

VYSOKÁ ŠKOLA BÁŇSKÁ-
TECHNICKÁ UNIVERZITA OSTRAVA

Hornicko-geologická fakulta

Institut environmentálního inženýrství

ARCHAEA

diplomová práce

Autor:

Bc. Karolína Bernatová

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Hana Vojtková, Ph.D.

Ostrava 2012

VŠB - Technická univerzita Ostrava
Hornicko-geologická fakulta
Institut environmentálního inženýrství

Zadání diplomové práce

Student: **Bc. Karolína Bernatová**
Studijní program: N2102 Nerostné suroviny
Studijní obor: 3904T029 Minerální biotechnologie
Téma: Archaea
Archaea

Zásady pro vypracování:

1. Úvod a cíl práce
2. Charakteristika archeí a jejich postavení v systému mikroorganismů
3. Základní klasifikace archeí
4. Způsoby kultivace archebakterií
5. Experimentální část práce
6. Využití archeí v dalších biotechnologiích
7. Závěr

Seznam doporučené odborné literatury:

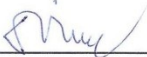
BLUM, Paul (ed.). *Archaea: New Models for Prokaryotic Biology*. Norfolk : Caister Academic Press, 2008. viii, 248 s. ISBN 978-1-904455-27-1
CAVICCHIOLI, Ricardo (ed.). *Archaea: Molecular and Cellular Biology*. Washington : American Society for Microbiology, 2007. 576 s. ISBN 978-1-55581-391-8
GARRETT, Roger A.; KLENK, Hans-Peter. *Archaea: Evolution, Physiology and Molecular Biology*. Wiley-Blackwell Publishing, 2007. 388 s. ISBN 978-1-4051-4404-9
HOWLAND, John L. *The Surprising Archaea: Discovering Another Domain of Life*. Oxford : Oxford University Press, 2000. 214 s. ISBN 0-19-511183-4

Formální náležitosti a rozsah diplomové práce stanoví pokyny pro vypracování zveřejněné na webových stránkách fakulty.

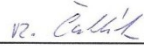
Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Hana Vojtková, Ph.D.**

Datum zadání: 31.10.2011

Datum odevzdání: 30.04.2012


prof. Ing. Vojtech Dirner, CSc.
vedoucí institutu





prof. Ing. Vladimír Slivka, CSc., dr.h.c.
děkan fakulty

Prohlášení

- Celou diplomovou práci včetně příloh, jsem vypracovala samostatně a uvedla jsem všechny použité podklady a literaturu.
- Byla jsem seznámena s tím, že na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č.121/2000 Sb. - autorský zákon, zejména § 35 – využití díla v rámci občanských a náboženských obřadů, v rámci školních představení a využití díla školního a § 60 – školní dílo.
- Beru na vědomí, že Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava (dále jen VŠB-TUO) má právo nevydělečně, ke své vnitřní potřebě, diplomovou práci užít (§ 35 odst. 3).
- Souhlasím s tím, že jeden výtisk diplomové práce bude uložen v Ústřední knihovně VŠB-TUO k prezenčnímu nahlédnutí a jeden výtisk bude uložen u vedoucího diplomové práce. Souhlasím s tím, že údaje o diplomové práci, obsažené v Záznamu o závěrečné práci, umístěném v příloze mé diplomové práce, budou zveřejněny v informačním systému VŠB-TUO.
- Souhlasím s tím, že diplomová práce je licencována pod Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported licencí. Pro zobrazení kopie této licence, je možno navštívit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>
- Bylo sjednáno, že s VŠB-TUO, v případě zájmu o komerční využití z její strany, uzavřu licenční smlouvu s oprávněním užít dílo v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona.
- Bylo sjednáno, že užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu komerčnímu využití mohu jen se souhlasem VŠB-TUO, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly VŠB-TUO na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše).

V Ostravě dne 22.4.2012

Bc. Karolína Bernatová



Anotace

Cílem diplomové práce je uceleně shrnout nové taxonomické, fyziologické a morfologické poznatky domény Archaea. V úvodní části je popsána charakteristika, společné vlastnosti všech tří domén organismů a dále fyziologické a morfologické vlastnosti archaeální buňky. Další část diplomové práce je věnována taxonomickému rozdělení jednotlivých kmenů domény Archaea a možnostem jejich praktického využití v biotechnologických procesech. Experimentální část práce obsahuje sledování kultivace vybraných bakteriálních rodů *Acidithiobacillus ferrooxidans* a *Acidithiobacillus thiooxidans* po dobu 28 dní a následné vyhodnocení jejich růstové křivky.

Klíčová slova: archaea, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans*, taxonomie, růstová křivka

Summary

This diploma thesis deals with new taxonomic, physiological and morphologic informations about Archaea domain.

In the introductory describes characteristic, common attributes of all three domains and physiology and morphology archea cell.

Another part of the diploma thesis id devoted to taxonomic fragmentation of individual archea domain species, and possibilities of their practical use in biotechnological processes.

Experimental work includes monitoring of the cultivation of selected bacterial genera *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* for 28 days and follow-up evaluation of its growth curve.

Keywords: archaea, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans*, taxonomy, growth curve

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce paní Mgr. Haně Vojtkové, Ph.D. za velmi cenné a odborné rady, trpělivé vedení a především za podporu a neocenitelnou pomoc.

Dále bych ráda poděkovala Ing. Radimu Jablonkovi za ochotu a rady nejen při práci v laboratořích.

OBSAH

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Úvod a cíl diplomové práce | 1 |
| 2 | Charakteristika Archaea..... | 2 |
| 2.1 | Objev domény Archaea..... | 3 |
| 2.2 | Společné vlastnosti tří domén | 4 |
| 2.3 | Základní struktura a morfologie buňky..... | 5 |
| 2.4 | Fyziologické dělení | 7 |
| 3 | Taxonomie mikroorganismů..... | 9 |
| 3.1 | Taxonomie domény Archaea | 11 |
| 3.2 | Kmen Crenarchaeota..... | 11 |
| 3.3 | Kmen <i>Euryarchaeota</i> | 14 |
| 3.4 | Kmen <i>Korarchaeota</i> | 19 |
| 3.5 | Kmen <i>Nanoarchaeota</i> | 19 |
| 3.6 | Kmen <i>Thaumarchaeota</i> | 20 |
| 4 | Využití archaea v biotechnologiích | 21 |
| 5 | Experimentální část..... | 24 |
| 5.1 | Laboratorní materiál a přístrojové vybavení | 24 |
| 5.2 | Kultivační média | 25 |
| 5.2.1 | Příprava média pro <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> | 26 |
| 5.2.2 | Příprava média pro <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> | 29 |
| 5.3 | Charakteristika bakteriálních kmenů..... | 30 |
| 5.3.1 | <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> | 30 |
| 5.3.2 | <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> | 31 |
| 5.4 | Stanovení růstové křivky..... | 32 |

| | | |
|-------|--|----|
| 5.5 | Výsledky experimentů | 34 |
| 5.5.1 | Růstová křivka <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> | 34 |
| 5.5.2 | Růstová křivka <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> | 37 |
| 5.6 | Diskuze výsledků | 40 |
| 6 | Závěr | 42 |
| 7 | Seznam použité literatury | 44 |
| 8 | Seznam obrázků | 51 |
| 9 | Seznam tabulek | 52 |
| 10 | Seznam grafů | 52 |

1 Úvod a cíl diplomové práce

V minulém století nebyla Archaea uznávaná ještě jako hlavní doména života. Po celá desetiletí byly mikroorganismy domény Archaea na základě jejich prokaryotické morfologie řazeny spolu s dalšími mikroorganismy pod doménu bakterie. V roce 1970 Dr. Carl Woese a jeho kolegové na univerzitě v Illinois zkoumali pomocí sekvence DNA vztahy mezi prokaryotními organismy a objevili zcela novou skupinu organismů. Molekulární fylogeneze ukázala, že se jedná o naprosto odlišné druhy a na základě tohoto objevu vznikla třetí doména života - Archaea (Allers, 2005; Akolkar, 2009).

Zpočátku byly zařazeny pod tuto novou doménu pouze metanogenní organismy, žijící v horkých pramenech a solných jezerech. Na konci 20. století bylo prokázáno, že se jedná o velice různorodou skupinu organismů, která je rozšířená na celém světě, jak v extrémních stanovištích, tak běžně v půdě nebo oceánech (Andrle, 2010; Akolkar, 2009).

Většina zástupců Archaea jsou velmi přizpůsobiví a bez problémů se vyrovnávají s extrémním chemickým a fyzickým prostředím. Na základě jejich vlastností mají zástupci domény Archaea velký potenciál v biotechnologiích.

Cílem diplomové práce bylo uspořádání současně platných a aktuálních poznatků o doposud méně známé doméně Archaea včetně jejich systematického popisu s výčtem základních morfologických a fyziologických vlastností zástupců. Vzhledem k řadě reidentifikačních přístupů právě v taxonomii archaeí i vzhledem k praktickým potřebám Institutu environmentálního inženýrství byla v experimentální části práce zpracována růstová křivka mikroorganismů *Acidithiobacillus thiooxidans* a *Acidithiobacillus ferrooxidans*, které jsou v současné době řazeny do bakteriální domény. Avšak uvedené mikroorganismy svými fyziologickými nároky (zejména pH prostředí 1 – 2) odpovídají extrémním nárokům taxonu Archaea, proto není v budoucnosti resystematizace takových mikroorganismů vyloučena.

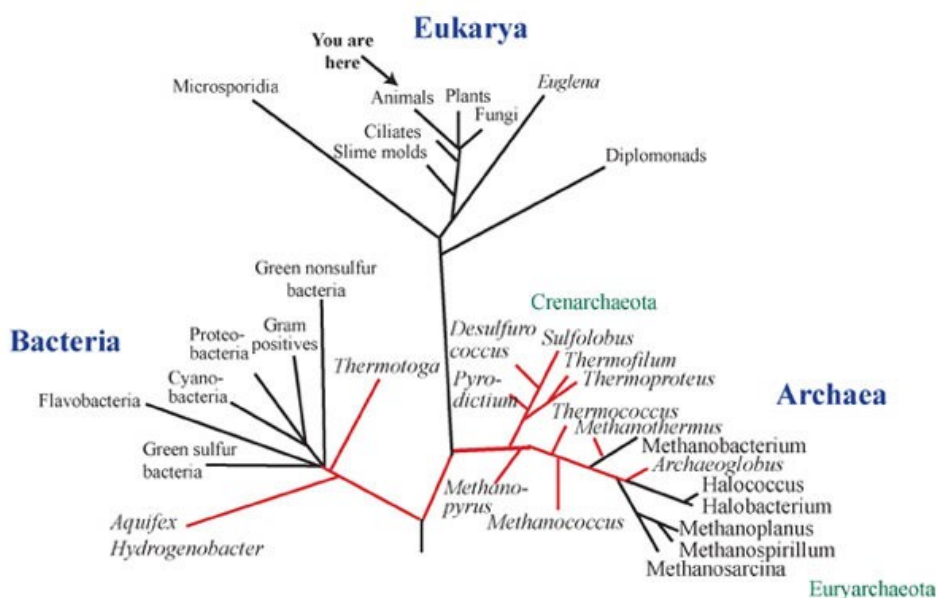
2 Charakteristika Archaea

Pojmenování Archaea pochází z řeckého slova „archaia“, což znamená „starobylý“. Jedná se o nejstarší linii života na zemi, jejíž stáří se odhaduje na 3,5 miliardy let. Několik desítek let výzkumu poukazuje na to, že hlavní rozmanitost života je mikrobiální a na základě rozdílné struktury DNA a 16S rRNA organismů došlo díky Dr. Carlu Woese a kolektivu v roce 1977 k rozdělení všeho živého na tři domény – Archaea, Eubakterie a Eukaryota (obrázek č. 1) (Pace, 1997).

Archaea vykazují směs bakteriálních, eukaryotických a jedinečných funkcí na molekulární úrovni (Forterre, 1997).

Doména Archaea zahrnuje a její zástupci potřebují ke svému růstu extrémní teploty, pH, slané prostředí nebo chybějící kyslík (Dassarma, 2006).

I přes tyto extrémní nároky Archaea, které se vzácně vyskytují, tak naopak tvoří hlavní a nepostradatelnou složku biomasy (Forterre, 1997).



Obrázek 1: Rozdělení domén (Ocean explorer, 2011)

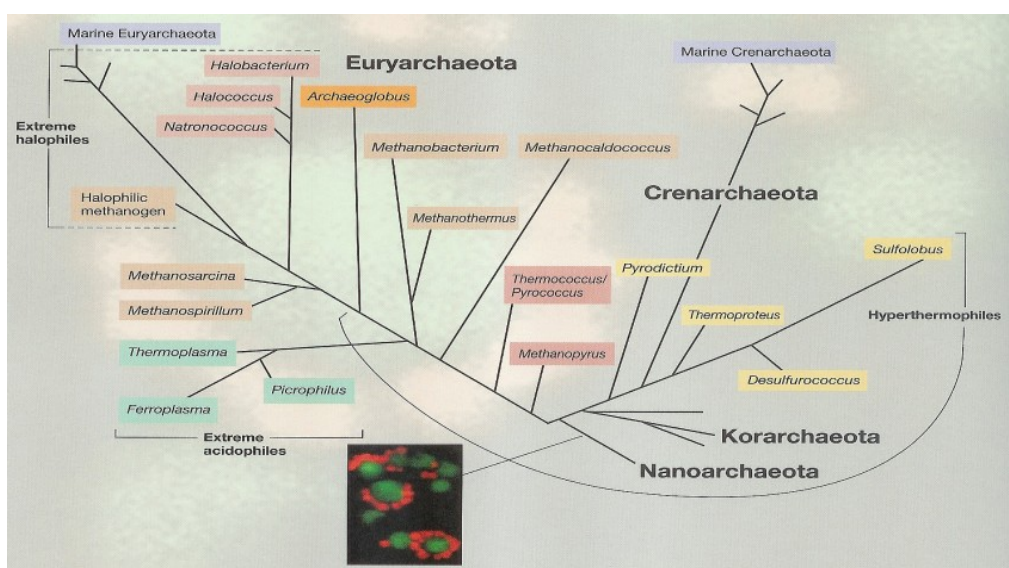
2.1 Objev domény Archaea

Myšlenka použití sekvence aminokyselin jako nástroj pro molekulární fylogenezi byla poprvé představena v roce 1958 Franciscem Crickem (Allers, 2005). V roce 1970 Dr. Carl Woese s kolegy objevil, že ve všech živých organismech jsou přítomny tři ribozomální formy a tím zahájil revoluci v evoluční biologii. Ukázalo se, že ribozomální RNA a ribozomální proteiny archaea jsou však odlišné od eukaryot a bakterií (Forterre, 2002).

Na základě poznatků o 16S a 18S rRNA byly v roce 1990 Archaeobakterie přejmenovány Dr. Woese na samostatnou doménu zvanou Archaea jejíž fylogenetické rozdělení ukazuje obrázek č. 2 (Makarova, 2003; Akolkar, 2009).

