

Technická zpráva číslo 382/2019

---

**MIKROBIÁLNÍ SCREENING PVP  
BUKOV A DOLU ROŽNÁ –  
ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA  
PROJEKTU**

---

Autoři: Jana Steinová, Kateřina Burkartová  
a kolektiv

Technická univerzita v Liberci  
**Praha, únor 2019**

## Název projektu: Mikrobiální screening PVP Bukov a dolu Rožná

### Závěrečná zpráva projektu

Evidenční číslo objednatele: SO2017-101

Evidenční číslo poskytovatele: 17/8107/424

#### ŘEŠITELÉ:

Technická univerzita v Liberci<sup>1</sup>, CHEMCOMEX Praha, a.s.<sup>2</sup>, ÚJV Řež, a.s.<sup>3</sup>

**Autoři: Jana Steinová<sup>1</sup>, Kateřina Burkartová<sup>1</sup>**

Autorský kolektiv: Jiří Mikeš<sup>2</sup>, Milan Zuna<sup>3</sup>, Miroslav Černík<sup>1</sup>

Horní Indexy u jmen autorů odkazují na výčet institucí výše.

Schválil				
Funkce	Instituce	Jméno	Datum	Podpis
Osoba zhotovitele zodpovědná za technické řešení	TUL	Mgr. Jana Steinová, Ph.D.		
Osoba zhotovitele zodpovědná za koordinaci projektu	TUL	Prof. Dr. Ing. Miroslav Černík, CSc.		
Osoba objednatele zodpovědná za technické řešení	SÚRAO	Ing. Jan Smutek, Ph.D.		
Osoba objednatele zodpovědná za koordinaci projektu	SÚRAO	RNDr. Lukáš Vondrovic, Ph.D.		



## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Odběry vzorků podzemní vody a mikrobiálních nárůstů</b> .....	<b>10</b>
2.1	Metodika odběrů .....	10
2.2	Výsledky.....	14
<b>3</b>	<b>Vzorkovací systém pro mikrobiologické analýzy, jeho instalace a vzorkování</b> <b>15</b>	
3.1	Popis vzorkovacího systému .....	15
3.2	Instalace vzorkovacího systému a odběry vzorků pro mikrobiologické analýzy .....	18
3.3	Měření hydrochemických parametrů in-situ .....	19
3.3.1	Metodika .....	19
3.3.2	Výsledky.....	20
<b>4</b>	<b>Molekulárně biologické mikrobiologické analýzy</b> .....	<b>24</b>
4.1	Použité metody .....	24
4.2	Výsledky.....	25
4.2.1	Charakteristika metabolické diverzity mikrobiálních komunit v hlubinném úložišti 26	
4.2.2	Vývoj mikrobiální diverzity na PVP Bukov .....	32
4.2.3	Výsledky qPCR analýz .....	33
<b>5</b>	<b>Kultivační mikrobiologické analýzy</b> .....	<b>37</b>
5.1	Úvod .....	37
5.2	Materiály a metody.....	37
5.2.1	Zpracování vzorků.....	37
5.2.2	Kultivační analýza na agarových plotnách.....	38
5.2.3	Kultivace metanogenních mikroorganismů .....	40
5.2.4	Výsledky.....	40
5.2.5	Závěr.....	42
5.3	Srovnání výsledků kultivačních metod a molekulárních metod .....	43
<b>6</b>	<b>Ovlivnění mikrobiálních komunit antropogenní činností</b> .....	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>Návrh dalšího možného řešení mikrobiologického monitoringu</b> .....	<b>45</b>
<b>8</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>47</b>
<b>9</b>	<b>Citace a seznam literatury</b> .....	<b>48</b>

## Seznam obrázků:

Obr. 1 Použité vzorkovací potřeby: 1 – sterilní 500 ml láhev, 2 – sterilní zkumavka 50 ml, 3 – sterilní zkumavka 15 ml, 4 – Sterivex filtr, 5 – stříkačka 50 ml, 6 – jednorázová sterilní stěrka, 7 – sterilní sáček na uchovávání a převoz Sterivex filtrů.....	11
Obr. 2 Filtrování vody filtrem Sterivex.....	12
Obr. 3 Odběr mikrobiálních matů do sterilních zkumavek (tzv. falkon).....	13
Obr. 4 Odběr mikrobiálních nárůstů pomocí jednorázových sterilních stěrek .....	14
Obr. 5 Znázornění kompletního systému pro odběr mikrobiologických vzorků z podzemních vod. A: Popis použitých komponent: 1) Nerezový mechanický obturátor, 2) PTFE hadička (Ø 10 mm), 3) trojcestný ventil, 4) manometr/čidlo tlaku, 5) držák filtru (Sartorius) 6) přechodová nádoba Fisher (objem 2 litry) 7) kulový ventil 8) membránové vakuové čerpadlo 9) měnič napětí 12/220V 10) baterie 12V. B: Fotografie odběrového systému při odběru vzorku z vrtu S-22	16
Obr. 6 Znázornění kompletního systému pro odběr mikrobiologických vzorků z podzemních vod – alternativa 2 využívající zásobník s podtlakem. A: Popis použitých komponent: 1) Nerezový mechanický obturátor, 2) PTFE hadička (Ø 10 mm), 3) držák filtru (Sartorius), 4) přechodová nádoba Fisher (objem 2 litry), 5) kulový ventil, 6) tlaková nádoba s podtlakem. B: Fotografie odběrového systému při odběru vzorku z vrtu S-26. ....	16
Obr. 7 Připojení vzorkovače PTFE hadičkami .....	17
Obr. 8 Duraporové filtry pro zachycení biomasy .....	17
Obr. 9 Vrt S-22 utěsněný pomocí mechanického obturátoru s výtokem vyvedeným ca. 1 m nad ústím vrtu (ustalování podmínek) .....	19
Obr. 10 Měření základních hydrochemických parametrů (teplota, pH, ORP, O <sub>2</sub> ) v průtočné cele .....	20
Obr. 11 Záznam hydrochemických parametrů (pH, Eh, T, O <sub>2</sub> ) měřených v průtočné cele (vrt S-22) .....	21
Obr. 12 Záznam hydrochemických parametrů (pH, Eh, T, O <sub>2</sub> ) měřených v průtočné cele (vrt S-23) .....	21
Obr. 13 Záznam hydrochemických parametrů (pH, Eh, T, O <sub>2</sub> ) měřených v průtočné cele (vrt S-24) .....	22
Obr. 14 Záznam hydrochemických parametrů (pH, Eh, T, O <sub>2</sub> ) měřených v průtočné cele (vrt S-25) .....	22
Obr. 15 Záznam hydrochemických parametrů (pH, Eh, T, O <sub>2</sub> ) měřených v průtočné cele (vrt S-26).....	23
Obr. 16 Mikrobiální diverzita vod a mikrobiálních matů na PVP Bukov. Mikrobiální diverzita je znázorněna pomocí grafu PCA analýzy v programu Canoco. Jednotlivé symboly představují jednotlivé vzorky. Obsahem vzorků jsou nejhojnější OTU. Čím jsou si vzorky v grafu blíže, tím podobnější je jejich mikrobiální složení. Vzorky ze stejného vrtu/vývěru jsou označeny stejnou barvou a jménem místa. Kolečko – odběr vody v říjnu, trojúhelník – odběr vody v listopadu, čtverec – odběr vody v lednu, hvězda – odběr mikrobiálního matu v říjnu. ....	32
Obr. 17 Sada základních kultivačních médií: plate count agar (a), R1A (b), FWA-FeIII (c), API (d), agar pro methanogeny (e) a DSMZ medium 35 (f) .....	38
Obr. 18 Příklad kultivovaných mikroorganismů, vlevo IRB, vpravo SOB ze vzorku BK 30 ..	42

