejně jako v předchozím případě.

## 5. Předběžné výsledky

Pro vybrání vhodného media pro obohacovací techniku byly otestovány celkem 4 media dostupná z literatury nebo mezinárodních sbírek (ATCC, DSM). Protože čistý kmen *T. denitrificans* prokazatelně nejlépe rostl v mediu ATCC (Tab. II), bylo toto medium zvoleno pro samotnou obohacovací techniku izolace bakterie *T. denitrificans* z reálných vzorků půdy. Jelikož chemolitotrofní mikroorganismy rostou obecně velice pomalu, objevily se viditelné kolonie až po 30 dnech kultivace při 30°C. Sedm viditelných kolonií narostlo na mediu ATCC (Tab. II) ze vzorků humusového horizontu z Plešného jezera. Dále byly rozlišitelné dva typy kolonií, což může indikovat přítomnost alespoň dvou kultivovatelných druhů síru oxidujících bakterií v tomto vzorku. Pro potvrzení, že se skutečně z tohoto reálného půdního vzorku podařilo vyizolovat bakterii *Thiobacillus denitrificans* bude nutné provést další pokusy, například detekovat narostlé kolonie specifickými primery, osekvenování PCR amplikonu a následné porovnání sekvence s online databázemi (RDP a NCBI).

## 5.1. Optimalizace teploty nasedání primerů

Elektroforetické dělení amplifikovaných produktů PCR s rozdílným teplotním gradientem (Obr.7) ukázalo, že optimální teplota nasedání primerů se pohybuje v širokém rozmezí 50 - 61°C.

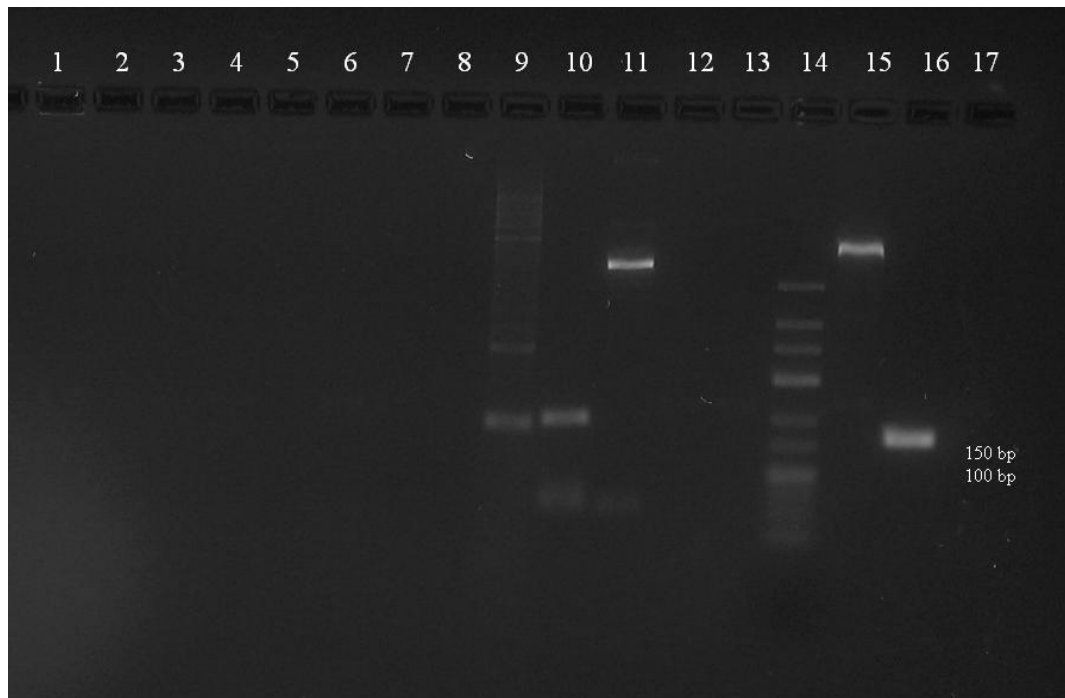


Obr.7.: Optimalizace teploty nasedání primerů. Pořadí vzorků: L – marker, 1-12 (50-61°C), 13,14 – negativní kontrola.