Analýza variace genů 16S rRNA je jedinečný přístup k posouzení rRNA, která je používaná právě pro odhad evoluční historie a pro taxonomické řazení organismů. Geny rRNA jsou základní součástí ribozomu, který se sestává z 50 proteinů a tří tříd molekul rRNA. Celkem bylo použito k výzkumu 883 prokaryotických genomů (Pei, 2010).

Hypotézy o topologii stromu života jsou v současné době předmětem diskuzí. Existují dvě hypotézy s různými domnělými důkazy o monofyletismu nebo polyfyletismu skupiny Archaea. První monofyletická hypotéza odpovídá tradičnímu pojetí modelu tří domén a druhá polyfyletická hypotéza je založená na modelu Eocyte, což by znamenalo, že doména Archaea je složená pouze z organismů z různých vývojových linií (Fournier, 2010).



Obrázek 2: Fylogenetické rozdělení archaea (Wang, 2007)

2.2 Společné vlastnosti tří domén

Doména Archaea má výrazné biochemické odchylky od ostatních domén, ale přesto mají některé vlastnosti společné. Zatímco bakteriální ribozomy jsou citlivé na určité chemické látky, tak archaeí ribozomy na tyto činitele citlivé nejsou, což poukazuje na bližší vztah mezi archaea a eukaryota (Archaea, 2001). Na molekulární úrovni lze rozlišit Archaea od ostatních domén, kdy kromě rRNA je odlišuje povaha jejich membrány. Bakteriální a eukaryotické membrány jsou složeny z glycerolipidů, které jsou estery glycerolu a mastných kyselin, kdežto u archaea se jedná o estery glycerolu a isoprenolu. Informační proteiny, které jsou zapojené do replikace DNA, jsou u Archaeí více podobné s eukaryotickými proteiny, než s bakteriálními. Na rozdíl od operačních proteinů, které jsou spíše podobné těm bakteriálním (jedná se o enzymy primárního a sekundárního metabolismu, membránové receptory a další) (Forterre, 2002).

Podobné jsou také histony podílející se na komplexu chromatinu, které jsou charakteristické pro výstavbu eukaryotního jádra. Laboratoř Johna Reevese zjistila, že archaeální buňky obsahují homolog eukaryotického histonu, tyto histony jsou rozšířené zejména v kmeni *Euryarchaeota* (Allers, 2005).

Z chronologie v rámci evoluce je zřejmé, že všechna eukaryota pochází z prokaryot. Jedná se o endosymbiotickou teorii, podle které se dříve nezávislé prokaryotické organismy staly endosymbioty, z toho také vyplývá určitá podobnost mezi doménou Archaea a Eukaryota (Fournier, 2010). Přehled základních rozdílů mezi doménou Archaeí, Bakterií a Eukaryot uvádí tabulka 1.

V evolučním smyslu nelze tedy přesně rozhodnout, které domény jsou příbuzné, ale po konečném srovnání lze konstatovat spíše podobnost mezi doménou Archaea a Bakterií, i když u Archaeí ještě mnoho znaků není dosud spolehlivě prozkoumáno (Fournier, 2010).

Tabulka 1: Základní rozdíly mezi Archaea, Bakterie a Ekaryota (Priest, 1993; Purves, 1997)

| <u>CHARAKTERISTIKA</u> | <u>ARCHAEA</u> | <u>EYKARYOTA</u> | <u>BAKTERIE</u> |
|------------------------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|
| Jádro obalené membránou | NE | ANO | NE |
| Prokaryotní stavba buňky | ANO | NE | ANO |
| Eukaryotní stavba buňky | NE | ANO | NE |
| Jeden kruhový chromozom | ANO | NE | ANO |
| Ribosomy | 70S | 80S | 70S |
| Iniciátor tRNA | methionin | methyonin | formylmethionin |
| Introny v tRNA | ANO | ANO | NE |
| RNA polymerázy | několik | několik | jeden |
| Citlivost na Chloramfenikol | NE | NE | ANO |
| Kanamycin | NE | NE | ANO |
| Streptomycin | NE | NE | ANO |
| Rifampicin | NE | NE | ANO |
| Binární dělení buněk | ANO | ANO | ANO |
| Pohlavní rozmnožování | NE | ANO | NE |
| Metanogeneze | ANO | NE | NE |
| Nitrifikace | ANO | NE | ANO |
| Denitrifikace | ANO | NE | ANO |
| Fixace molekulárního dusíku | ANO | NE | ANO |
| Chromozóm | komplex s histony | komplex s histony | nukleoid |
| Cytoskelet | NE | ANO | NE |

2.3 Základní struktura a morfologie buňky

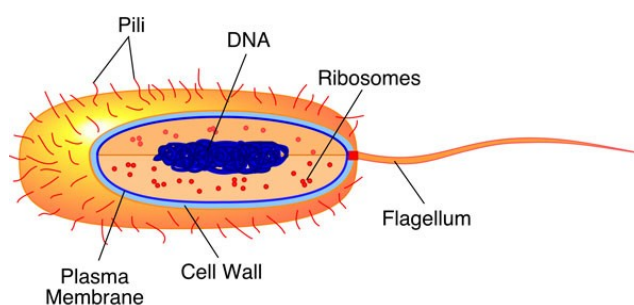
Archaea jsou prokaryotní mikroorganismy (Forterre, 2002). Jejichž velikost se pohybuje v průměru od 0,1 do 15 μm a délka může být až 200 μm . Pozorovatelné jsou pouze elektronovým mikroskopem (Makarova, 2003). Strukturální rozmanitost je velmi

různorodá, od kulaté formy, přes tyčinky až k trojúhelníkovým nebo čtvercovým tvarům, 5 – 10 bičíků (obrázek č. 3).



Obrázek 3: Bičíky *Halobacterium solinarum* (Wikispaces, 2012)

Tak jako jiné živé organismy, má i Archaea vnější membránu, která buňku chrání před okolím. Tato membrána obklopuje cytoplazmu, ve které se nachází DNA. Stejně, jako bakterie, nemají Archaea jadernou membránu a jejich DNA existuje jako kruhová molekula. Buněčná stěna, polotuhá vrstva, pomáhá udržovat buňce tvar a chemickou rovnováhu (Archaea, 2001). Stavbu archaeální buňky uvádí obrázek č. 4.



Obrázek 4: Buňka archaei (Oesterhelt, 2011)

Buněčná stěna, která se nachází u většiny Archaeí má rozmanité chemické složení, většina Archaeí má bílkovinnou stěnu, jen dva zástupci mají polysacharidovou buněčnou stěnu. V buněčné stěně nikdy není přítomen peptidoglykan i aminokyseliny u halofilních Archaea umožňují jejich růst až do 15% koncentrace NaCl. Přítomnost buněčné stěny však není

charakteristická pro všechny zástupce této domény.

Nejcharakterističtějším rysem je struktura jejich membránových lipidů, které jsou pro Archaea unikátní. Jedná se o esterové vazby, které zvyšují jejich chemickou stabilitu (Akolkar, 2009)

Rozmnožování buněk obvykle probíhá binárním dělením, fragmentací nebo jinými mechanismy.

2.4 Fyziologické dělení

Archaea je charakteristická speciální chemickou, metabolickou a strukturní adaptací v extrémních prostředích, jedná se o extrémofilní mikroorganismy. Na základě fyziologických vlastností se dělí na metanogenní archaea, extrémně halofilní Archaea, Archaea bez buněčné stěny a na extrémně termofilní Archaea redukující síru (Sedlářová, Medková, 2007).

Metanogenní Archaea jsou striktně anaerobní. Produktem jejich metabolismu je metan.

Archaea redukující síru jsou mikroorganismy autotrofní a anaerobní a jejich růst může být heterotrofický. Z thiosulfátů a sulfátů tvoří sulfan. Mohou redukovat také síru na sulfan, ale bez přeměny na energii (Williams, 1989).

Extrémně halofilní Archaea potřebují ke svému životu vysokou koncentraci soli (obrázek č. 6). Jsou aerobní, chemoorganotrofní, alkalifilní a mezofilní až termofilní. Ve vnější membráně obsahují pigmentový protein bakteriorhodopsin, který při syntéze ATP přeměňuje světelnou energii na chemickou (Williams, 1989).

Archaea bez buněčné stěny nejsou životně vázány na kyslík, jsou pleomorfní, termofilní a žijí v kyselém prostředí. energii získávají chemoorganotrofně, tedy z chemických organických látek (Williams, 1989).

Dalším typem Archaea jsou extrémně termofilní organismy, které vyžadují ke svému životu vysokou teplotu (obrázek č. 5). Nejsou schopna si vytvářet z anorganických látek organické látky, jsou heterotrofní. Jsou acidofilní i neutrofilní, žijí jak v kyselém, tak v neutrálním pH (Williams, 1989).

Obecné vlastnosti zástupců všech tří oblastí naznačují, že metabolismus nejčastěji založen

na heterotrofní výživě. U Archaeí je autotrofní typ výživy druhotný a vzniká pravděpodobně u evolučně mladších forem (Pace, 1997).



Obrázek 5: Horké vřídlo Yellowstone National Park (www.cs.wikipedia.org)



Obrázek 6: Mrtvé moře (www.dead-sea-cosmetics-shop.com)

3 Taxonomie mikroorganismů

Taxonomie je otevřený dynamický systém, který je složený z taxonů. Na základě jejich vlastností a fylogenetické příbuznosti je cílem taxonomie tyto mikroorganismy charakterizovat a díky dostupným údajům identifikovat, popisovat základní druhy a následně jednotky zařadit a katalogizovat. Taxonomický systém není uzavřený, je stále se rozvíjející subjekt, složený ze tří, navzájem propojeným celků - klasifikace, nomenklatury a identifikace (Sedláček, 2007).

Klasifikací se rozumí zařazení mikroorganismů do skupin na základě analýzy výsledků. Pro zařazení mikroorganismů do taxonů je nutná znalost jejich morfologických, biochemických, fyziologických, chemických, molekulárně-biologických a genetických vlastností.

Pro hodnocení mikroorganismů existuje v současné době řada metod. Mezi hlavní metody patří klasifikace numerická, praktická, fylogenetická a genetická klasifikace.

Na přelomu minulého století bylo postupně navrženo mnoho metodik pro klasifikaci mikroorganismů. Klasifikace numerická spočívala na analýze vlastností, na základě začlenění údajů z různých zdrojů se podařilo numerické taxonomii rozlišit mikroorganismy na jednotlivé kmeny. Postup této klasifikace je shrnut následujícím způsobem: v první řadě se získávají údaje, které budou klasifikovány, kdy se na základě takto získaných údajů zjišťují požadované vlastnosti, tedy taxonomické charakteristiky. Poté se podle charakteristik zjišťuje podobnost mezi kmeny s následným vytvořením taxonomických struktur. Vznikající fenotypové skupiny jsou pak totožné s taxony.

První pokusy o zařazení mikroorganismů do skupin patří mezi praktickou klasifikaci. Problémem této klasifikace je, že je založená především na pouhé pozorování biochemických, fyziologických a morfologických znaků a dostatečně nezahrnuje jiné vlastnosti, které vytvářejí odlišnost mezi mikroorganismy.

Genetická příbuznost, fenotypové vlastnosti a chemotaxonomické údaje jsou součástí fylogenetické klasifikace, kdy je využití genetických charakteristik propojeno s poznáním struktury molekul DNA, RNA a analýzy genetického materiálu. Celý proces ovlivňují změny, jako jsou výměny chromozomálních genů - transdukce (výměna genetického materiálu díky virové částici), transformace (horizontální přenos genetické informace, kdy nedochází k přímému kontaktu) a konjugace (spojení dvou buněk za účelem výměny genetické informace). Genotypové informace zrcadlí příbuzenské vztahy kódované v DNA, v současné době je považována za nejpřesnější metodu klasifikace.

Jednou ze základních metod genotypizace je katalogizace 16S rRNA, která je založená na zachycení odlišností na základě analýzy krátkých sekvencí bází (Sedláček, 2007).

K označení jednotek, které byly definovány pomocí klasifikace, slouží nomenklatura. Jejím účelem je vytvoření názvosloví organismů. Nomenklatura je založena na binomickém principu a řídí se mezinárodním nomenklatorickým kódem, který je však pro rostliny, živočichy a mikroorganismy různý. Pojmenování může být vědecké (pochází z řečtiny nebo latiny a prochází kontrolou nomenklatorického kódu), informační (není kontrolována nomenklatorickým kódem) nebo jako neplatné jméno.

Mikrobiální jméno je značně libovolné, ale musí být dodržována pravidla daná v publikaci International Code of Nomenclature of Bacteria (Sedláček, 2007).

Jejím základem je dostupná identifikace, která znamená srovnání neznámého mikroorganismu se známým podle dostupných technik, na základě výsledků této klasifikace a nomenklatury je pak mikroorganismus následně zařazen do taxonu. Nelze jednotně stanovit identifikační schéma, zvláště pokud nebyla daná skupina klasifikována. Určené techniky pro identifikaci by měly být snadné a měly by obsahovat pár základních charakteristik, pro rozlišení, na rozdíl od klasifikace, která jich potřebuje mnohem větší množství.

3.1 Taxonomie domény Archaea

Všechny mikroorganismy, které neodpovídaly doposud známým druhům, byly vždy označeny jako prokaryota. Odborné studie dokázaly, že na základě fylogeneze 16S rRNA existuje další skupina mikroorganismů - Archaea a že se jedná o naprosto jinou formu života a tedy o novou, třetí doménu (Gupta, 2002). Obecně zahrnují Archaea extremofilní organismy, které žijí v extrémně termofilním, halofilním, acidofilním a alkalofilním prostředí. Taxonomicky se doména dělí na kmen *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Korarchaeota* a *Nanoarchaeota* (Sedláček, 2007).

3.2 Kmen Crenarchaeota

Kmen *Crenarchaeota* se skládá pouze z jediné třídy *Thermoprotei* a člení se do čtyř řádů, které jsou *Desulfurococcales*, *Thermoproteales*, *Sulfolobales* a *Caldisphaerales*. Jedná se o velice pestré skupině mikroorganismů jak po stránce vnější morfologie (obsahující tvary buněk jako jsou koky, bacily i formy vláknité), tak po stránce fyziologických vlastností (kmen je anaerobní, aerobní, termofilní, acidofilní a barví se gramnegativně) (Sedláček, 2007). Vyskytují se v sirných horkých pramenech na celém světě, obývají geotermální zdroje a jiná stanoviště, která jsou příliš horká, kyselá, bohatá na síru a chudá na kyslík. Tuto odolnost jim zaručuje buněčná stěna složená z glykoproteinu (Margulis, 2009). *Crenarchaeota* získávají energii a fixují oxid uhličitý pomocí anorganických chemických látek. *Crenarchaeota* také zahrnují nově objevené druhy v půdě a oceánech, žijící při průměrné teplotě a je pravděpodobně nejvíce rozšířeným type Archaei na planetě Zemi (Friend, 2007).