Obr. 19 Pozitivní reakce při kultivaci metanogenních mikroorganismů .....	42
---	----


## Seznam tabulek:

Tab. 1 Hodnoty průtoků v monitorovacích vrtech.....	18
Tab. 2 Seznam použitých qPCR primerů.....	25
Tab. 3 Vývoj obsahu síru oxidujících mikroorganismů ve vrtu S-24. Zobrazeny jsou pouze nejhojněji zastoupené OTU. Čísla uvedená pod jednotlivými vzorky značí množství detekovaných OTU zjištěných v daném vzorku, barevná škála značí množství daného OTU ve vzorku (pokles v řadě červená – žlutá – zelená).....	27
Tab. 4 Vývoj obsahu síru oxidujících mikroorganismů ve vrtu S-25. Zobrazeny jsou pouze nejhojněji zastoupené OTU. Čísla uvedená pod jednotlivými vzorky značí množství detekovaných OTU zjištěných v daném vzorku, barevná škála značí množství daného OTU ve vzorku (pokles v řadě červená – žlutá – zelená).....	28
Tab. 5 Vývoj obsahu síru oxidujících mikroorganismů ve vrtu S-26. Zobrazeny jsou pouze nejhojněji zastoupené OTU. Čísla uvedená pod jednotlivými vzorky značí množství detekovaných OTU zjištěných v daném vzorku, barevná škála značí množství daného OTU ve vzorku (pokles v řadě červená – žlutá – zelená).....	28
Tab. 6 Výsledky qPCR analýz. SRB: síran redukující bakterie, NRB: denitrifikační bakterie, PV: pasivní vzorkovač, +++: bakterie dané skupiny abundantní, ++: střední množství bakterií dané skupiny, +: malé množství bakterií dané skupiny, -: bakterie dané skupiny nedetekovány. ....	33
Tab. 7 Přehled zpracování vzorků .....	37
Tab. 8 Použité ztužené kultivační půdy .....	39
Tab. 9 Výsledky mikrobiologických analýz v cfu na mL (TČK – technicky čistá kultura).....	40

## Seznam příloh:


Příloha 1: Seznam vzorků „Priloha1\_seznam\_vzorku.xlsx“

Příloha 2: Seznam dominantních OTU „Priloha2\_dominantníOTU.xlsx“

 <b>SÚRAO</b>	Mikrobiální screening PVP Bukov a dolu Rožná: Závěrečná zpráva projektu	Evidenční označení:
		382/2019

### Seznam použitých zkratk:

APS	adenosin 5' fosfosulfát (adenosine 5'-phosphosulfate)
CFU	kolonie tvořící jednotky (colony forming units)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
HÚ	hlubinné úložiště
IRB	železo-redukující bakterie (iron-reducing bacteria)
NGS	sekvenace nové generace (next generation sequencing)
NIR	dusitanová reductáza (nitrite reductase)
NRB	dusičnan redukující bakterie (nitrate reducing bacteria)
OTU	operační taxonomická jednotka (operational taxonomic unit)
PCA	analýza hlavních komponent (principal component analysis)
PTFE	polytetrafluorethylen (teflon)
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce (quantitative polymerase chain reaction)
SOB	síru oxidující bakterie (sulphur-oxidizing bacteria)
SRB	síran redukující bakterie (sulfate reducing bacteria)
TAE	terminální akceptor elektronů
TČK	technicky čistá kultura
TTC	trifenyltetrazoliumchlorid
TUL	Technická univerzita v Liberci

 <b>SÚRAO</b>	Mikrobiální screening PVP Bukov a dolu Rožná: Závěrečná zpráva projektu	Evidenční označení:
		382/2019

## Abstrakt

Cílem této zprávy je shrnout výsledky mikrobiologického průzkumu v oblasti PVP Bukov a dolu Rožná. Analyzovány byly vzorky vod a mikrobiálních nárůstů z oblasti 12. a 24. patra. Pro stanovení mikrobiální diverzity byly použity především molekulárně biologické metody (konkrétně ampikonová sekvenace oblasti 16S rRNA a qPCR) a jako doplněk pro část vzorků i kultivační postupy. Celkem bylo odebráno 122 vzorků pro molekulárně-biologické postupy a 7 vzorků pro kultivační analýzy. Důraz byl kladen na zachycení funkční diverzity mikrobiálních společenstev.


Výsledky mikrobiologických analýz prokázaly, že mikrobiologická diverzita ve studovaném území je silně ovlivněná aerobním prostředím důlních chodeb. Obligátně anaerobní mikroorganismy byly zjištěny pouze v omezeném množství. Mezi nejhojněji zastoupené funkční skupiny patří mikroorganismy schopné oxidovat organické látky, sloučeniny železa a síry. Až na vzácné výjimky je mikrobiální diverzita v jednotlivých vrtech poměrně stabilní v čase. Výsledky kultivačních analýz v zásadě odpovídají výsledkům molekulárně-biologických analýz.