## 5.2. Testování specifity primerů

Elektroforetické dělení (Obr.8) ukázalo přítomnost bandu podobné velikosti (161 bp) jako u čisté kontrolní kultury bakterie *Thiobacillus denitrificans* (č.16) u reálných vzorků humusového a minerálního horizontu (č.9 a 10). Dále testované primery daly vzniknout nespecifickému produktu o velikosti asi 800 bazí u dvou zástupců hub - *Aspergillus oryzae* (č.11) a *Fusarium oxysporum* (č.15). Mimo pozitivní kontroly z čisté bakteriální suspenze *Thiobacillus denitrificans*, kde jsme dostali produkt o očekávané velikosti, byl u všech dalších testovaných bakteriálních kmenů výsledek negativní.





Obr.8.: Testování specifických primerů se zástupci prokaryot, archaeí a eukaryot.

1 - *Methylocystis sp.*, 2 - *Klebsiella pneumoniae*, 3 - *Bacillus subtilis*,  
 4 - *Micrococcus luteus*, 5 - *Alcaligenes faecalis*, 6 - *Pseudomonas fluorescens*,  
 7 - *Methanosarcina sp.*, 8 - PO2, 9 - PA2, 10 - PM2, 11 - *Aspergillus oryzae*,  
 12 - *Aspergillus terreus*, 13 - *Fusarium solani*, 14 - marker, 15 - *Fusarium oxysporum*,  
 16 - *Thiobacillus denitrificans*, 17 - negativní kontrola

## 6. Závěr

Předběžné výsledky ukazují, že v reálných vzorcích je band o podobné velikosti jako u bakterie *Thiobacillus denitrificans*, což by mohlo indikovat přítomnost této bakterie v humusovém a minerálním horizontu půdy z odběrové lokality Plešného jezera. K potvrzení této hypotézy bude potřeba provést sekvenaci daného amplikonu, optimalizovat PCR cyklus a PCR mix s cílem získat pouze specifický band.

Nepřítomnost této fakultativně anaerobní bakterie v opadovém horizontu může mít souvislost s tím, že zde není dostatek redukovaných forem síry. Bakterie tudíž preferuje hlubší půdní horizont s nižším redoxním potenciálem, kde má dostatek sulfidů pro svůj metabolismus. Má zde i více dusičnanů pro anaerobní respiraci oproti opadovému horizontu.

## 7. Seznam zkratek

AMP	adenosinmonofosfát
APAT	APS:fosfát adenylyltransferáza
APS	adenylylsulfát
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	adenosintrifosfát
BSA	bovine serum albumin
CARD-FISH	catalyzed reporter deposition FISH
DMS	dimethylsulfid
DMSO	dimethylsulfoxid
<i>dsr</i>	disimilační reduktáza siřičitanu (dissimilatory sulfite reductase)
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
N <sub>2</sub> OR	reduktáza oxidu dusného
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
NAP	periplazmatická nitrátreduktáza
NAR	membránově vázaná nitrátreduktáza
<i>nar</i>	dusičnan reduktáza
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NIR	dusičitan reduktáza (nitritreduktase)
NOR	reduktáza oxidu dusnatého
ORF	otevřený čtecí rámec (open reading frame)
PCR	polymerázová řetězová reakce
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RDP	Ribosomal database project
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí (Reverse transcription polymerase chain reaction)
RubisCO	ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxyláza
<i>sox</i>	oxidační systém síry (sulfur-oxidation system)

## 8. Seznam literatury

Baldensperger J, Garcia JL (1975) Reduction of Oxidized Inorganic Nitrogen Compounds by a New Strain of *Thiobacillus denitrificans*. Archives of Microbiology 103: 31–36

Beijerinck MW (1904a) Ueber die Bakterien, welche sich im Dunkeln mit Kohlensäure als Kohlenstoffquelle ernähren können. Centralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt II 11, 593–599.

Beller HR (2005) Anaerobic, Nitrate-Dependent Oxidation of U(IV) Oxide Minerals by the Chemolithoautotrophic Bakterium *Thiobacillus denitrificans*. Applied and Environmental Microbiology 71: 2170–2174

Beller HR, Chain PS, Letain TE, Chakicherla A, Larimer FW, Richardson PM, Coleman MA, Wood AP, Kelly DP (2006a) The Genome Sequence of the Obligately Chemolithoautotrophic, Facultatively Anaerobic Bacterium *Thiobacillus denitrificans*. Journal of Bacteriology 188: 1473–1488

Beller HR, Letain TE, Chakicherla A, Kane SR, Legler TC, Coleman MA (2006b) Whole-Genome Transcriptional Analysis of Chemolithoautotrophic Thiosulfate Oxidation by *Thiobacillus denitrificans* under Aerobic versus Denitrifying Conditions. Journal of Bacteriology 188: 7005–7015

Beller HR, Legler TC, Bourguet F, Letain TE, Kane SR, Coleman MA (2009) Identification of *c*-type cytochromes involved in anaerobic, bacterial U(IV) oxidation. Biodegradation 20: 45–53

Buchholz-Cleven BEE, Rattunde B & Straub KL (1997) Screening for genetic diversity of isolates of anaerobic Fe(II) oxidizing bacteria using DGGE and whole-cell hybridization. Systematic and Applied Microbiology 20: 301–309.