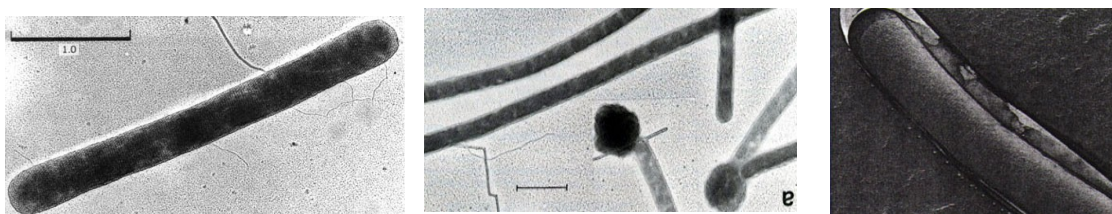
Třída *Thermoprotei* se vyznačuje rozmanitými tvary a velikostí buněk. *Thermoprotei* jsou anaerobní nebo aerobní mikroorganismy vyskytující se na celém světě v bahenních sopkách, termálních kyselých pramenech, ale také v termálním prostředí pod hladinou moře. Síru oxidují nebo naopak redukují. Třída *Thermoprotei* obsahuje řád *Thermoproteales*, *Desulfurococcales* a *Sulfolobales* (Sedláček, 2007).

Mikroorganismy řádu *Thermoproteales* jsou anaerobní nebo fakultativně anaerobní, žijící v hypertermofilním prostředí, při optimální teplotě 75 až 100 °C a v mírně acidofilním prostředí při pH 4,5 – 7. Představitelé tohoto řádu se hojně vyskytují v horkých sirných

vodních parách, vzniklých postvulkanickou činností a v podmořských hydrotermálních místech. Řád se dělí na dvě čeledi *Thermoproteacea*, *Thermofilaceae* a (Sedláček, 2007).

Zástupci čeledi *Thermoproteacea* získávají energii redukcí elementární síry, kdy jako zdroj uhlíku využívají oxid uhličitý. Zástupci této čeledi potřebují ke svému životu teplotní relaci v rozmezí 85 až 104 °C, při pH od 1,7 až do 6,5 a buňky se množí pučením, větvením nebo zaškrcením. Mezi významné rody patří *Thermocladium*, *Caldivirga*, *Thermoproteus*, *Pyrobaculum* (Makarova, 2003). Zástupce uvádí obrázek č. 7.

Čeď *Thermofilaceae* žije v teplotním rozmezí od 85 do 90 °C a při pH 2,8 – 6,7. Buňky jsou štíhlé tyčinky proměnlivé délky, anaerobní, gramnegativní a termoacidofilní. Pro sirmou respiraci využívají peptidy, patří zde jediný rod *Thermophilum* (Sedláček, 2007).



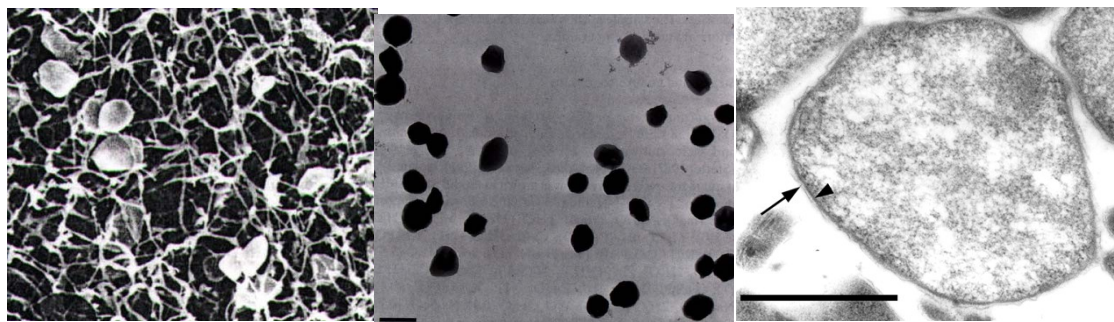
Obrázek 7: zleva *Thermoproteus tenax*, *Pyrobaculum aerophilum*, *Thermophilum pendens* (převzato z <http://neuf.fr>)

Organismy řádu *Desulfurococcales* rostou organotrofně nebo chemolitoautotrofně a jsou hypertermofilní, gramnegativní, anaerobní až aerobní. Jsou nalézány v místech po ukončené vulkanické činnosti, v horkých sedimentech, v mořském prostředí nebo v horkých alkalických pramenech. Řád se skládá z čeledí *Pyrodictiaceae* a *Desulfurococcaceae* (Sedláček, 2007).

Zástupci čeledi *Desulfurococcaceae* jsou kokovité buňky nepravidelného tvaru, rozmanitého průměru, vyskytující se jednotlivě nebo ve shlucích a pohybující se v některých případech pomocí bičíku. Jsou hypertermofilní a chemolitoautotrofní s optimální teplotou růstu od 85 do 102 °C. K redukcí síry dochází za využití proteinů, sacharidů i peptidů. K doposud objeveným rodům patří *Thermosphaera*, *Sulfophobococcus*, *Staphylothermus*, *Aeropyrum*, *Desulfurococcus*, *Ignicoccus*, *Stetteria* a

Thermoplasma (Sedláček, 2007).

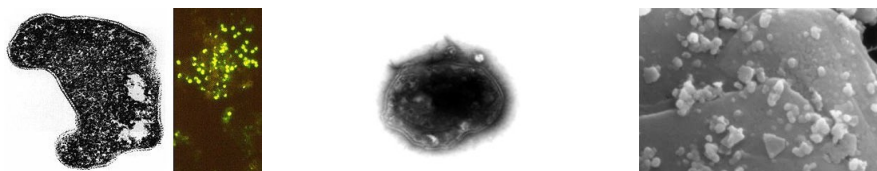
Čeď Pyrodictiaceae zahrnuje organismy kokovitého až diskovitého tvaru buněk, které svou energii získávají fermentací nebo redukcí síry. Jejich teplota růstu je v rozmezí 72 do 114 °C, pH 4 – 7. Zástupci rodu *Pyrolobus* a *Hyperthermus* potřebují ke svému životu vyšší koncentraci NaCl (Sedláček, 2007). Zástupce uvádí obrázek č. 8.



Obrázek 8: zleva *Pyrodictium abasii*, *Pyrolobus fumarii*, *Aeropyrum camini* (převzato z <http://neuf.fr, ijs.sgmjournals.org>)

Buňky řádu *Sulfolobales* tohoto řádu potřebují pro svůj růst mimořádně kyselé prostředí, jsou neobvykle termoacidofilní. Teplota růstu je od 60 do 90 °C při pH 2, organismy jsou aerobní až anaerobní. Vyskytují se v kyselých solfatárových polích a bahenních sopkách, v horkých haldách vzniklých po hornické činnosti, v kyselých vodách, v geotermálních pramenech a v sopečném kráteru (Makarova, 2003).

Zástupci čeďi *Sulfolobaceae* oxidují železnatou a sirnou rudu a produkují kyselinu sírovou. Redukují se pučením a příčným dělením, jsou kosmopolitní a mezi doposud popsané rody patří *Sulfurococcus*, *Stygiolobus*, *Acidianus*, *Sulfolobus*, *Metallosphaera* a *Sulfurisphaera* (Sedláček, 2007). Zástupce uvádí obrázek č. 9.



Obrázek 9: zleva *Sulfolobus acidocaldarius*, *Acidianus*, *Metallosphaera sedula*

(převzato z <http://neuf.fr>, serc.carleton.edu, <http://genome.jgi-psf.org>)

3.3 Kmen *Euryarchaeota*

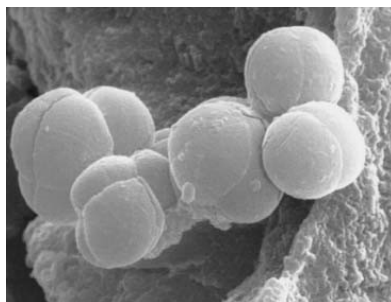
Kmen *Euryarchaeota* se skládá z pěti fyziologických skupin jako jsou extrémně halofilní Archaea, metanogenní Archaea, archaea redukující sírany, Archaea postrádající buněčnou stěnu a termofilní Archaea metabolizující elementární síru (Sedláček, 2007). Buňky se barví gramnegativně nebo grampozitivně, vzhledem k nepřítomnosti či přítomnosti pseudopeptidoglykanu v buněčné stěně. V některých případech se buněčná stěna skládá pouze z proteinů nebo, chybí zcela. Zástupci kmene *Euryarchaeota* se řadí do celkem osmi tříd: *Methanobacteria*, *Methanococci*, *Methanomicrobia*, *Methanopyri*, *Halobacteria*, *Thermoplasmata*, *Thermococci* a *Archaeoglobi* (Sedláček, 2007).

Třída *Methanobacteria* spojuje taxony, jejichž hlavní složkou buněčného obalu je pseudomurein a lipidy (Sedláček, 2007). Žijí v anaerobním prostředí, jako jsou bažiny, močály, v bachoru skotu, ve střevech termitů i v dalších místech. Jako akceptor elektronu využívají vodík, jejich vedlejším produktem je metan. Třída obsahuje řád *Methanobacteriales* (Friend, 2007).

Buňky řádu *Methanobacteriales* jsou nepohyblivé tyčinky a koky, barvící se grampozitivně. Jsou striktně anaerobní, mezofilní a nevyužívají sacharidy, ani jiný organický materiál (bílkoviny), pouze sekundární alkoholy nebo metanol. Řád zahrnuje dvě čeledě *Methanobacteriaceae* a *Methanothermaceae* (Sedláček, 2007).

Zástupci čeledi *Methanobacteriaceae* rostou při teplotách 30 až 45 °C, při teplotách vyšších než 70 °C již nedochází k růstu. Některé organismy čeledi vyžadují vitamíny skupiny B a mají chemoorganotrofní růst, redukují metanol na metan nebo redukují elementární síru na siřník (Sedláček, 2007). K rodům zastupujícím čeleď *Methanobacteriaceae* patří *Methanobrevibacter*, *Methanobacterium*, *Methanosphaera* (obrázek č. 10) a *Methanothermobacter*.

Do čeledi *Methanothermaceae* se řadí zástupci, kteří mají dva svazky bičíků, jsou striktně anaerobní, energii získávají chemoliatotrofně a vyznačují se optimální teplotou růstu 55 až 97 °C. Jejich buněčná stěna se skládá z proteinu. Vyskytují se v anaerobním prostředí po vulkanické činnosti (Sedláček, 2007). *Methanothermococcus* a *Methanococcus* jsou jediné dva rody zastupující tuto čeleď (Makarova, 2003).



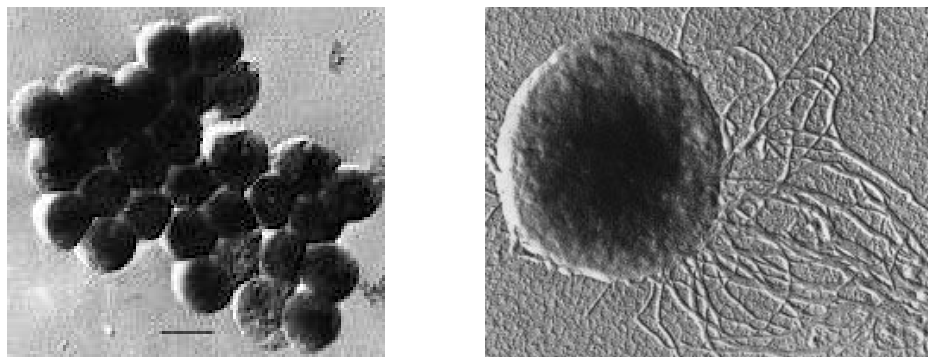
Obrázek 10: *Methanosphaera stadtmanae* (převzato z <http://microbewiki.kenyon.edu>)

Mikroorganismy třídy *Methanococci* jsou striktně anaerobní a energii získávají redukcí metanu. Jejich buněčná stěna postrádá peptidoglyken a pseudomurein, skládá se pouze z proteinů. Řád *Methanococcales* je jediným řádem této třídy.

Organismy řádu *Methanococcales* pochází z mořského prostředí, produkují metan a jsou anaerobní. Řád je složen ze dvou čeledí *Methanococcaceae* a *Methanocaldococcaceae* (Makarova, 2003).

Čeď *Methanococcaceae* zahrnuje organismy pohyblivé s bičíky, obligátně anaerobní. Jedná se o archaea mezofilní až termofilní s potřebou selenu pro svůj růst (Sedláček, 2007). Čeď zahrnuje dva rody *Methanothermococcus* a *Methanococcus*.

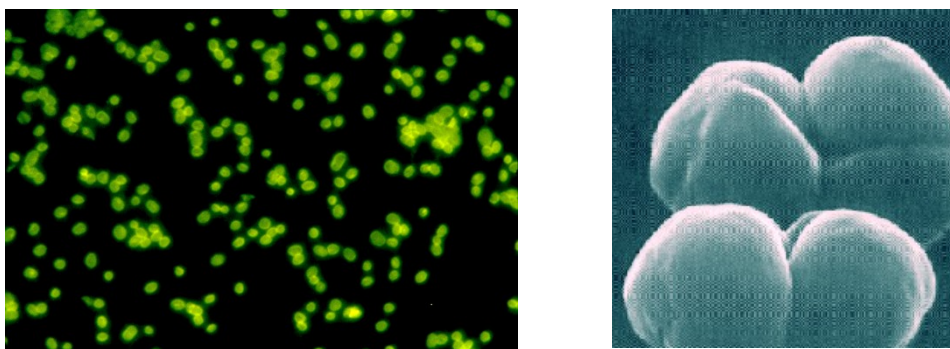
Zástupci čeledi *Methanocaldococcaceae* vyžadují pro svůj růst hypertermofilní prostředí, jsou to autotrofními organismy. Pohybují se díky několika svazkům polárních bičíků. Zástupci čeledi byli izolováni z hydrotermálních průduchů na dně moří (Sedláček, 2007). Mezi známé rody patří *Methanotorris* a *Methanocaldococcus*. Zástupce uvádí obrázek č. 11.



Obrázek 11: zleva *Methanococcaceae*, *Methanocaldococcus jannaschii* (převzato z www.lookfordiagnosis.com, <http://bacmap.wishartlab.com>)

Třída *Methanomicrobia* se skládá ze dvou řádů metanogenních Archaeí - *Methanosarcinales* a *Methanomicrobiales*.

Řád *Methanomicrobiales* se skládá z čeledi *Methanomicrobiaceae*, *Methanocorpusculaceae* a *Methanospirillaceae*. Zástupci tohoto řádu pochází převážně z mořského prostředí, ze sladkovodních sedimentů a bioreaktorů. Růst je autotrofní, mezofilní až termofilní a anaerobní. Buňky se nepohybují s pomocí bičků. Některé druhy potřebují ke svému růstu selen, vyšší koncentraci NaCl nebo minerální médium (Sedláček, 2007). Zástupce uvádí obrázek č. 12.