Pro spolehlivější výsledky mikrobiologických analýz byl vyvinut vzorkovací systém z uzavřených vrtů. Hlavní součástí tohoto systému je pasivní vzorkovač sloužící k zachycení mikrobiální biomasy v podzemní vodě. Tento vzorkovací systém minimalizuje vliv aerobního prostředí důlních chodeb a eliminuje tak vliv antropogenních zásahů na lokalitě. Je vhodný pro dlouhodobý monitoring mikrobiologických změn. Na vrtech, kde byl umístěn vzorkovací systém, proběhla i hydrochemická in-situ měření.

Na základě výsledků tohoto mikrobiologického průzkumu byla navržena doporučení pro budoucí aktivity zahrnující mikrobiologické analýzy.

## Klíčová slova

*Mikroorganismy, mikrobiální nárůsty, pasivní vzorkovač, podzemní voda, PVP Bukov*

 <b>SÚRAO</b>	Mikrobiální screening PVP Bukov a dolu Rožná: Závěrečná zpráva projektu	Evidenční označení:
		382/2019

## Abstract

The aim of this report is to summarize the results of the microbiological screening in the area of the Bukov URF and the Rožná mine. The groundwater samples as well as the samples of microbial mats collected on the 12<sup>th</sup> and 24<sup>th</sup> level were analysed. Molecular-biological methods (specifically, amplicon sequencing of 16S rRNA and qPCR) accompanied with cultivation techniques (for part of the samples) were used in order to determine the microbial diversity. Altogether 122 samples and 7 samples were collected for the molecular-biological and cultivation analyses, respectively. The emphasis was given to the evaluation of the functional diversity of the microbial communities.

The results of the microbiological analyses proved, that the microbial diversity at the study area is strongly influenced by the aerobic environment of the mine workings. Obligatory anaerobic microorganisms were detected only in limited abundancies. Microorganisms capable of organic, iron and sulphur compounds oxidation were found to be the most common functional groups. The microbial diversity in studied boreholes is relatively stable in time (with rare exceptions). The results of cultivation analyses basically correspond to the results of molecular-biological analyses.


The sampling system for the water samples from the closed boreholes has been constructed in order to obtain more reliable results of the microbiological analyses. A passive sampler for capturing microbial biomass present in the groundwater represents the principal component of this system. This sampling system minimalizes the effect of the aerobic environment of the mine workings and eliminates the effect of the anthropogenic activities at the study site. It is suitable for the long-term monitoring of microbiological changes. The boreholes, where the passive samplers were installed, were monitored for hydrochemical parameters.

Recommendations for the future activities that include microbiological analyses have been proposed, based on the results of this microbiological survey.

## Keywords

*Microorganisms, microbial mats, passive sampler, groundwater, URF Bukov*



 <b>SÚRAO</b>	Mikrobiální screening PVP Bukov a dolu Rožná: Závěrečná zpráva projektu	Evidenční označení:
		382/2019


## 1 Úvod

Etapa 2 tohoto projektu navazuje na přípravné práce provedené v rámci Etapy 1 (Steinová et al. 2018), ve které šlo o rekognoskaci a prvotní vzorkování přístupných prostor PVP Bukov a dolu Rožná a dále k vyhotovení a instalaci pasivního vzorkovače sloužícího k zachycení mikrobiální biomasy v podzemní vodě.

V předložené závěrečné zprávě jsou shrnuty všechny získané výsledky mikrobiologického screeningu PVP Bukov a dolu Rožná. Hlavním cílem tohoto projektu (dle zadání) bylo popsat mikrobiální osídlení horninového prostředí PVP Bukov a dolu Rožná s předpokládaným využitím získaných dat pro řadu návazných experimentů zaměřených na studium odolnosti inženýrských bariér. Dalším cílem bylo odlišit přirozená a antropogenně ovlivněná společenstva.

V rámci Etapy 2 byly opakovaně odebrány všechny dostupné zdroje podzemní vody na PVP Bukov vhodné pro pravidelný monitoring. V dalších částech dolu byly opakovaně odebírány vzorky z vrtů S-22, S-23, S-24, S-25 a S-26 (všechny na 12. patře). U těchto vrtů bylo využito vzorkování pomocí pasivního vzorkovače.

Všechny získané vzorky byly podrobeny molekulárně-biologickým mikrobiologickým analýzám (konkrétně amplikonová sekvenace oblasti 16S rRNA a kvantitativní PCR), část vzorků byla analyzována taktéž pomocí kultivačních postupů. Hlavním výstupem provedených analýz je stanovení funkčního profilu mikrobiálních společenstev vyskytujících se ve studovaném území. Dále bude předložená zpráva sloužit jako podklad pro návrh dalších aktivit, ve kterých budou hodnoceny mikrobiologické poměry v oblasti PVP Bukov a dolu Rožná.

 <b>SÚRAO</b>	Mikrobiální screening PVP Bukov a dolu Rožná: Závěrečná zpráva projektu	Evidenční označení:
		382/2019

## 2 Odběry vzorků podzemní vody a mikrobiálních nárůstů

Odběry vzorků v dole Rožná a na PVP Bukov probíhaly v období od května 2018 do ledna 2019. Vzorky vhodné k odebrání a pravidelnému monitoringu byly zvoleny na základě předcházející rekognoskace.

Všechny vzorky byly odebírány s ohledem na to, aby zachytily co nejširší spektrum mikroorganismů rostoucích v hlubinném dole a aby pokud možno zachytily mikrobiální komunity rostoucí v prostředí bez antropogenních zásahů (připomínající stav uzavřeného hlubinného úložiště).