Bustin SA (2004) A-Z of quantitative PCR. International University Line 5: 4-29, 141 – 432

Deutscher MP (2003) Degradation of stable RNA in bacteria. *Journal of Biological Chemistry* 278: 45041–45044

Finneran KT, Housewright ME, Lovley DR (2002) Multiple influences of nitrate on uranium solubility during bioremediation of uranium-contaminated subsurface sediments. *Environmental Microbiology* 4: 510–516

Haaijer SC, Van der Welle ME, Schmidt MC, Lamers LP, Jetten MS, Op den Camp HJ (2006) Evidence for the involvement of betaproteobacterial *Thiobacilli* in the nitrate dependent oxidation of iron sulfide minerals. *Federation of European Microbiological Societies* 58: 439–448

Kelly DP, Wood AP (2000) Genus *Thiobacillus* Beijerinck. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 2. Edited by N. R. Krieg, J. T. Staley & D. J. Brenner. Michigan: Bergey's Manual Trust

Kelly, D. P. & Harrison, A. H. (1989). Genus *Thiobacillus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 3, pp. 1842±1858. Edited by Staley JT, Bryant MP, Pfennig N & Holt JG. Baltimore: Williams & Wilkins.

Letain TE, Kane SR, Legler TC, Salazar EP, Agron PG, Beller HR (2007) Development of a Genetic System for the Chemolithoautotrophic Bacterium *Thiobacillus denitrificans*. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 3265–3271.

Ma YL, Yang BL, Zhao JL (2006) Removal of H<sub>2</sub>S by *Thiobacillus denitrificans* immobilized on different matrices. *Bioresource Technology* 97: 2041–2046

Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP (2009) *Brock Biology of Microorganisms* 12th ed, Ed. Pearson Education, Inc. 1301 Samsome Street, San Francisco, CA 9411, ISBM 0-321-53615-0

Manz W, Amann R, Ludwig W, Wagner M & Schleifer KH (1992) Phylogenetic oligonucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Systematic and Applied Microbiology* 15: 593–600.

Park JJ, Park SR, Ju DJ, An JK, Byun IG, Park TJ (2008) Application of spent sulfidic caustics for autotrophic denitrification in a MLE process and their microbial characteristics by fluorescence in situ hybridization. *Korean Journal of Chemical Engineering* 25: 542–547

Ravishankara AR, Daniel JS, Portmann RW (2009) Nitrous Oxide (N<sub>2</sub>O): The Dominant Ozone-Depleting Substance Emitted in the 21st Century. *Science* 326: 123–125

Senko JM, Istok JD, Suflita JM, Krumholz LR (2002) In-situ evidence for uranium immobilization and remobilization. *Environmental Science & Technology* 36: 1491–1496

Shoun H, Tanimoto T. (1991) Denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum* and involvement of cytochrome P-450 in the respiratory nitrite reduction. *The Journal of Biological Chemistry* 266: 11078–11082.

Straub KL, Benz M, Schink B, Widdel F (1996) Anaerobic, nitrate-dependent microbial oxidation of ferrous iron. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1458–1460.

Straub KL, Schönhuber WA, Buchholz-Cleven BEE & Schink B (2004) Diversity of ferrous iron-oxidizing, nitrate-reducing bacteria and their involvement in oxygen-independent iron cycling. *Geomicrobiology Journal* 21: 371–378.

Šimek M, Jiřová L, Hopkins DW (2002) What is the so-called optimum pH for denitrification in soil? *Soil Biology & Biochemistry* 34: 1227–1234.

internetové zdroje:

[http://www.irz.cz/repository/latky/oxid\\_dusny.pdf](http://www.irz.cz/repository/latky/oxid_dusny.pdf)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=18750>

[http://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescent\\_in\\_situ\\_hybridization](http://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescent_in_situ_hybridization)