Obrázek 12: zleva *Methanogenium variaci*, *Methanosarcina barkeri fusaro* (převzato z <http://kaylabscientist5.blogspot.com>, <http://en.wikipedia.org>)

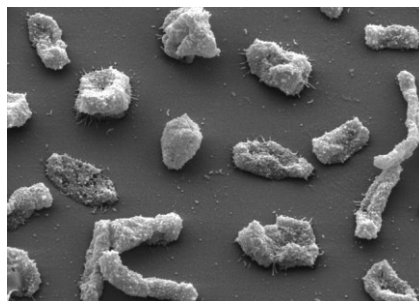
Čeleď *Methanosarcinaceae* a *Methanosaetaceae* jsou součástí řádu *Methanosarcinales*.

Buňky jsou uspořádány ve shlucích nebo jednotlivě ve tvaru tyčinek či koků. Buněčná stěna těchto Archaeí se skládá převážně z proteinů, charakteristická je tvorba metanu, metanolu, metylaminu a jiných látek. Zástupci rodu *Methanosalsum* potřebují uhlíčan sodný. Kolonie rodu *Methanococcoides* jsou pod UV světlem fluorescentní. Organismy řádu *Methanosarcinales* obývají rozmanité bezkyslíkaté oblasti (Sedláček, 2007).

Buňky třídy *Methanopyri* mají tvar tyčinkovitý a vyskytují se v řetízcích nebo jednotlivě, nejsou sporulující. Chemoautotrofní růst a anaerobní dýchání je pro tyto mikroorganismy charakteristické. Nacházejí se v hydrotermálních sedimentech. Tato třída se skládá pouze z jednoho řádu *Methanopyrales*, jediné čeledi *Methanopyraceae* a jednoho rodu *Methanopyrus* (Makarova, 2003).

Zástupci třídy *Halobacteria* žijí v prostředí s vysokou koncentrací solí. Buňky mají rozmanité tvary - koky, tyčinky a disky různých délek, mohou být pohyblivé nebo nepohyblivé. Kolonie téměř všech kmenů vytváří díky přítomnosti bakterioruberinu různé odstíny červené nebo růžové barvy. Halofilní Archaea využívají pro udržení osmotické rovnováhy se slaným okolím koncentrace cukrů, aminokyselin, kyselin a dalších sloučenin v buňkách. Vložení těchto Archaeí do normální vody dojde k jejich zničení porušením osmotické rovnováhy. Třída *Halobacteria* má doposud popsán pouze jediný řád *Halobacteriales* (Friend, 2007).

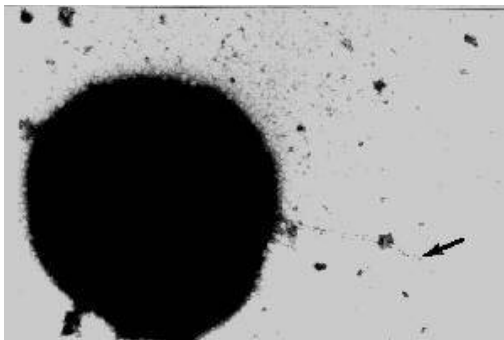
Do řádu *Halobacteriales* patří čeleď *Halobacteriaceae*, která obsahuje 20 rodů halofilních gramnegativních archaeí (obrázek č. 13).



Obrázek 13: *Halorhabdus utahensis* (převzato z <http://standardsingenomics.org>)

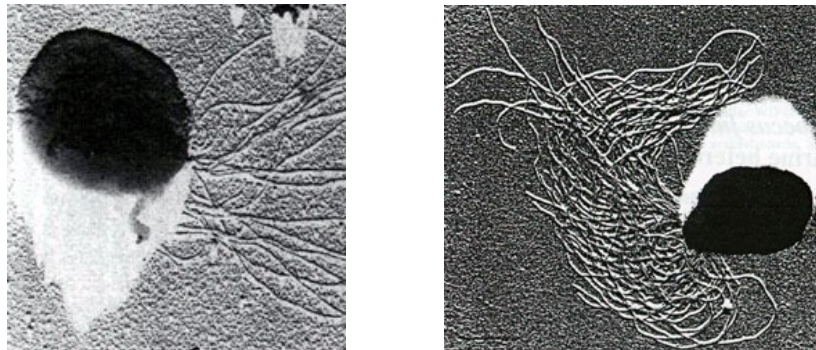
Zástupci třídy *Thermoplasmata* jsou extrémně acidofilní a termofilní. Byly objeveny archeální buňky rostoucí při teplotě vyšší, než 300 ° C. Třída zahrnuje řád *Thermoplasmatales* (Ellis, 2008).

Řád *Thermoplasmatales* má čeleď *Thermoplasmataceae*, která obsahuje rod *Thermoplasma* (obrázek č. 14) a čeleď *Picrophilaceae* s rodem *Picrophilus*. Organismy jsou fakultativně aerobní, obligátně heterotrofní, až hyperacidofilní. Reprodukují se zaškrčením s následným dělením a nacházejí se v místech, kde hrozí samozapálení, jako jsou haldy po těžbě, zřídla a obydlují geotermální solfatárová pole (Sedláček, 2007). Zástupci této třídy odolávají vysokým teplotám bez buněčné stěny (Makarova, 2003).



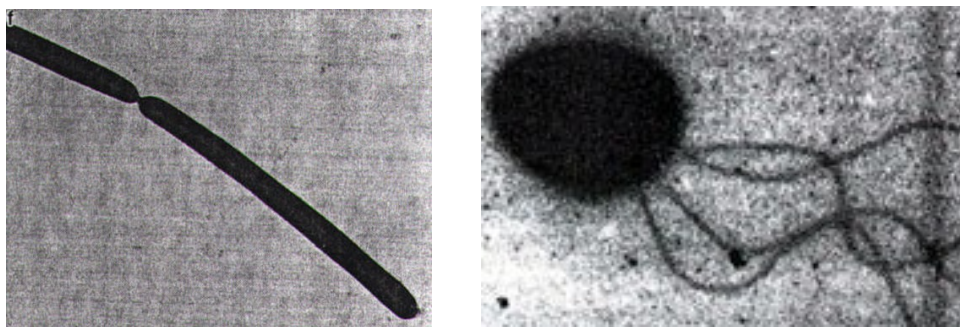
Obrázek 14: *Thermoplasma volcanium* (převzato z <http://wishart.biology.ualberta.ca>)

Zástupci třídy *Thermococci* jsou heterotrofní, hypertermofilní a pro svůj růst potřebují přítomnost síry. Jsou rozšířeni v pevninských termálních pramenech a v mořských hydrotermálních průduších. Jediným zastupujícím řádem je *Thermococcales* s čeledí *Thermococcaceae* a rody *Thermococcus* a *Pyrococcus* (obrázek č. 15). Organismy využívají jako zdroje uhlíku různé organické látky (sacharidy a peptidy), přítomnost síry urychluje jejich růst. Výsledným produktem metabolických procesů těchto organismů jsou zápachající sloučeniny, jako jsou merkaptany (Sedláček, 2007).



Obrázek 15: *Thermococcus chitinophagus*, *Pyrococcus furiosus* (převzato z <http://neuf.fr>)

Třída *Archaeoglobi* je poslední z kmene *Euryarchaeota*, kterou zastupuje řád *Archaeoglobales* a čeleď *Archaeoglobaceae* s rody *Ferroglobus* a *Archaeoglobus* (obrázek č. 16). Buňky rostou v teplotním rozmezí od 60 do 95 °C, při pH 7,0 a při 2% NaCl. Nachází se v podmořských kráterech a pod povrchem permafrostu (Sedláček, 2007).



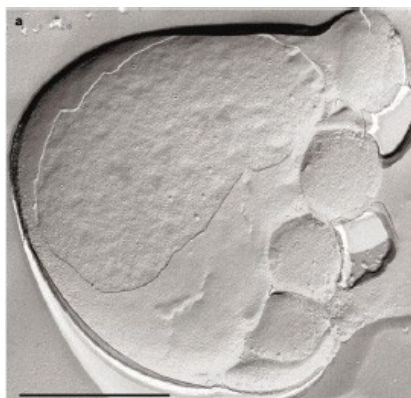
Obrázek 16: zleva *Archaeoglobus fulgidus*, *Methanopyrus kandleri* (převzato z <http://neuf.fr>)

3.4 Kmen *Korarchaeota*

Zástupce *Korarchaeoty* poprvé objevili vědci v roce 1996 v Yellowstonském Národním Parku. O tomto druhu neexistoval doposud žádný záznam, existence *Korarchaeoty* byla založena pouze na podobnosti genetického kódu s Archaea. Zjistilo se, že *Korarchaeota* přednostně obývá horké prameny, kde je teplota okolo 83° C s neutrálním pH a že se hromadí ve vodách bohatých na železo. *Korarchaeota* je pravděpodobně jedním z nejstarších dokladů života na Zemi (Friend, 2007).

3.5 Kmen *Nanoarchaeota*

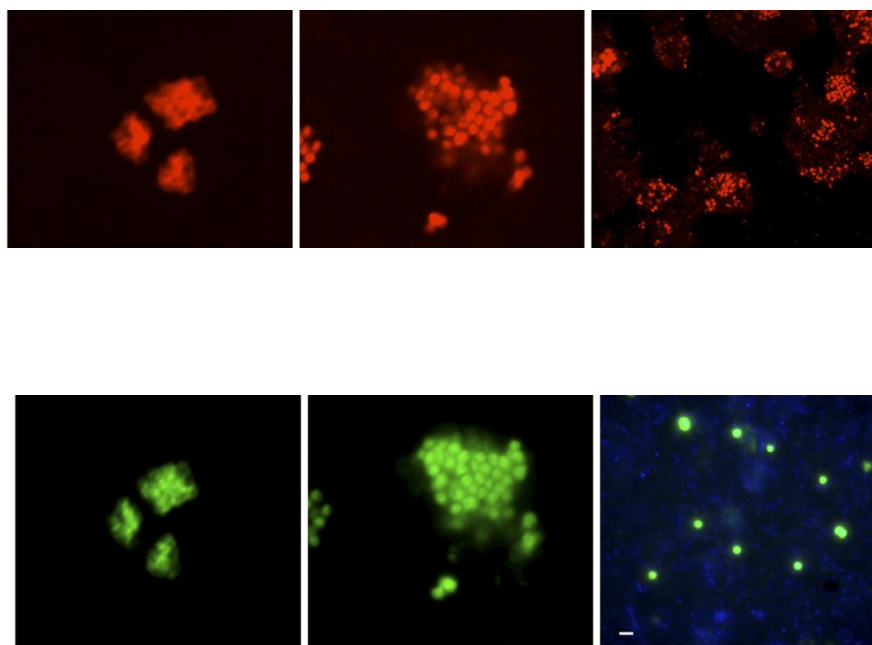
Doposud není tento kmen spolehlivě popsán. Byly studovány reparační mechanismy v genomu a nebyly popsány strukturní geny zajišťující metabolické procesy uvnitř buňky. *Nanoarchaeota* jsou dnes považována za velmi starou formu života (Friend, 2007). Zástupce uvádí obrázek č. 17.



Obrázek 17: *Nanoarchaeum* (převzato z <http://microbewiki.kenyon.edu>)

3.6 Kmen *Thaumarchaeota*

Thaumarchaeota hraje významnou roli při nitrifikaci v globálním cyklu dusíku, jak v mořském, tak v suchozemském prostředí. Zástupci kmene jsou autotrofní amoniak oxidující Archaea, buňky tohoto kmene jsou využívány při biologickém čištění odpadních vod. (Mußmann, 2011). Zástupce uvádí obrázek č. 18.



Obrázek 18: *Thaumarchaeota* (převzato z www.pnas.org)

4 Využití archaea v biotechnologiích

Mikrobiální organismy mají málo pozornosti ve všeobecných textech a v lidském pohledu na život. Ve většině případech jsou vnímány pouze jako původci nemocí nebo hniloby, přestože fungování biosféry je naprosto závislé na činnosti mikrobiálního světa (Pace, 1997).

Mikrobiální enzymy již zaujímají významné postavení v moderních biotechnologiích, kdy optimalizují nebo dokonce nahrazují již stávající procesy. Biotechnologie využívající mikroorganismy si klade za cíl snížit odpady, zvýšit produkci surovin a to procesem šetrným k životnímu prostředí.

Většina doposud známých enzymů byla získána z bakterií a hub. Na enzymatickém trhu činí roční globální obrat okolo 5 miliard eur. Již v současné době enzymy domény Archaea našly, ale intenzivní studium v posledních dvou desetiletích stále více ukazuje, že unikátní vlastnosti enzymů Archaeí se budou stále více uplatňovat v rozvoji nových technologií, jako je proteomika, metabolimika, enzymologie a mnoho dalších (Egorova, 2005).

Zástupci domény Archaea jsou vhodné organismy pro lékařské, biologické nebo biotechnologické využití.

Archaeální lipidy jsou studovány a využívány pro jejich obdivuhodnou a dlouhodobou stabilitu pro výrobu biofilmů, které mění vlastnosti povrchů látek, kdy zvýší jejich izolační vlastnosti, jsou odolné vůči oxidaci, vysoké teplotě, alkalickému pH, také snižují propustnost materiálu a v přítomnosti vzduchu nedochází ke zhoršení. Z těchto přírodních lipidů vznikly archaeosomy, synteticky vyrobené archaeální lipidy. Archaeosomy jsou také vhodné pro intracelulární užití, kdy se zaměřují přímo na fagocytární systém a slouží jako pomocné látky, které stimulují imunitní systém a slouží na ochranu proti vážným infekcím a nemocem (Jacquemet, 2009).

Dramatický nárůst nově izolovaných termofilních a hypertermofilních mikroorganismů domény Archaea vedl akademické a průmyslové laboratoře k analýze jejich genomů a vyšetřování jejich enzymů. Výsledky ukazují velký potenciál využití v průmyslových biotechnologiích. Enzymy získané z těchto extrémofilních organismů jsou lepší než tradiční katalyzátory, protože mohou provádět průmyslové procesy i za extrémních podmínek, kdy klasické proteiny jsou denaturovány. Stále jsou však naše znalosti o molekulárních vlastnostech enzymů omezené, pro lepší využití je nezbytné pochopit

mechanismy, které jsou odpovědné za katalytické aktivity a stabilitu například při vysokých teplotách (Egorova, 2005).

Halofilní mikroorganismy nabízí velké množství potencionálních aplikací v různých oblastech biotechnologií. Nejen svými produkty metabolismu, ale také jejich fyziologickými vlastnostmi. Příkladem je *Halobacterium salinarum*, který se užívá pro výrobu umělých sític, *Halomonas elongate* je využíván v kosmetice, *Halobacteria* jsou prospěšná k výrobě lipozomů pro medicínu nebo k bioremediaci po ropných haváriích v mořských vodách, *Natrialba* jsou využitelná pro biodegradaci, ve farmaceutickém průmyslu, *Haloferax mediterranei* pro výrobu bioplastů (PHB) (Akolkar, 2009).