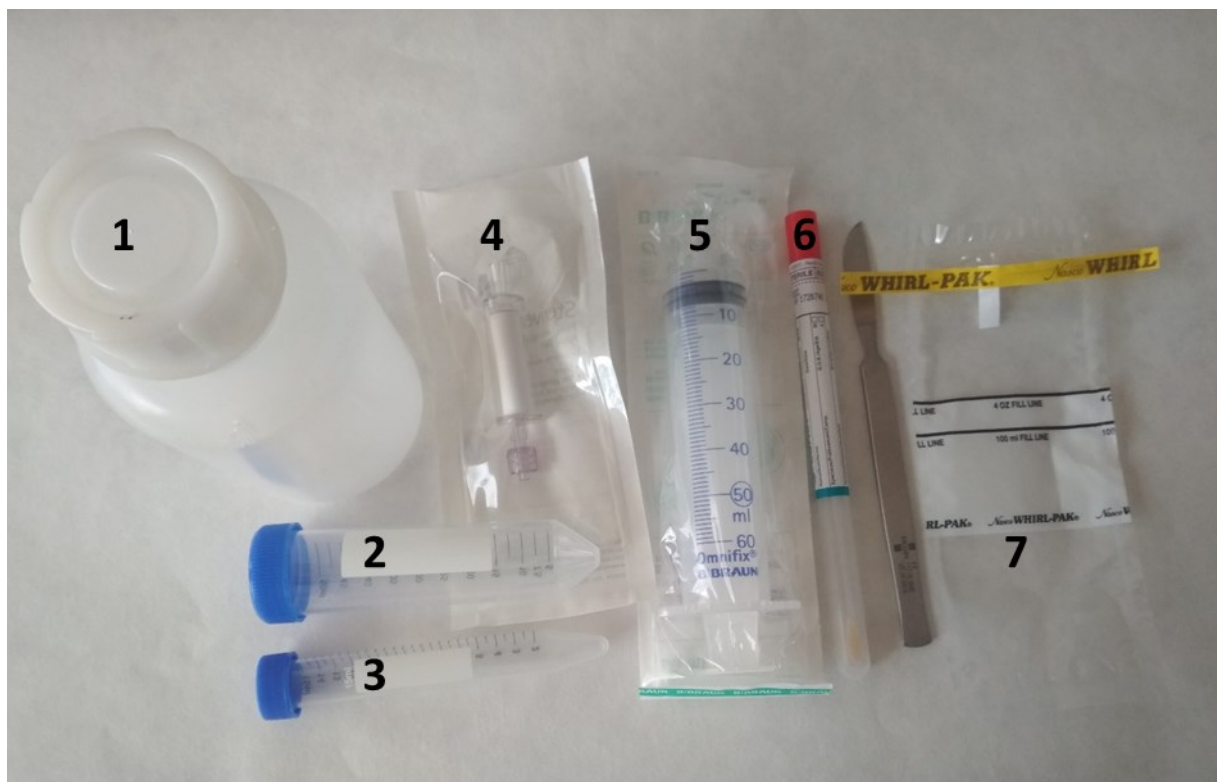
### 2.1 Metodika odběrů

Metodiku odběru vzorků na analýzu mikrobiální DNA v dole Rožná lze rozdělit do dvou skupin podle charakteru vzorkovaného materiálu.

První skupinu tvoří vzorky podzemních vod. Podzemní vody byly získány jednak z výtoků z vrtů v důlních chodbách nebo z úkapů z přirozených geologických poruch. Voda byla odebírána za použití jednorázových sterilních rukavic a sterilních odběrových nádob a filtrů. Pokud bylo množství vytékající vody dostatečné, byla voda nasávána přímo z místa výtoku sterilní jednorázovou 50 ml stříkačkou Omnifix (BBraun, Švýcarsko). Pokud byl charakter výtoku pro tento postup nevhodný, byla voda nabrána nejprve do sterilní 0,5 l láhve a až poté nasáta stříkačkou a filtrována. V případě, že byl v místě odběru instalován překlopný člunkový průtokoměr (většina výtoků na PVP Bukov) a nebylo proti proudu dost prostoru na odběr, byla voda odebrána 50 ml stříkačkou přímo ze člunku. Pokud bylo v místě vrtu instalováno potrubí s kohoutem, byla po dobu minimálně tří minut odpuštěna voda stojící v potrubí a až následně byla odebrána voda do sterilní PET láhve. Získaná voda (podle průtoku jednotlivých vrtů cca 500 – 1000 ml) byla na místě (nebo na povrchu cca o 4h později) přefiltrována sterilními filtry Sterivex (Millipore, Německo) (Obr. 1). Filtry Sterivex zachycují buňky mikroorganismů přítomné ve vodě a umožňují jednoduchou manipulaci při přepravě i následné izolaci DNA, omezují také možnou kontaminaci nežádoucími mikroorganismy, což je při odběru vod s malou koncentrací mikroorganismů (typicky podzemní vody) důležitá výhoda. Filtry Sterivex se zachycenými mikroorganismy byly uloženy do sterilních sáčků, dále byly před přepravou na TUL zmrazeny a poté v chladničce s chladicími bločky převezeny na TUL do mrazáku s teplotou -80 °C, kde byly uloženy pro následnou izolaci DNA. Další typ odběru představuje odběr vzorku podzemní vody pomocí pasivního vzorkovače instalovaného přímo v konkrétních vrtech. Tento typ odběru je popsán v následující kapitole (kapitola 3).

Druhý typ odběrů představují stěry a seškraby pevné fáze. Tento typ odběrů se týká míst s očividnou mikrobiální aktivitou v důlních chodbách, za jakou lze považovat jemné mikrobiální maty na výtocích z vrtů, mohutné, různě zbarvené streamery s minerální fází na puklinách nebo v ústích vrtů, rosolovité slizké útvary někdy vytékající jako „pevný vodopád“ a dosahující objemu až stovek mililitrů, květákovité měkké organické útvary (většinou nápadně oranžové) vykvétající na některých místech v počvě, kde se drží voda. Tyto vzorky s pevnou fází byly odebrány za použití jednorázových sterilních rukavic do sterilních zkumavek o objemu 50 ml nebo 15 ml (tzv. falkony, Obr. 3), v případě nutnosti za pomoci jednorázových sterilních stěrek (Obr. 4) nebo skalpelu, který byl před každým odběrem sterilizován nad plamenem. Vzorky s pevnou fází byly rovněž před přepravou na TUL zmrazeny a poté v chladničce s chladicími bločky převezeny na TUL do mrazáku s teplotou -80 °C, kde byly uloženy pro následnou izolaci DNA. Vzorkovací potřeby používané k odběru vzorků jsou znázorněny na Obr. 1.

Podrobnější popis odběru a charakterizace odběrových míst je uvedena v tabulce vzorků (viz tabulka vzorků).



Obr. 1 Použité vzorkovací potřeby: 1 – sterilní 500 ml láhev, 2 – sterilní zkumavka 50 ml, 3 – sterilní zkumavka 15 ml, 4 – Sterivex filtr, 5 – stříkačka 50 ml, 6 – jednorázová sterilní stěrka, 7 – sterilní sáček na uchování a převoz Sterivex filtrů



Obr. 2 Filtrování vody filtrem Sterivex




Obr. 3 Odběr mikrobiálních matů do sterilních zkumavek (tzv. falkon)



Obr. 4 Odběr mikrobiálních nárůstů pomocí jednorázových sterilních stěrek

## 2.2 Výsledky

Celkem bylo odebráno 122 vzorků podzemních vod a mikrobiálních matů v dole Rožná. 98 vzorků bylo odebráno na 12. patře a 24 vzorků na 24. patře. Na 24. patře jsou výtoky z vrtů a puklin málo vydatné pro odběr vod, a proto převažují odběry mikrobiálních matů (mikrobiální maty – 22 vzorků, voda – 2 vzorky). Na 12. patře je naopak vody dostatek – bylo zde odebráno 64 vzorků vody přefiltrovaných filtrem Sterivex, 5 vzorků vody odebraných pomocí pasivního vzorkovače a 29 vzorků mikrobiálních matů. Seznam vzorků je uveden v Příloze 1.

 <b>SÚRAO</b>	Mikrobiální screening PVP Bukov a dolu Rožná: Závěrečná zpráva projektu	Evidenční označení:
		382/2019

### 3 Vzorkovací systém pro mikrobiologické analýzy, jeho instalace a vzorkování

Vzorkovací systém vychází z pasivního vzorkovače navrženého v průběhu Etapy 1 (Steinová et al. 2018). Systém byl v několika ohledech vylepšen. Současná verze je plně sterilizovatelná, lehce instalovatelná a snadno modifikovatelná.

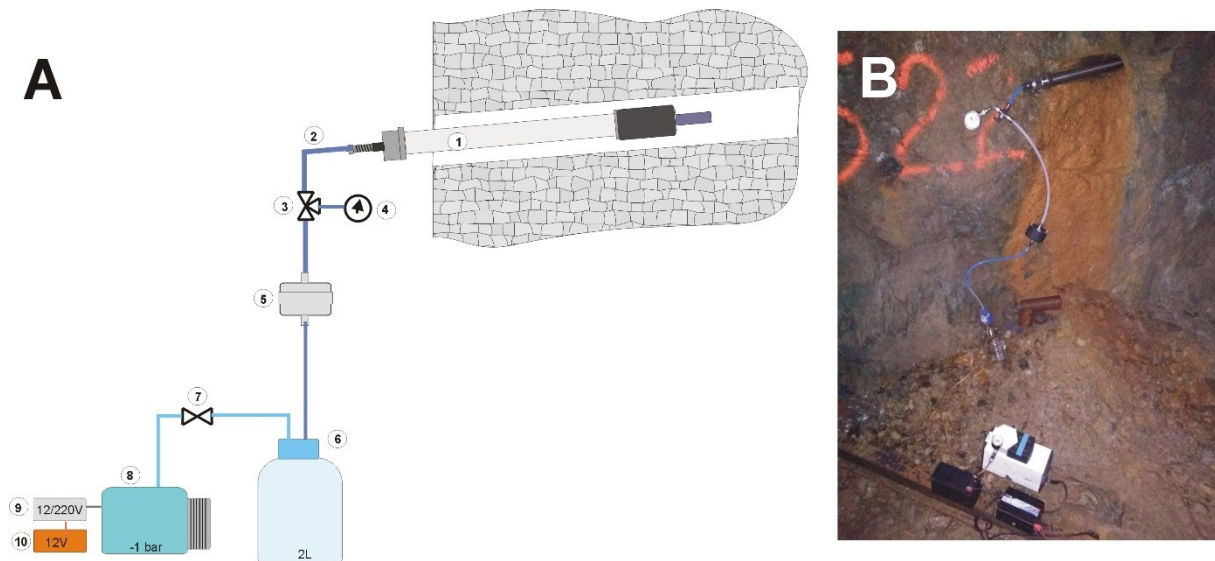
Obdobná zařízení se osazují na výstup z vrtů s výraznějšími výtoky podzemní vody a umožňují zadržet v této vodě se vyskytující mikroorganismy. Při jejich používání je umožněno zachycení nativního druhového spektra mikroorganismů přítomných v anaerobních podzemních vodách (které bude pro budoucí dlouhodobý vývoj hlubinného úložiště určující). Dále umožňují zachytit větší množství biomasy, minimalizovat vliv aerobního prostředí tunelu/budovaného úložiště a eliminovat vliv současných antropogenních zásahů na lokalitě.

#### 3.1 Popis vzorkovacího systému

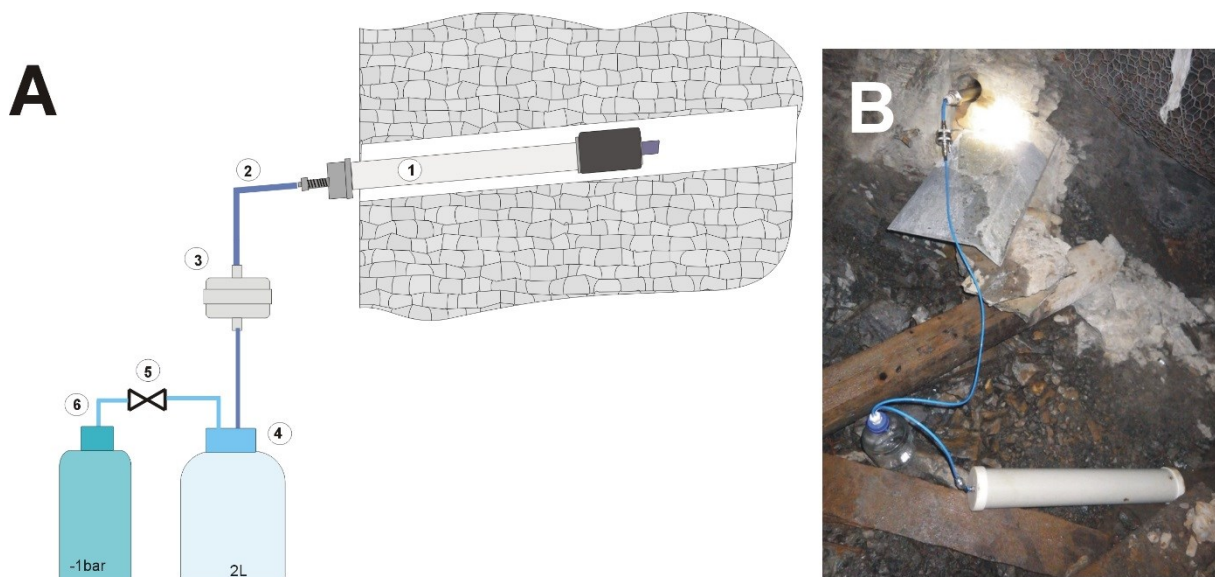
Pro odběr vzorků mikrobiálních společenstev byl sestaven odběrový systém (Obr. 5). Při sestavování byl kladen důraz na možnost sterilizace jednotlivých částí pasivního vzorkovače, tj. přívodních hadiček a držáku filtru především s ohledem na minimalizaci možné kontaminace vzorků. Současně bylo nutné vyřešit filtraci bez přístupu vzduchu (za anaerobních podmínek) a minimalizaci kontaktu podzemní vody ve vrtech se vzdušným O<sub>2</sub>. Vzhledem k nízkému tlaku v monitorovacích vrtech neumožňujícím dostatečně rychlou samovolnou filtraci byl pasivní vzorkovač doplněn o další komponenty, které filtraci podzemní vody urychlují. Vzorkování je založeno na principu filtrace za sníženého tlaku.