V roce 1994 založila Dr. Kuchina Nona (obrázek č. 20) v Izraeli kliniku Lenon, která se zaměřuje především na zdravotní problémy (dermatologické, dnes i jiné) u pacientů s rakovinou s využitím produktů z Mrtvého moře a Archaea. Dr. Nona byla nominována na Nobelovu cenu za objevení bioorganominerálního komplexu, který jako jediný na světě vytváří prostředí, ve kterém je možné halofilní archeu z Mrtvého moře kultivovat, a ve kterém jsou optimální podmínky pro její přežití. Bioorganominerální komplex je složen z biologicky aktivních látek, z organických sloučenin (aromaterapeutických olejů a fototerapeutických doplňků) a z minerálů Mrtvého moře, obsahujících komplexní sloučeniny kovů, anorganické soli a aktivní látky jílového bahna (obrázek 19).

Produkty Dr. Nony mají obdivuhodné výsledky v léčbě různých onemocnění. Úspěch halofilních archeí spolu s minerálními látkami z Mrtvého moře byl opakovaně zaznamenán u pacientů s dermatologickými, revmatologickými, gastroenterologickými, gynekologickými nebo plicními problémy. Rozsah uzdravení není limitován a stále se objevují nové případy vyléčení a rozšíření škály působnosti těchto mikroorganismů (Nona, 2008).



Obrázek 20: Dr.Nona
(Dr.Nona,2008)



Obrázek 19: halofilní
archaea (Dr.Nona,2008)

Značný potenciál v biotechnologických procesech byl prokázán také u metanogenních Archaeí použitelných pro anoxické čištění při anaerobním biologickém čištění odpadních vod nebo při bioremediaci kalů v pobřežních sedimentech. Výhodou je, že metan utvářející se při procesu anaerobní digesce je možný využít jako zdroj paliva (Allers, 2005).

Členové domény Archaea produkují bílkoviny, které vyžadují železo-síranové klastry, představující důležité kofaktory v buňkách. Mnoho metanogenních archeí roste při anaerobních podmínkách, kdy dochází k šíření železo-sírných proteinů. Zástupci domény Archaea mají k dispozici jiný alternativní mechanismus pro přenosu elektronů, než bakteriální a eukaryotické buňky. Biochemické analýzy potvrdily, že v budoucnosti by mohli zástupci Archaea nahradit síran redukující bakterie (Boyd, 2009).

Skupiny mikroorganismů domény Archaea jsou také ve výzkumech používány v čistírnách odpadních vod z papírenského průmyslu (De Bok, 2006).

Neobvyklý metabolismus zástupců domény Archaea je předmětem výzkumu ve výrobě biopaliva, ve farmaceutickém, zemědělském a průmyslovém odvětví nebo také při odstraňování nebezpečného odpadu (Friend, 2007).

5 Experimentální část

5.1 Laboratorní materiál a přístrojové vybavení

Laboratorní materiál uvádí obrázek č. 21.

- skleněné pipety,
- mikropipety,
- odměrný válec 250 ml,
- Erlenmeyerovy baňky,
- zkumavky,
- Petriho misky,
- Autokláv (Sterilab, obrázek č. 22)
- Sterilizátor (Stericell, BMT)
- Termostat (Biological termostat BT 120M)
- Čítačka kolonií (Protocol 2)



Obrázek 21: Laboratorní materiál



Obrázek 22: Autokláv (www.bmt.cz)

5.2 Kultivační média

Acidithiobacillus ferrooxidans byl inokulován do média 9K a byl sledován jeho růst po dobu 28 dní. Růst se projevoval výrazným zbarvením původního média (roztoku), což indikovalo množení požadovaných bakterií. Existuje přímá úměra mezi výskytem bakterií a sytostí zbarvení. S přibývajícím časem docházelo k sedimentaci.

Acidithiobacillus thiooxidans byl také inokulován do média 9K, kde přítomnost množících se bakterií indikoval zákal narůstající úměrně s časem.

V obou případech byla přítomnost bakterií zjevná a mohlo dojít k následnému ředění a aplikaci bakterií na tuhá živná média pro odečet počtu kolonií.

5.2.1 Příprava média pro *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Médium 9K uvádí obrázek č. 23.

Médium 9K podle Silvermana (Vojtková, 2011)

Roztok A

| | |
|---|-----------|
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 2 g/l |
| KCl..... | 0,1 g/l |
| K_2HPO_4 | 0,5 g/l |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | 0,5 g/l |
| $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ | 0,01 g/l |
| destilovaná voda..... | 700 ml |
| pH..... | 1,8 – 2,0 |

Roztok B

| | |
|--|-----------|
| NH_2SO_4 | 2 ml/l |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | 40 g/l |
| destilovaná voda..... | 300 ml |
| pH..... | 1,8 – 2,0 |



Obrázek 23: Médium 9K s *Acidithiobacillus ferrooxidans*



Obrázek 24: Médium 9K s *Acidithiobacillus thiooxidans*

Živné Izolační médium pro železité bakterie

| | |
|-----------------------------------|-----------|
| $C_6H_{12}O_6$ | 0,15 g |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 0,5 g |
| $Ca(NO_2)_2$ | 0,01 g |
| K_2HPO_4 | 0,05 g |
| $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ | 0,05 g |
| KCl..... | 0,05 g |
| $CaCO_3$ | 0,10 g |
| kianokobalamin (vitamín B12)..... | 0,00001 g |
| thiamin (vitamín B1)..... | 0,0004 g |
| agar..... | 10 g |
| destilovaná voda..... | 1000 ml |

5.2.2 Příprava média pro *Acidithiobacillus thiooxidans*

Médium 9K uvádí obrázek č. 24.

Médium 9K podle Waksmana a Joffeho

Médium 9K uvádí obrázek č. 23.

| | |
|---|----------|
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0,2 g/l |
| K ₂ HPO ₄ | 3 g/l |
| MgSO ₄ . 7 H ₂ O | 0,5 g/l |
| CaCl ₂ . 6 H ₂ O | 0,25 g/l |
| FeSO ₄ . 7 H ₂ O | 0,05 g/l |
| S ⁰ | 10 g |
| destilovaná voda..... | 1000 ml |
| TWEEN 80TM..... | 0,2 ml/l |
| pH..... | 4 |

Živné médium *Thiobacillus Agar*

| | |
|---|---------|
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0,4 g |
| KH ₂ PO ₄ | 4,00 g |
| CaCl ₂ | 0,25 g |
| FeSO ₄ . 7 H ₂ O | 0,01 g |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O..... | 0,50 g |
| Na ₂ S ₂ O ₃ | 5,00 g |
| agar..... | 12,5 g |
| destilovaná voda..... | 1000 ml |

5.3 Charakteristika bakteriálních kmenů

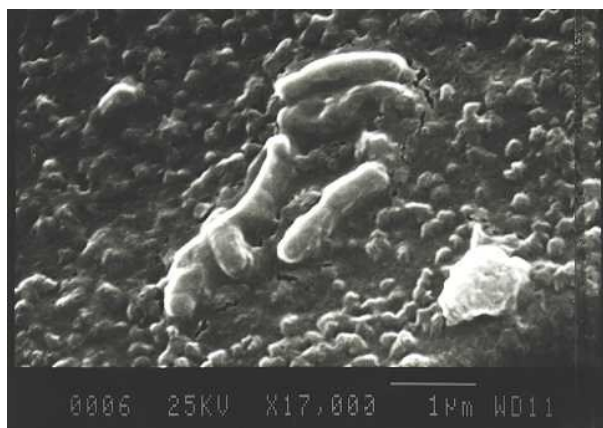
V experimentální části diplomové práce byly použity, jak již bylo uvedeno v úvodu, dva kmeny extrémně acidofilních bakterií, které svými fyziologickými nároky odpovídají vlastnostem Archaeí – *Acidithiobacillus ferrooxidans* a *Acidithiobacillus thiooxidans* rodu *Acidithiobacillus* kmene *Proteobacteria*.

5.3.1 *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Acidithiobacillus ferrooxidans (obrázek č. 25) je chemolithotrofní, acidofilní, gramnegativní, mezofilní a nesporulující bakterie tyčinkovitého tvaru, která využívá atmosférický oxid uhličitý a oxiduje redukované sírné sloučeniny pro získání energie. Oxid uhličitý fixuje Calvinovým cyklem a k tomuto procesu používá energii, kterou získá z oxidace železa nebo síry. Dále získává energii oxidací železnatých iontů na ionty železité a díky respiračnímu systému se přizpůsobuje různým životním podmínkám. Analýza 16S rRNA potvrdila zařazení mikroorganismu pod doménu bakterie, kmen *Proteobacteria* a rod *Acidithiobacillus*, ale v budoucnosti není vyloučeno na základě morfologických a fyziologických vlastností její reklasifikaci pod doménu Archaea.

Bakterie nejlépe roste za aerobních podmínek, ale není striktně aerobním kmenem. Pohyb obstarává jeden nebo více bičíků a dosahují délky až do 9 μm .

A. ferrooxidans se přirozeně vyskytuje na minerálu zvaném pyrit (FeS_2) a v ložiscích sulfidových rud, kde funguje jako katalyzátor oxidace. Její využití je v biohydrometalurgii (bioloužení, biotěžba) (Pelikánová, Poskerová, 2012).



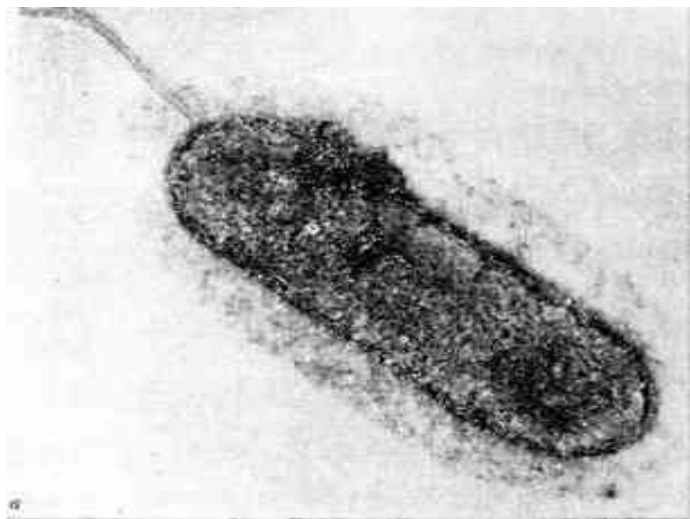
Obrázek 25: *Acidithiobacillus ferrooxidans* (převzato z www2.brgm.fr)

5.3.2 *Acidithiobacillus thiooxidans*

Acidithiobacillus thiooxidans (obrázek č. 26) energii získává pouze oxidací sloučenin síry, není tedy schopna oxidovat železnaté ionty. Jedná se o mezofilní, obligátně chemolitotrofní, autotrofní a acidofilní bakterii, více tolerantnější ke kyselějšímu prostředí (pH 0,05 – 5), než *A. ferrooxidans*.

Nachází se v sirných pramenech, v půdě a kyselých důlních vodách, podílely se na tvorbě jeskynních systémů na celém světě, kde spolu s dalšími mikrobiálními společenstvy vytváří kyseliny sírovou, která narušuje strukturu vápence a vytváří sádrové krystaly, které utvářejí vlastní podobu jeskyně. Bakterie jsou známy svou schopností biokoroze betonu (Sedláček, 2007, Koenig, 2010).

Jako zástupce rodu *Thiobacillus* nachází uplatnění v biohydrometalurgii při získávání kovů z chudých rud. Lze konstatovat, že působení bakterií se používá k lepšímu zpřístupnění chemikáliím ke struktuře minerálů. V biometalurgii jsou bakterie rodu *Acidithiobacillus* nejlépe prozkoumané a metody využívající tyto mikroorganismy jsou energeticky méně náročné, což šetří také investiční náklady. Bakterie se využívají pro získávání uranu, mědi, zinku, kobaltu, vanadu nebo zlata. Sice tato metoda vyžaduje větší náklady, než tradiční těžba, ale na druhou stranu snižuje množství uvolněných toxických látek (Antošová, 2008, Koenig, 2010).



Obrázek 26: *Acidithiobacillus thiooxidans* (převzato z <http://geo.web.ru>)

5.4 Stanovení růstové křivky

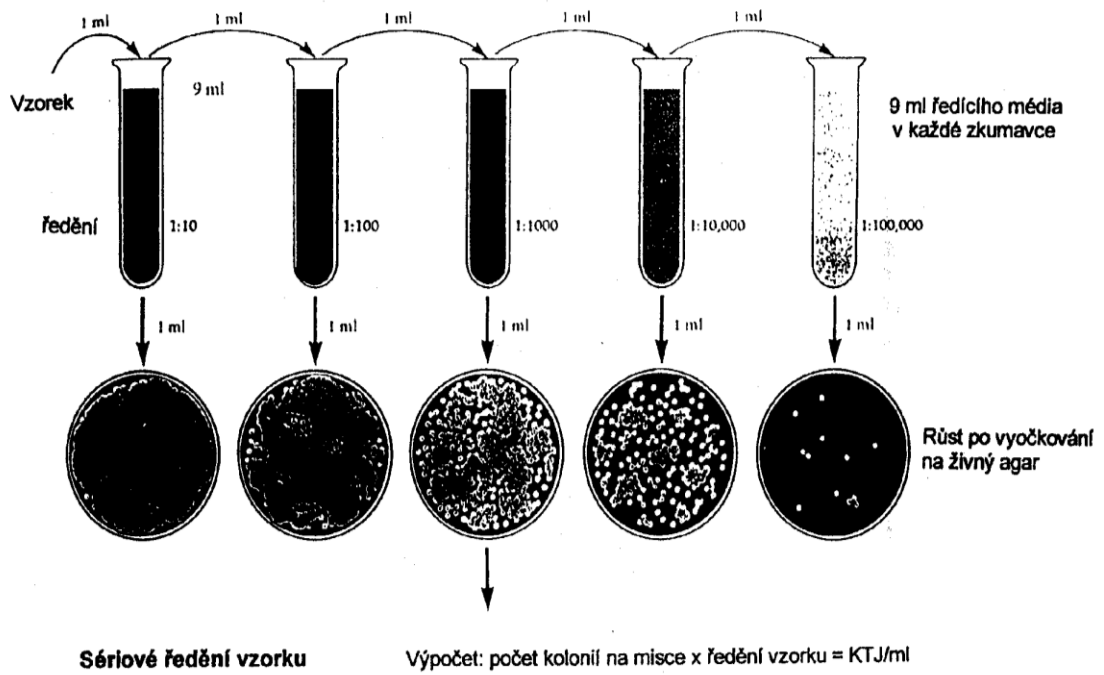
Růstová křivka byla stanovena pomocí přímé metody výsevem na pevné půdy při konkrétním ředění (tabulka č. 2).

Bakteriální kultury kmene *Acidithiobacillus ferrooxidans* a *Acidithiobacillus thiooxidans* byly inokulovány do sterilních médií podle Silvermana, Waksmana a Joffeho. V pravidelných časových intervalech (co 24 hodin) byl proveden konkrétní výsev na Petriho misky s pevnými médii (pro *Acidithiobacillus ferrooxidans* bylo použito Izolační médium pro železité bakterie a pro *Acidithiobacillus thiooxidans* byl použit *Thiobacillus agar*).

Jakmile byl růst bakteriální kultury v exponenciální fázi, bylo použito příslušné ředění kmene, aby bylo možné prakticky určit počet kolonií na automatické čítačce Protocol 2 (viz obrázek č. 27).

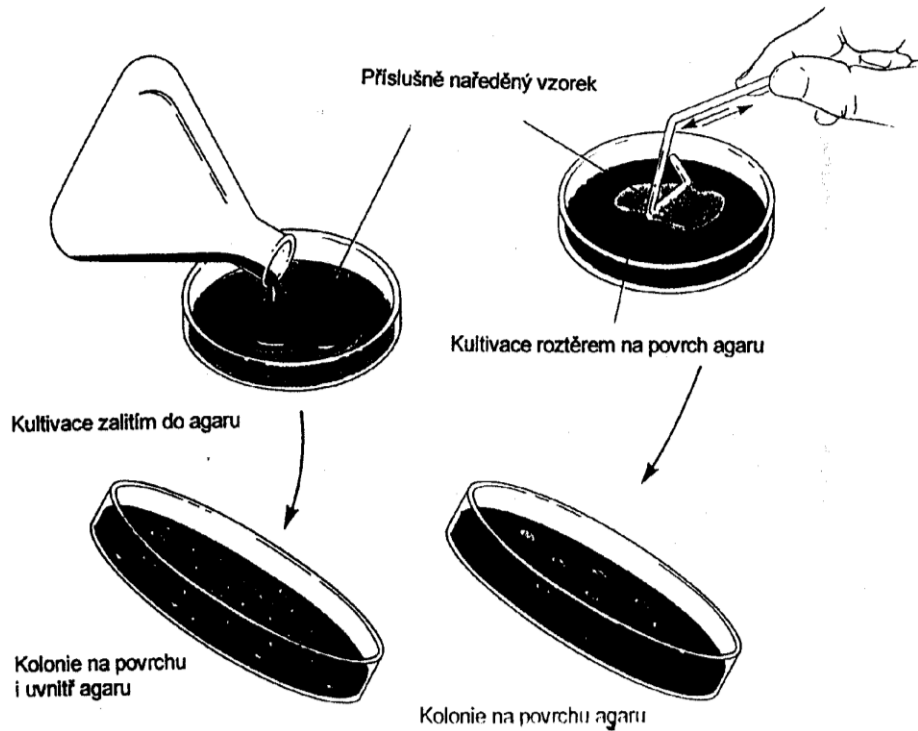
Tabulka 2: Ředění vzorku

| Čas (dny) | Ředění buněk ve vzorku | Čas (dny) | Ředění buněk ve vzorku |
|-----------|------------------------|-----------|------------------------|
| 4 | 10^{-1} | 17 | 10^{-10} |
| 5 | 10^{-2} | 18 | 10^{-11} |
| 6 | 10^{-3} | 19 | 10^{-12} |
| 7 | 10^{-4} | 20 | 10^{-13} |
| 8 | 10^{-5} | 21 | 10^{-14} |
| 9 | 10^{-5} | 22 | 10^{-15} |
| 10 | 10^{-5} | 23 | 10^{-15} |
| 11 | 10^{-6} | 24 | 10^{-15} |
| 12 | 10^{-7} | 25 | 10^{-16} |
| 13 | 10^{-8} | 26 | 10^{-17} |
| 14 | 10^{-9} | 27 | 10^{-18} |
| 15 | 10^{-10} | 28 | 10^{-19} |
| 16 | 10^{-10} | | |



Sériové ředění vzorku

Výpočet: počet kolonií na misce x ředění vzorku = KTJ/ml



Obrázek 27: Postup sériového ředění vzorku (převzato z <http://fvl.vfu.cz>)

5.5 Výsledky experimentů

Růst obou bakteriálních kmenů byl sledován po dobu 28 dní pravidelně každých 24 hodin.

Růstová křivka byla stanovena na základě množství bakteriálních kolonií spočítaných na čítače kolonií, které se rozmnožily po stanovenou dobu experimentu. Každý den bylo prováděno ředění, aby se docílilo menšího počtu kolonií a z toho vyplývajícího přehlednějšího určení počtu bakterií a lepšího stanovení růstové křivky.

Po celou dobu experimentu bylo sledováno pH médií, hodnoty pH byly měřeny a případně snižovány pomocí 5M H₂SO₄ na optimální hodnoty, které jsou u *Acidithiobacillus ferrooxidans* 1 – 2 a u *Acidithiobacillus thiooxidans* 4.

Při experimentech byly zajištěny optimální podmínky růstu mikroorganismů jejich uchováním v termostatu při teplotě 40° C.

5.5.1 Růstová křivka *Acidithiobacillus ferrooxidans*

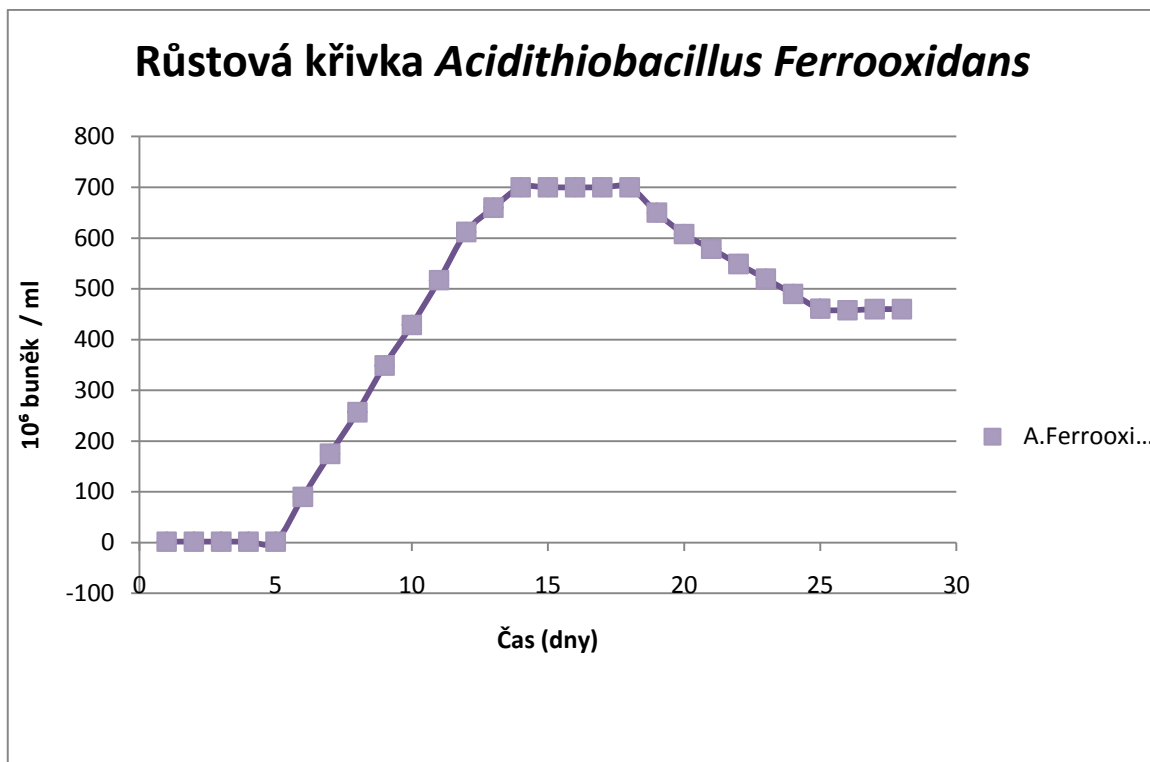
Během prvních pěti dnů docházelo k adaptaci mikroorganismů na živnou půdu a jejich počet zůstával téměř konstantní. Od šestého dne docházelo k výraznému nárůstu počtu kolonií až na $60 \cdot 10^6$ buněk/ml. V tuto chvíli kmen přechází do fáze exponenciálního růstu a setrvává v něm až do 14tého dne, kdy se růst pozastavil a v průběhu čtyř dnů zůstával konstantní. Od osmnáctého dne v důsledku vyčerpávání živin začal počet buněk v jednom mililitru klesat a poslední den mého měření se ustálil na koncentraci $460 \cdot 10^6$ buněk / ml. Počet buněk v jednotlivých dnech uvádí tabulka č. 3, graf č. 1 a obrázek č. 28.

Tabulka 3: Počet buněk v mém vzorku odebraných v jednotlivých dnech v $10^6/ml$

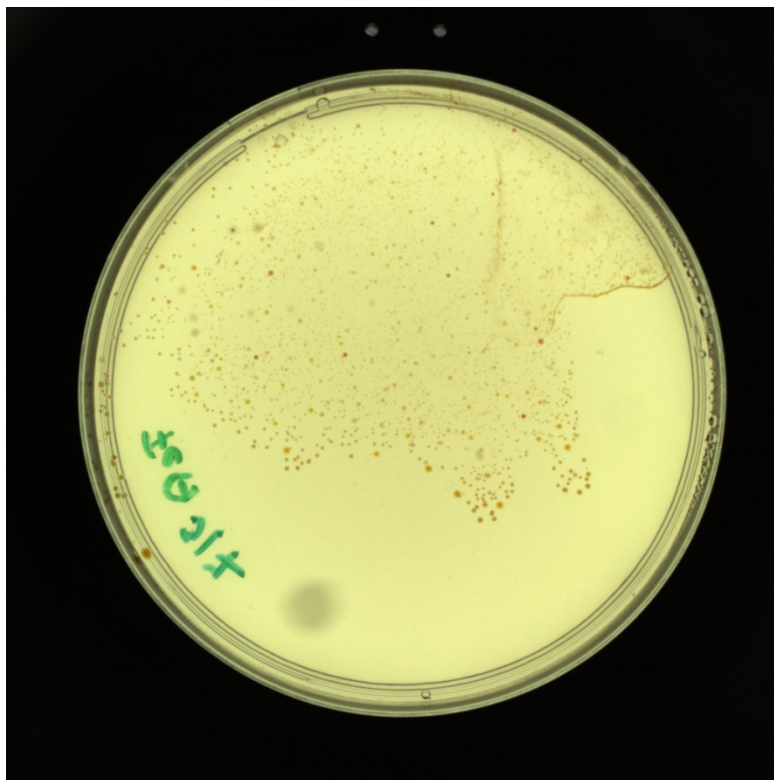
| Čas (dny) | buňky / ml |
|-----------|------------|
| 1 | 2 10^6 |
| 2 | 2 10^6 |
| 3 | 2 10^6 |
| 4 | 2 10^6 |
| 5 | 2 10^6 |
| 6 | 90 10^6 |
| 7 | 175 10^6 |
| 8 | 257 10^6 |
| 9 | 349 10^6 |
| 10 | 429 10^6 |

| Čas (dny) | buňky / ml |
|-----------|------------|
| 11 | 517 10^6 |
| 12 | 612 10^6 |
| 13 | 660 10^6 |
| 14 | 700 10^6 |
| 15 | 700 10^6 |
| 16 | 700 10^6 |
| 17 | 700 10^6 |
| 18 | 669 10^6 |
| 19 | 641 10^6 |
| 20 | 608 10^6 |

| Čas (dny) | buňky / ml |
|-----------|------------|
| 21 | 579 10^6 |
| 22 | 549 10^6 |
| 23 | 520 10^6 |
| 24 | 490 10^6 |
| 25 | 461 10^6 |
| 26 | 458 10^6 |
| 27 | 460 10^6 |
| 28 | 460 10^6 |



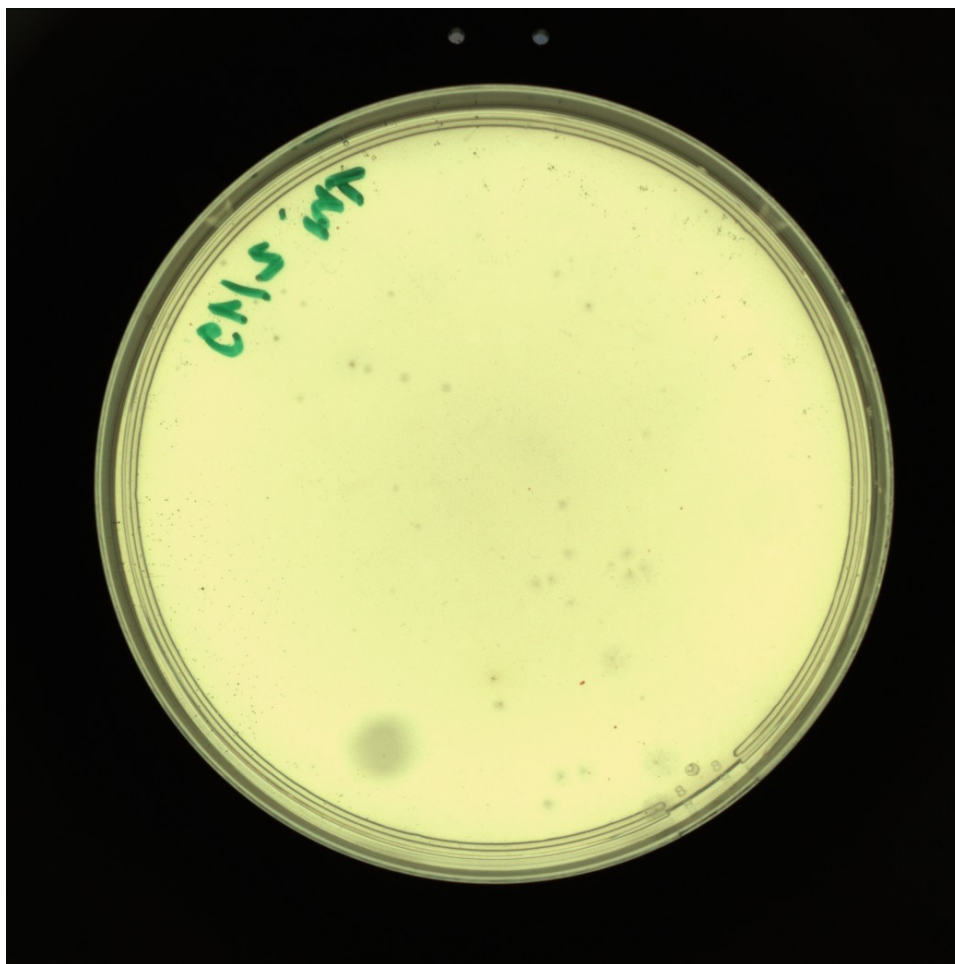
Graf 1: Růstová křivka *Acidithiobacillus ferrooxidans* během 28 dní