Pro utěsnění vrtu byl použit nerezový mechanický obturátor o délce 1 m s těsnicí částí o délce 150 mm/průměr 74 mm. Na ústí obturátoru byla nainstalována rychlospojka pro připojení PTFE hadičky o průměru 10 mm, pomocí které byl připojen pasivní vzorkovač (Obr. 7).

Průměr hadičky 10 mm byl zvolen s ohledem na změřené výtoky z vrtů, aby nedocházelo k „zaškrcování“ průtoku. Pro vrty s nižším průtokem byla využita PTFE hadička o průměru 6 mm. Pro záchyt mikrobiologických společenstev byl využit duraporový filtr o průměru 47 mm a porozitě 0,22 μm (Merck, Německo) (Obr. 8) instalovaný do průtočného nerezového držáku filtru (Sartorius, Německo), který umožňuje sterilizaci a filtraci až do tlaku 20 bar. Záchyt filtrátu a vytvoření stabilního podtlaku bylo řešeno pomocí přechodové nádoby (Fisher, Německo, 2 litry). Podtlak byl vytvořen pomocí membránového vakuového čerpadla LABOPORT® (průtok 10 l/min, P<sub>max</sub> = 8 mbar (abs)). Vzhledem k omezenému připojení k rozvodům 220V v podzemních prostorách bylo napájení vakuového čerpadla zajištěno pomocí baterie 12V/20Ah a následným převodníkem napětí 12/220V, 550W. Aby bylo možné provádět odběr vzorků z více vrtů současně, byly následně využity tlakové lahve s podtlakem (zásobník 13 litrů) (Obr. 6). Celý systém je řešen pomocí rychlospojek (Ni-Cr), které je možné tepelně sterilizovat (až do teploty 200°C) a zároveň umožňují variabilitu a snadnou modifikaci celého systému.



Obr. 5 Znáznornění kompletního systému pro odběr mikrobiologických vzorků z podzemních vod. A: Popis použitých komponent: 1) Nerezový mechanický obturátor, 2) PTFE hadička (Ø 10 mm), 3) trojcestný ventil, 4) manometr/čidlo tlaku, 5) držák filtru (Sartorius) 6) přechodová nádoba Fisher (objem 2 litry) 7) kulový ventil 8) membránové vakuové čerpadlo 9) měnič napětí 12/220V 10) baterie 12V. B: Fotografie odběrového systému při odběru vzorku z vrtu S-22



Obr. 6 Znáznornění kompletního systému pro odběr mikrobiologických vzorků z podzemních vod – alternativa 2 využívající zásobník s podtlakem. A: Popis použitých komponent: 1) Nerezový mechanický obturátor, 2) PTFE hadička (Ø 10 mm), 3) držák filtru (Sartorius), 4) přechodová nádoba Fisher (objem 2 litry), 5) kulový ventil, 6) tlaková nádoba s podtlakem. B: Fotografie odběrového systému při odběru vzorku z vrtu S-26.






Obr. 7 Připojení vzorkovače PTFE hadičkami



Obr. 8 Duraporové filtry pro zachycení biomasy

 <b>SÚRAO</b>	Mikrobiální screening PVP Bukov a dolu Rožná: Závěrečná zpráva projektu	Evidenční označení:
		382/2019

### 3.2 Instalace vzorkovacího systému a odběry vzorků pro mikrobiologické analýzy

Před instalací pakrů do jednotlivých vrtů byly změřeny výtoky z vrtů. Po zkušebním nainstalování nerezového pakru byl uzavřen kohout na ústí vrtu a po ustálení podmínek proběhlo měření hodnot průtoků z vrtu (Tab. 1) a orientační měření hodnot tlaku. Na základě výsledků byl navržen finální odběrový systém. Hodnoty tlaků byly neměřitelné či velmi nízké (vrty S23, S25), proto byl pasivní vzorkovač doplněn o součásti zajišťující filtraci za sníženého tlaku. Pro pasivní filtraci je vzhledem k odporu filtru potřebný tlak min 0,8 bar.

Tab. 1 Hodnoty průtoků v monitorovacích vrtech

Vrt	Datum	Průtok (l/min)	Pozn.
S-23	15. 11. 2018	0,777	Před instalací pakru
S-23	15. 11. 2018	1,429	Po instalaci pakru
S-26	15. 11. 2018	0,577	Před instalací pakru
S-26	15. 11. 2018	1,872	Po instalaci pakru
S-25	29. 11. 2018	0,641	Před instalací pakru
S-22	29. 11. 2018	Nízký (neměřitelný)	Před instalací pakru
S-24	29. 11. 2018	Nízký (neměřitelný)	Před instalací pakru
S-24	9. 1. 2019	1,205	Po ustalování (5 týdnů)
S-22	9. 1. 2019	0,031	Po ustalování (5 týdnů)
S-25	9. 1. 2019	0,603	Po ustalování (5 týdnů)
S-26	9. 1. 2019	1,695	Po ustalování (7 týdnů)
S-23	9. 1. 2019	1,304	Po ustalování (7 týdnů)

Pakry byly s předstihem nainstalovány do monitorovacích vrtů. Vrty S-23 a S-26 byly osazeny pakry 15. 11. 2018, vrty S-22, S-24 a S25 byly osazeny dne 29. 11. 2018. Pro přirozené ustálení hydrochemických a mikrobiologických podmínek ve vrtech byly vrty ponechány po dobu více než 5 týdnů utěsněné s přirozeným výtokem (Tab. 1). V případě vrtu S-22 byla úroveň hladiny vyvedena cca 1 m nad ústím vrtu pro důkladné odvětrání vrtů a zajištění, pokud možno anaerobních podmínek dne 29. 11. 2018, u ostatních vrtů se tomu tak stalo 9. 1. 2019.



*Obr. 9 Vrt S-22 utěsněný pomocí mechanického obturátoru s výtokem vyvedeným ca. 1 m nad ústím vrtu (ustalování podmínek)*

Duraporový filtr o průměru 47 mm s velikostí pórů 0,22  $\mu\text{m}$  (Merck, Německo) byl s předstihem v laboratoři za sterilních podmínek nainstalován do sterilizovaného držáku filtrů (Sartorius, Německo). Sterilizace držáku filtru společně s PTFE hadičkami probíhala pomocí autoklávování. Po převozu do podzemních prostor byla nejprve připojena sterilizovaná PTFE hadička do pakru a proplachována podzemní vodou z vrtu. Následně byl připojen pasivní vzorkovač na systém vakuové filtrace. U všech vrtů mimo vrt S-22 bylo možné v omezené míře filtrovat vodu pomocí tlaku ve vrtu bez nutnosti vytvoření podtlaku, avšak ve většině případů byla filtrace velmi pomalá.

Po připojení filtrační cely byl vytvořen podtlak a přefiltrována voda o objemu v rozmezí 1 – 3 litrů vody přes filtr. Následně byla filtrační cela i s filtrem odpojena, umístěna do sterilního PE obalu a v transportní ledničce převezena na TUL do molekulárně-biologické laboratoře pro analýzu zachycené biomasy. Filtry byly z držáků vyjmuty za sterilních podmínek v laboratoři a následně byly zamrazeny do dalšího zpracování. Zachycený filtrát je možné využít pro hydrochemickou analýzu.

### **3.3 Měření hydrochemických parametrů in-situ**

#### **3.3.1 Metodika**

Pro sledování ustálených hydrochemických podmínek bylo provedeno měření základních hydrochemických parametrů (teplota, pH, Eh, O<sub>2</sub>; viz Obr. 11 – Obr. 15). Po odběrech mikrobiologických vzorků byla připojena průtočná cela, která umožňuje měření v průtoku bez

přístupu vzduchu (Obr. 10). Po připojení byla cela důkladně propláchnuta podzemním vodou a zahájen záznam měřených hodnot.

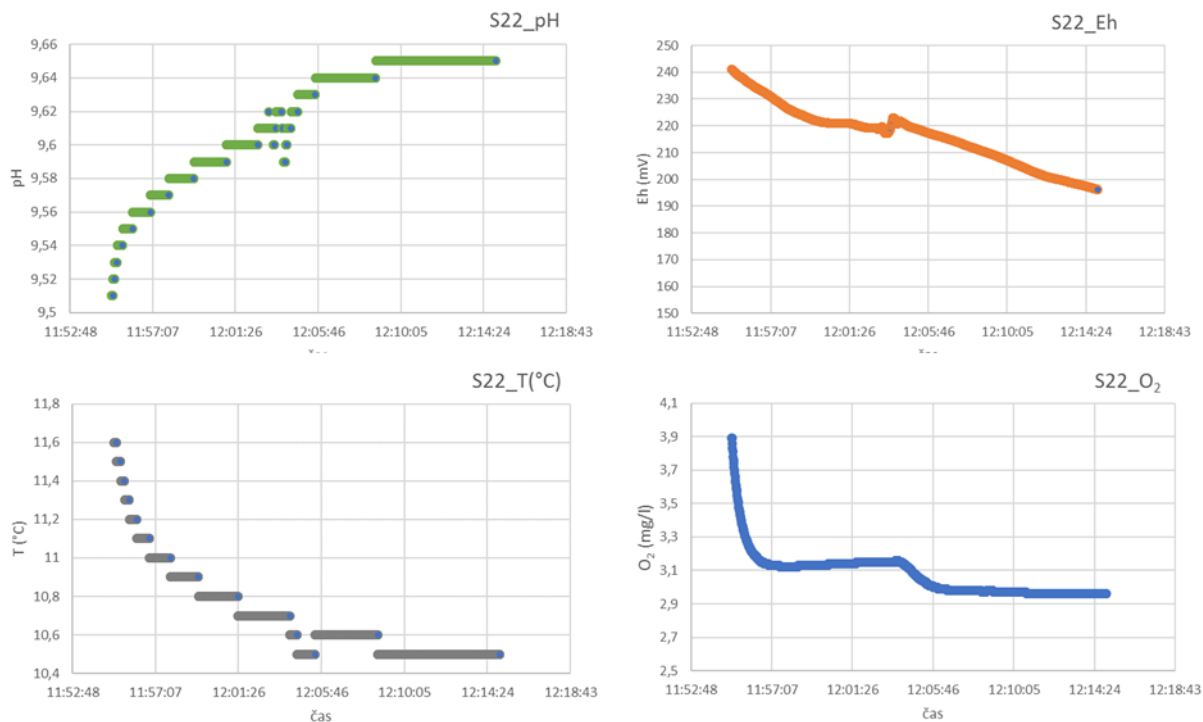


Obr. 10 Měření základních hydrochemických parametrů (teplota, pH, ORP, O<sub>2</sub>) v průtočné cele