Obrázek 28: Kolonie *Acidithiobacillus ferrooxidans*

5.5.2 Růstová křivka *Acidithiobacillus thiooxidans*

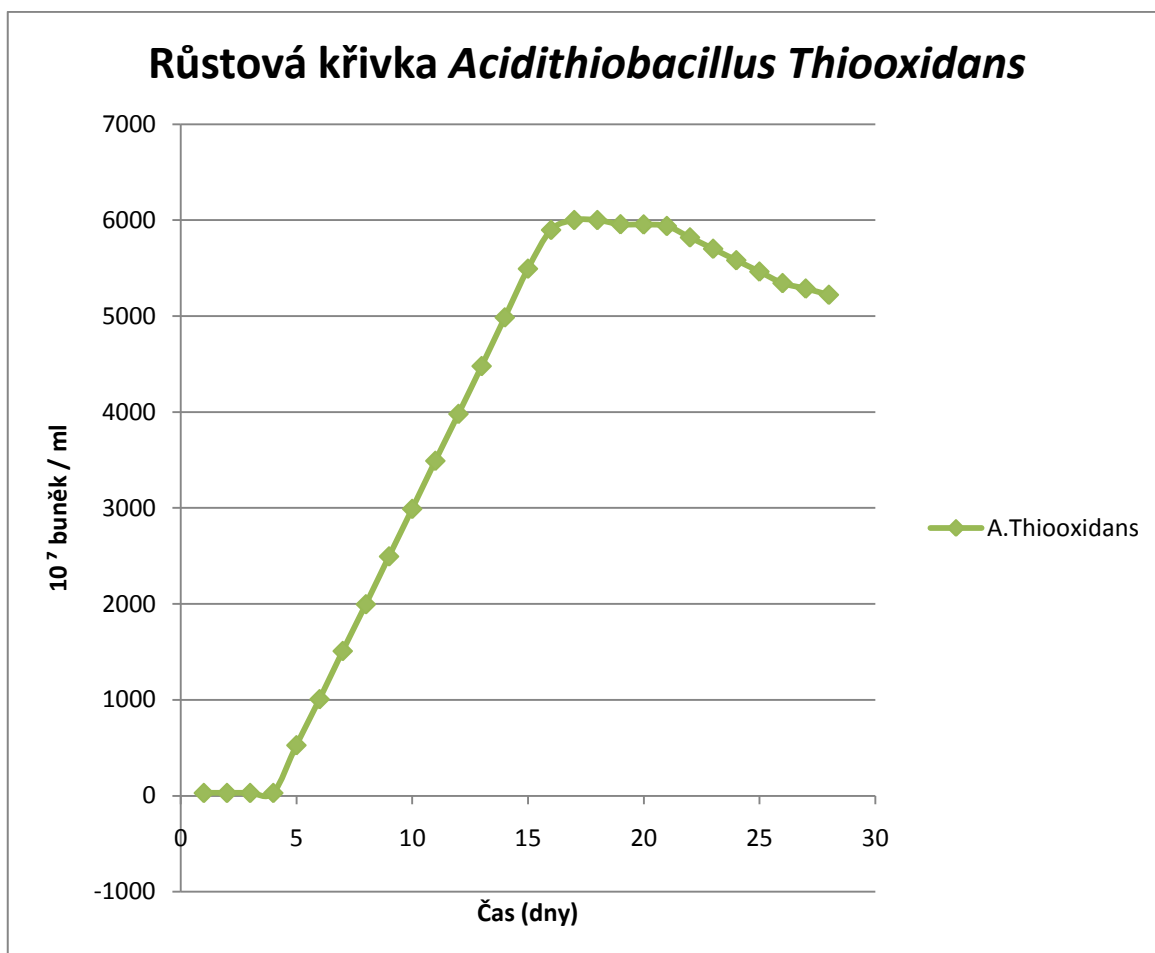
Během prvních čtyř dní se mikroorganismy postupně přizpůsobovaly novému prostředí a jejich růst se v tomto období téměř neměnil. Kmen se nacházel od pátého dne v log fázi a již přizpůsobené bakterie se začínaly množit dělením a jejich počet narůstal v průměru o $500 \cdot 10^7$ buněk / ml. V tuto chvíli byla patrná exponenciální fáze růstu až do sedmnáctého dne, kdy se růst pozastavil a dva dny zůstal konstantní. Od 19tého dne v důsledku vyčerpávání živin začal počet buněk klesat a poslední den mého měření se ustálil na koncentraci $5221 \cdot 10^7$ buněk / ml. Počty buněk v jednotlivých dnech jsou uvedeny v tabulce č. 4, grafu č. 2 a obrázek č. 29.



Obrázek 29: Kolonie *Acidithiobacillus thiooxidans*

Tabulka 4: Počet buněk v mém vzorku odebraných v jednotlivých dnech v 10^7 buněk / ml

| | | | |
|-----------|-------------------|----|-------------|
| Čas (dny) | buňky / ml | 14 | 4985 10^7 |
| 1 | 30 10^7 | 15 | 5493 10^7 |
| 2 | 30 10^7 | 16 | 5897 10^7 |
| 3 | 30 10^7 | 17 | 6000 10^7 |
| 4 | 30 10^7 | 18 | 6000 10^7 |
| 5 | 527 10^7 | 19 | 5956 10^7 |
| 6 | 1007 10^7 | 20 | 5954 10^7 |
| 7 | 1509 10^7 | 21 | 5938 10^7 |
| 8 | 1996 10^7 | 22 | 5819 10^7 |
| 9 | 2495 10^7 | 23 | 5701 10^7 |
| Čas (dny) | buňky / ml | 24 | 5581 10^7 |
| 10 | 2990 10^7 | 25 | 5463 10^7 |
| 11 | 3491 10^7 | 26 | 5343 10^7 |
| 12 | 3980 10^7 | 27 | 5286 10^7 |
| 13 | 4478 10^7 | 28 | 5221 10^7 |

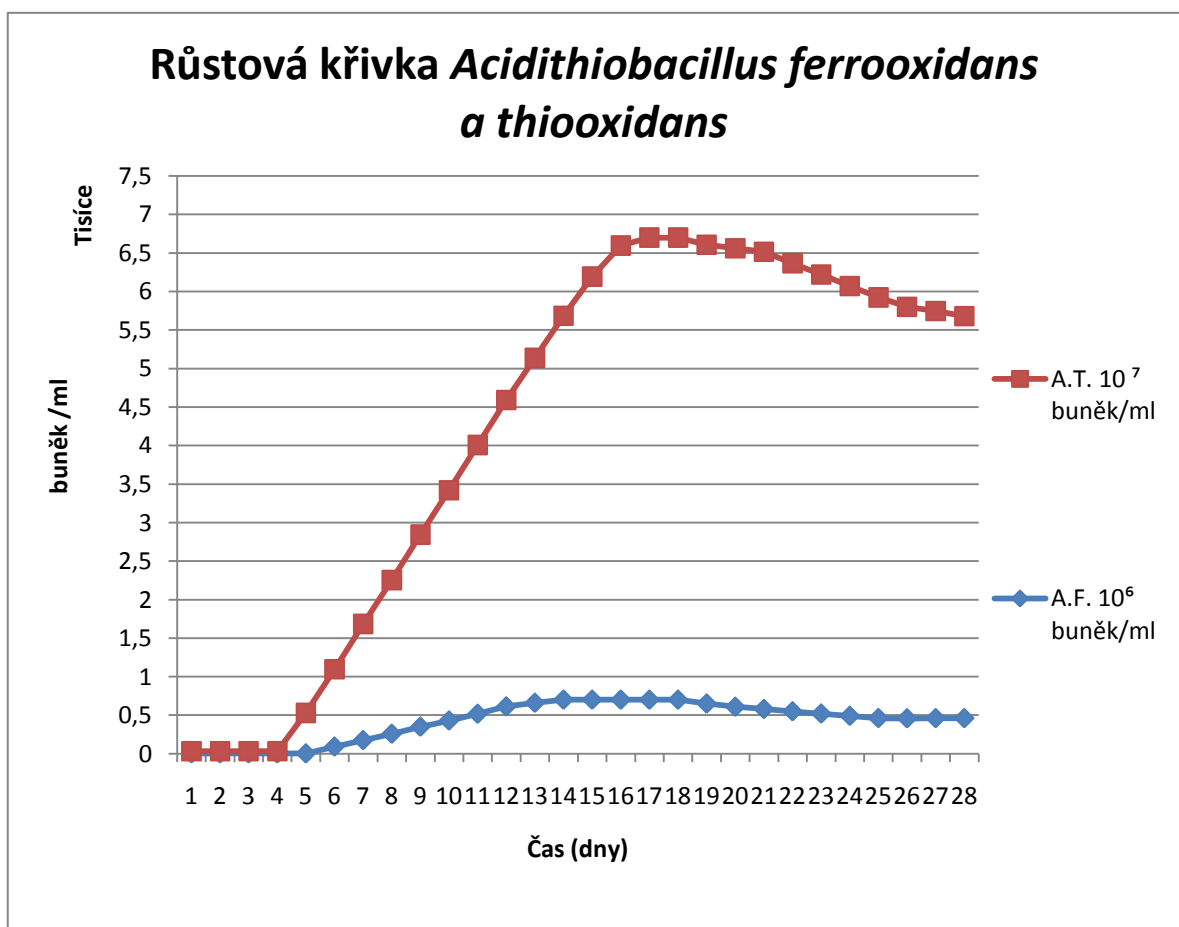


Graf 2: Růstová křivka *Acidithiobacillus thiooxidans* během 28 dní

5.6 Diskuze výsledků

Z grafu č. 3 lze vyčíst, že množství buněk v jednom mililitru je u bakterií *Acidithiobacillus thiooxidans* podstatně vyšší, než u *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Nárůst *Acidithiobacillus thiooxidans* probíhal rychleji, ale fáze zastavení růstu byla o polovinu kratší, než u rodu *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Klesání počtu buněk bylo u *Acidithiobacillus ferrooxidans* pomalejší a tedy postupnější.

Při srovnání růstové křivky (graf č. 3) kmenů *Acidithiobacillus ferrooxidans* a *Acidithiobacillus thiooxidans* byl patrný rychlejší a kvalitnější růst kmene *Acidithiobacillus thiooxidans*. Oba kmeny se lišily řádově o 10^{-1} buněk.



Graf 3: Růstová křivka *Acidithiobacillus ferrooxidans* a *thiooxidans*

Výsledky srovnatelných studií jiných autorů nejsou známy, existují jen zmínky v několika pracích (například práce Ing. Radima Jablonky).

Zajímavou studií k růstovým vlastnostem kmene *Acidithiobacillus ferrooxidans* je práce kolektivu autorů Vojtková – Jandačka, zabývající se měřením magnetických vlastností v závislosti na koncentracích kmene. Bakterie byly po dobu 28 dní kultivovány v médiu 9K podle Silvermana, po konečném zfiltrování a vysušení byl vzorek proměřen pomocí magnetometru a bylo zjištěno, že železité produkty vznikající působením bakterií, vykazují měřitelný magnetický signál (Vojtková, 2011).

Studie zabývající se autotrofním růstem *Acidithiobacillus ferrooxidans* při oxidaci molekulárního vodíku a bez přítomnosti železa ukázala, že bakterie je schopná růst spolu s vodíkem při pH 2,0 – 3,5. Koncentrace buněk po šesti dnech dosáhla $4 \cdot 10^9$ /ml. Ukázalo se, že tempo růstu bakterií bylo stejné jako v médiu obsahujícím železo (Kai, 2007). V mém experimentu bylo dosaženo koncentrace buněk $700 \cdot 10^6$ /ml v médiu obsahujícím železo a při pH 1,8 – 2, ale bez dodávaného vzduchu oproti jmenované studii.

V experimentu, který sledoval růst *Acidithiobacillus thiooxidans* s upraveným pH 3,5 – 8 byl sledován vliv hodnoty pH na růst bakterií. Bylo zjištěno, že při pH vyšším, než je optimální hodnota pro tento bakteriální kmen (experimentálně ověřováno pH 5,5) bakterie nevykazují růst žádný (Lors, 2009). V mé experimentální práci bylo pH pro bakterie *Acidithiobacillus thiooxidans* upraveno na hodnotu 4 a tudíž růst probíhal ve všech fázích – od lag fáze, přes exponenciální růst až po fázi odumírání.

6 Závěr

Diplomová práce byla v první části zaměřena na teoretickou charakteristiku domény Archaea, na její morfologické, fyziologické a systematické rozdělení. Druhá část diplomové práce se zabývala experimentálním sledováním růstu a následným vyhodnocením růstové křivky bakterií *Acidithiobacillus ferrooxidans* a *Acidithiobacillus thiooxidans*. Tyto bakteriální kmeny byly použity vzhledem k mému názoru, že v budoucnosti je možná resystematizace doposud stávajícího taxonomického zařazení těchto kmenů na základě velmi podobných fyziologických vlastností mezi Archaea a bakteriálními rody *Acidithiobacillus*.

V praktické části byly bakterie kultivovány pomocí médií podle Silvermana a Waksama a následně byly inokulovány na živné půdy. Pro rod *Acidithiobacillus ferrooxidans* bylo použito izolační médiu pro železité bakterie a pro *Acidithiobacillus thiooxidans* byl použit *Thiobacillus* agar. Po celou dobu experimentu během 28 dní bylo sledováno pH a upravováno na požadovanou hodnotu pomocí 5M H₂SO₄. Po uplynutí stanoveného času se pomocí čítačky Protocol 2 počítaly kolonie a následně byla modelována růstová křivka pro oba rody.

Bakteriální druh *Acidithiobacillus thiooxidans* vykazoval rychlejší a větší nárůst dělicích se buněk, než rod *Acidithiobacillus ferrooxidans*, řádově se oba rody lišily o 10⁻¹ buněk/ml.

Studie potvrdily předpověď Dr. Woese z roku 1977, že Archaea bude vynikat fenotypovou rozmanitostí a jedinečnými funkcemi na molekulární úrovni.

Od objevení vlastností Archaea se snaží vědci po celém světě vyvinout látky podobné archaeálním s následným lékařským, biologickým a biotechnologickým využitím. Samotní zástupci domény Archaea jsou dnes s velkým úspěchem využíváni v nejrůznějších oblastech biotechnologických procesů.

V budoucnosti lze předpokládat zvyšující se pronikání mikroorganismů Archaea do nových technologií, kde bude kladen důraz na inovaci již stávajících zařízení s nahrazením některých bakteriálních kmenů za archaeální z důvodu jejich fyziologických vlastností, zejména schopnosti růstu v extrémním prostředí (vysoké či nízké pH, tlak, záření a další).

Výzkumy Archaeí také umožňují získat nové vědomosti na molekulární úrovni biologie, genetiky a fyziologie, prohlubují tak naše znalosti o rozmanitosti života.

Doposud nebyly objeveny patogenní druhy Archaea a jejich diverzita není stále zcela objasněná a proto by měly být veškeré závěry ohledně této domény užívány s opatrností.

7 Seznam použité literatury

- [1] AKOLKAR, Aparna. *Isolation and Characterization of Halophilic Archaea: Production, Characterization and Application of Extracellular Protease from Halobacterium sp. SPI*. India, AUGUST 2009. Disertační práce. The Maharaja Sayajirao university of Baroda.
- [2] ALLERS, Thorsten; MEVARECH Moshe. Archaeal genetics: the third way. *Nature Reviews Genetics*. New York (USA): Macmillan, 2005, roč. 6, s. 58-73, ISSN: 1471-0056.
- [3] ANDRLE, Michal. Život bují i v šílených extrémech. *21.století*. Praha: RF HOBBY, 2010. ISSN 1214-1097.
- [4] ANTOŠOVÁ, Ivana. *Bakteriální aktivita v geologických materiálech*. Brno, 2008. Bakalářská práce. Masarykova univerzita.
- [5] ARCHAEA: Morphology. WAGGONER, Ben; SPEER, Brian. Berkley: *University of California Museum of Paleontology*. 2001. ISSN 0031-0298.
- [6] BLUM, Paul. *Archaea: New Models for Prokaryotic Biology*. Great Britain: Caister Academic Press, 2008, s. 248. ISBN 978-1-904455-27-1.
- [7] BOYD, Jeffrey. Archaeal ApbC/Nbp35 Homologs Function as Iron-Sulfur Cluster Carrier Proteins. *Journal of Bacteriology*, 2009, roč. 191, č. 5, s. 1490-1497. ISSN 0021-9193.
- [8] BRUCE, Alberts. *Základy buněčné biologie*. 1. vydání. Ústí nad Labem : Espero

Publishing, 1998. 630 s. ISBN 80-902906-0-4.

[9] DASSARMA, Priya a DASSARMA Shiladitya. *Introduction to Life in an Extreme Environment*. Burlington: Carolina Biological Supply Company, 2006. ISSN 27215-3398.

[10] DE BOK, Frank. Degradation of Methanethiol by Methylophilic Methanogenic Archaea in a Lab-Scale Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor. *Applied and Environmental Microbiology*. Washington DC: American Society for Microbiology, 2006, roč. 72, č. 12, s. 7540-7547. ISSN 0099-2240.

[11] DR.KUCHINA, Nona. *Mrtvé moře: ozdravování na dosah ruky*. Praha: Dr. Nona International, 2001.

[12] DWORKIN, Martin. *The Prokaryotes: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*. 3rd ed. New York (USA): Springer, 2006, č. 3, s. 1146. ISBN 978-0387-25493-7.

[13] EGOROVA, Ksenia a Garabed ANTRANIKIAN. Industrial relevance of thermophilic Archaea. Hamburg (Germany): *Institute of Technical Microbiology*. 2005, č. 8, s. 649–655, ISSN 1369-5274.

[14] ELLIS, Dean. Halophilic Archaea determined from geothermal steam vent aerosols. San Diego (USA): 2008, č. 10, s. 1582-1590. ISSN 1462-2920.

[15] EUZÉBY, Jean. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature. France: *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1997, s. 47, ISSN 590-592.

[16] FORTERRE, Patrick a BROCHIER, Celine. Evolution of the Archaea. Paris (France): *Theoretical Population Biology*. 2002, 61, č. 4. ISSN 0040-5809.

[17] FORTERRE, Patrick. Archaea: what can we learn from their sequences. Orsay (France): *Current Opinion in Genetics & Development*, 1997, č. 7. ISSN 0021-9193.

[18] FOURNIER, Gregory a Amanda DICK. Evolution of the archaea: emerging views on origins and phylogeny. Cambridge (USA): Department of Biological Engineering, 2010, č. 162. ISSN 0923-2508.

[19] FRIEND, Tim. *The third domain: the untold story of archaea and the future of biotechnology*. Washington DC: Joseph Henry Press, 2007, s 296. ISBN 9780309102377.

[20] GARRITY, George. *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. New York (USA): Springer, 2001, s. 1388. ISBN 0-387-98771-1.

[21] GUPTA, Radhey. Life's Third Domain (Archaea): An Established Fact or an Endangered Paradigm? *Theoretical Population Biology*. Ontario: Elsevier, 2002, č. 54, s. 91-104. ISSN 0040-5809.

[22] JACQUEMET, Alicia. Archaeal tetraether bipolar lipids: Structures, functions and applications. *Francie*: 2009, 91, 711-717. ISSN 0300-9084.

[23] JARRELL, Ken. Major players on the microbial stage: why archaea are important. *Microbiology*. Kingston (Canada): Department of Microbiology and Immunology, 2011, č. 157 (4). ISSN 1466-5034.

[24] KAI, Takami a Tatsuki NAGANO. Autotrophic growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* by oxidation of molecular hydrogen using a gas–liquid contactor. *Bioresource Technology*. Kagoshima (Japan): Department of Applied Chemistry and Chemical

Engineering, 2007, roč. 98, č. 2. ISSN 0960-8524.

[25] KOENIG, Amanda. *Acidithiobacillus thiooxidans*. Missouri (USA): Missouri university of science and technology, 2010. ISSN 0899-1561.

[26] KULTIVACE bakterií, TICHÝ, František. Bakteriologické půdy, podmínky inkubace, vznik a morfologie bakteriálních kolonií, růstové fáze, množení bakterií v tekutých médiích. Selektivní pomnožení a izolace bakterií. *Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*. ISSN 1214-4312

[27] LORS, Christine a DAMIDOD Denis. pH variations during growth of *Acidithiobacillus thiooxidans* in buffered media designed for an assay to evaluate concrete biodeterioration. Lille (France): *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2009, roč. 63, č. 7, s. 880-883. ISSN 0964-8305.

[28] MAKAROVA, Kira a KOONIN, Eugene. Comparative genomics of archaea: how much have we learned in six years, and what's next?. Bethesda (USA): *Genome biology*. 2003, č. 4. ISSN 1465-6906.

[29] MARGULIS, Lynn a CHAPMAN, Michael. *Kingdoms & domains: an illustrated guide to the phyla of life on Earth*. 4th ed. USA: Academic Press, 2009. S. 659. ISBN 0123736218.

[30] METODY stanovení koncentrace bakterií. CELER, Vladimír. Metody určování citlivosti a rezistence bakterií k antibiotikům, chemoterapeutikům a dezinfekčním prostředkům. Průkaz betalaktamáz. *Veterinární a farmaceutická univerzita Brno* Brno, 2006. ISSN 1803-3830

- [31] MUEBMAN, Marc. Thaumarchaeotes abundant in refinery nitrifying sludges express amoA but are not obligate autotrophic ammonia oxidizers. *PNAS*. Denmark: 2011, č. 108 (40). ISSN 16771-16776.
- [32] NOVÁKOVÁ, Adéla. *Antibakteriální účinek tavící soli HBS*. Zlín, 2006. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. ISSN 1214-4312.
- [33] OESTERHELT, Dieter. Chemotaxis and phototaxis of *Halobacterium salinarum*. Mnichov (Německo): Max Planck Institute of Biochemistry, 2011. ISSN 0170-4656.
- [34] OCEAN explorer. Washington DC (USA): *NOAA*. 2011. ISSN 0099-2240.
- [35] PACE, Norman. Molecular View of Microbial Diversity and the Biosphere. *Science*. Berkley (USA): University of California, 1997, roč. 276, č. 5313, s. 734-740. ISSN 00368075.
- [36] PEI, Anna. Diversity of 16S rRNA Genes within Individual Prokaryotic Genomes. *Applied and Environmental Microbiology*. New York: 2010, roč. 76, č. 12, s. 3886-3897. ISSN 0099-2240.
- [37] PELIKÁNOVÁ, Daniela. *Využití proteomické analýzy při výzkumu bakterie Acidithiobacillus ferrooxidans*. Brno. 2012. Bakalářská práce. Masarykova univerzita.
- [38] POSKEROVÁ, Lenka. *Sledování přenosu kyslíku u kultury bakterií acidithiobacillus ferrooxidans* Bakalářská práce. Brno, 2012. Bakalářská práce. Masarykova univerzita.
- [39] PRIEST, Fergus and AUSTIN, Brian. *Modern bacterial taxonomy*. 2nd ed. Great Britain: Chapman & Hall, 1993, ISBN 0-412-46120-x.

- [40] PURVES, William. *Preview this item ClosePreview this item. More like this Subjects.* Biology. Similar Items Life, the science of biology. Sunderland: *Sinauer Associates*, 1997. 5th. ISBN 9780716733256.
- [41] Růst bakteriální populace. *Wikipedia: the free encyclopedia*. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001.
- [42] SEDLÁČEK, Ivo, RNDr, CSc. *Taxonomie prokaryot*. 1. vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2007, s. 270. ISBN 80-210-4207-9.
- [43] SEDLÁŘOVÁ, Michaela. *Fylogeneze a systém Bakterií a Archaeobakterií*. Olomouc, 2007. ISSN 1803-537X.
- [44] SÉRIOVÉ ředění vzorku a přímé stanovení počtu živých bakterií. Brno: *Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*. 2006. ISSN 1214-4312.
- [45] SMÍŠEK, Jan. *Kultivace bakterií na pevných půdách*. Praha: Ústav lékařské mikrobiologie, 2009. ISSN 1802-1913.
- [46] VETERINÁRNÍ a Farmaceutická univerzita BRNO. *Růstová křivka bakteriální populace*. Brno, 2006. ISSN 1214-4312.
- [47] VOJTKOVÁ, Hana; JANDAČKA, Petr; KOLIČOVÁ, Petra; ŠIMKOVÁ, Lucie. Utilization of a magnetic field to study the activity of *Acidithiobacillus ferrooxidans* from mine water. *11th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2011 – volume II : 20. – 25. 6. 2011*. Bulgaria : Albena, 2011, p. 11–16. ISSN 1314-2704.

[48] WANG, Qiong. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. Michigan (USA): Appl Environ Microbiol , 2007, 73(16), s. 5261-7. ISSN 5261-5267.

[49] WILLIAM a WILKINS LIPPINCOTT. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Archaeobacteria, Cyanobacteria, and remaining Gram-negative Bacteria*. 1st Edition. Baltimore: John G. Holt, 1989. ISBN 0-683-07908-5.

[50] WOESE, Carl. *Current biology*. Illinois (USA): Cell Press, 2005, č. 15(4). ISSN 1979-2074.

8 Seznam obrázků

| | |
|---|----|
| <i>Obrázek 1: Rozdělení domén (Ocean explorer, 2011)</i> | 2 |
| <i>Obrázek 2: Fylogenetické rozdělení archaea (Wang, 2007)</i> | 3 |
| <i>Obrázek 3: Bičíky Halobacterium solinarum (Wikispaces, 2012)</i> | 6 |
| <i>Obrázek 4: Buňka archaei (Oesterhelt, 2011)</i> | 6 |
| <i>Obrázek 5: Horké vřídlo Yellowstone National Park (www.cs.wikipedia.org)</i> | 8 |
| <i>Obrázek 6: Mrtvé moře (www.dead-sea-cosmetics-shop.com)</i> | 8 |
| <i>Obrázek 7: zleva Thermoproteus tenax, Pyrobaculum aerophilum, Thermophilum pendens (převzato z http://neuf.fr)</i> | 12 |
| <i>Obrázek 8: zleva Pyrodictium abasii, Pyrolobus fumarii, Aeropyrum camini (převzato z http://neuf.fr, ijs.sgmjournals.org)</i> | 13 |
| <i>Obrázek 9: zleva Sulfolobus acidocaldarius, Acidianus, Metallosphaera sedula</i> | 13 |
| <i>Obrázek 10: Methanosphaera stadtmanae (převzato z http://microbewiki.kenyon.edu)</i> | 15 |
| <i>Obrázek 11: zleva Methanococcaceae, Methanocaldococcus jannaschii (převzato z www.lookfordiagnosis.com, http://bacmap.wishartlab.com)</i> | 15 |
| <i>Obrázek 12: zleva Methanogenium variaci, Methanosarcina barkeri fusaro (převzato z http://kaylabscientist5.blogspot.com, http://en.wikipedia.org)</i> | 16 |
| <i>Obrázek 13: Halorhabdus utahensis (převzato z http://standardsingenomics.org)</i> | 17 |
| <i>Obrázek 14: Thermoplasma volcanium (převzato z http://wishart.biology.ualberta.ca)</i> | 18 |
| <i>Obrázek 15: Thermococcus chitinophagus, Pyrococcus furiosus</i> | 18 |
| <i>Obrázek 16: zleva Archaeoglobus fulgidus, Methanopyrus kandleri</i> | 19 |
| <i>Obrázek 17: Nanoarchaeum (převzato z http://microbewiki.kenyon.edu)</i> | 19 |
| <i>Obrázek 18: Thaumarchaeota (převzato z www.pnas.org)</i> | 20 |
| <i>Obrázek 19: halofilní archaea (Dr.Nona, 2008)</i> | 22 |
| <i>Obrázek 20: Dr.Nona (Dr.Nona, 2008)</i> | 22 |
| <i>Obrázek 21: Laboratorní materiál</i> | 24 |

| | |
|--|----|
| <i>Obrázek 22: Autokláv (www.bmt.cz)</i> | 25 |
| <i>Obrázek 23: Médium 9K s Acidithiobacillus ferrooxidans</i> | 27 |
| <i>Obrázek 24: Médium 9K s Acidithiobacillus thiooxidans</i> | 27 |
| <i>Obrázek 25: Acidithiobacillus ferrooxidans (převzato z www2.brgm.fr)</i> | 30 |
| <i>Obrázek 26: Acidithiobacillus thiooxidans (převzato z http://geo.web.ru)</i> | 31 |
| <i>Obrázek 27: Postup sériového ředění vzorku (převzato z http://fvl.vfu.cz)</i> | 33 |
| <i>Obrázek 28: Kolonie Acidithiobacillus ferrooxidans</i> | 36 |
| <i>Obrázek 29: Kolonie Acidithiobacillus thiooxidans</i> | 37 |

9 Seznam tabulek

| | |
|---|----|
| <i>Tabulka 1: Základní rozdíly mezi Archaea, Bakterie a Ekaryota</i> | 5 |
| <i>Tabulka 2: Ředění vzorku</i> | 32 |
| <i>Tabulka 3: Počet buněk v mém vzorku odebraných v jednotlivých dnech v $10^6/ml$</i> | 35 |
| <i>Tabulka 4: Počet buněk v mém vzorku odebraných v jednotlivých dnech v $10^7/ml$</i> | 38 |

10 Seznam grafů

| | |
|--|----|
| <i>Graf 1: Růstová křivka Acidithiobacillus ferrooxidans během 28 dní</i> | 36 |
| <i>Graf 2: Růstová křivka Acidithiobacillus thiooxidans během 28 dní</i> | 39 |
| <i>Graf 3: Růstová křivka Acidithiobacillus ferrooxidans a thiooxidans</i> | 40 |