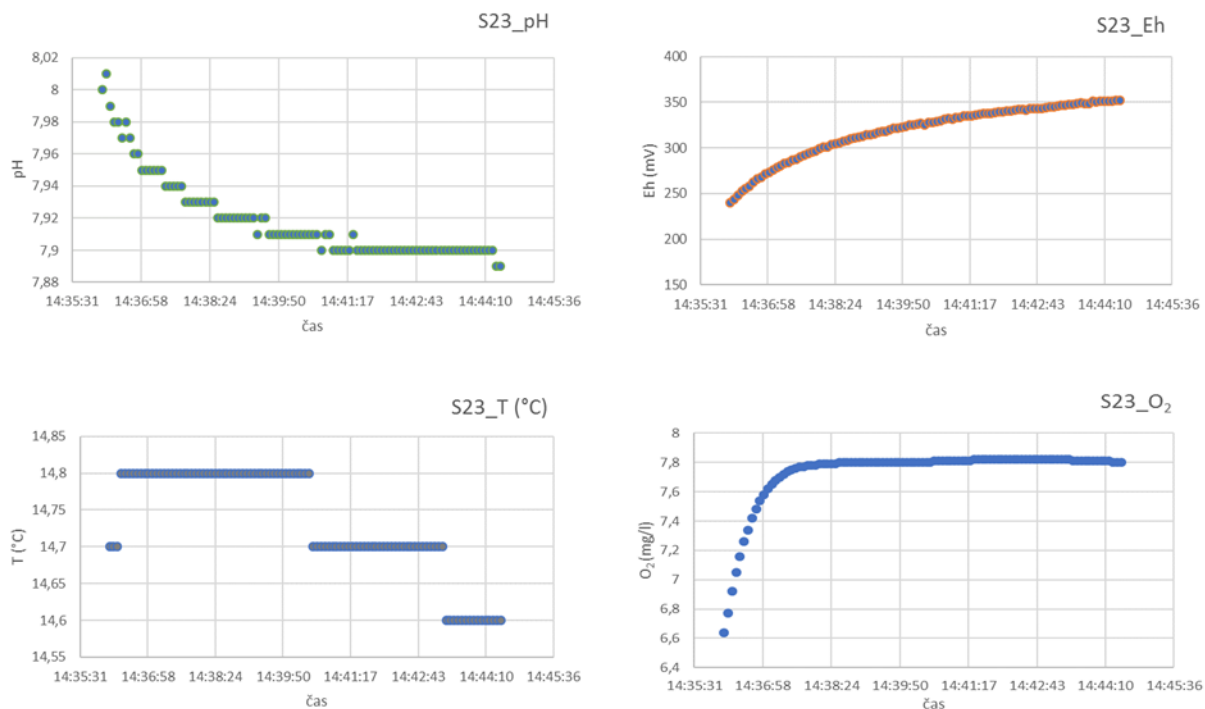
Měření byla prováděna pomocí přístroje WTW 3630IDS s použitými sondami ORP: WTW ORP T\_900P, pH: WTW SenTix94X\_P, vodivost: WTW TetraCon925\_P, O<sub>2</sub>: WTW FDO925\_P a bezdrátovým přenosem dat IDS WLM. Elektrody byly před měřením nakalibrovány pomocí standardů NIST WTW pH 4.01, 7.00 a pH 10.01; WTW E-SET Trace 0,01 N KCl. Kontrola nulového bodu sondy O<sub>2</sub> byla provedena v roztoku siřičitanu sodného podle DIN EN 25814/ISO 5814. Kalibrace ORP sondy byla proveden na standart WTW RH28. Hodnoty ORP byly přepočteny na vodíkovou elektrodu ( $U_{ref} / +214$  mV).

### 3.3.2 Výsledky

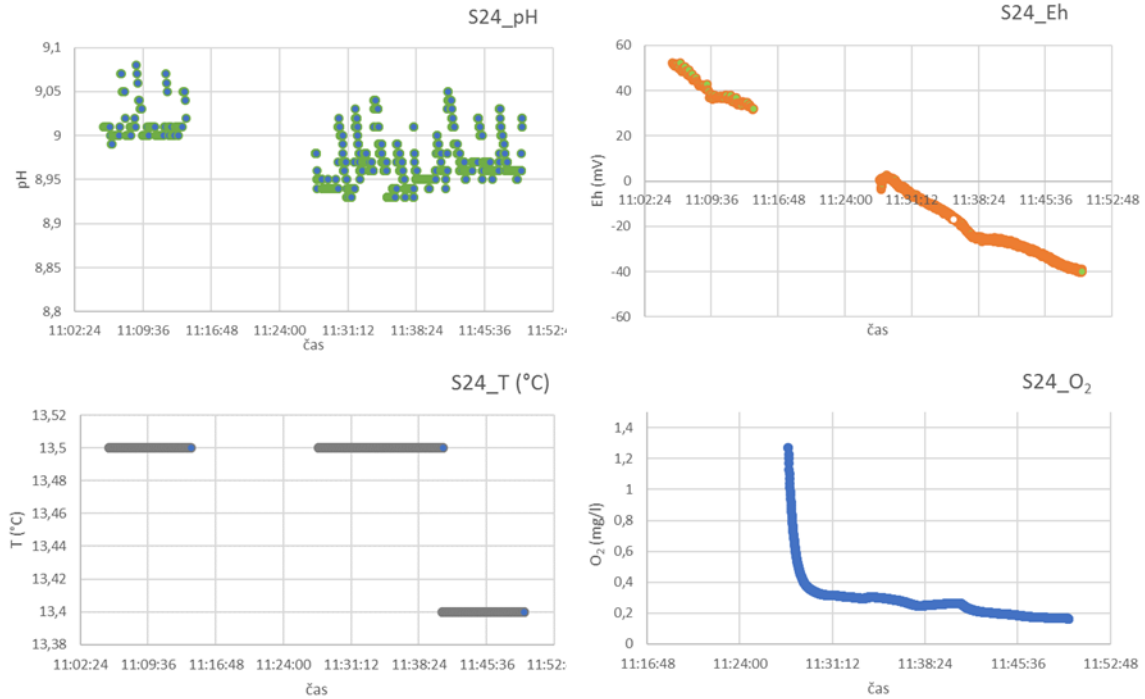
Měření ve vrtech S-22, S-23, S-24, S-25 a S-26 bylo provedeno v průtočných celách po odběru mikrobiologických vzorků pomocí pasivních vzorkovačů a hlavním cílem bylo získání představy o Eh podmínkách ve vrtech. Ze záznamu hodnot je možné pozorovat postupné ustalování hodnot v průběhu měření. Přestože nebylo dosaženo ustálených hodnot, lze sledovat trendy mezi jednotlivými vrty. Již po cca 15 minutách je možné pozorovat pokles hodnot Eh. Nejnižší hodnoty byly naměřeny u vrtu S-25, kdy se hodnoty Eh pohybovaly až kolem – 100 mV a obsah O<sub>2</sub> se pohyboval na hranici detekce. U vrtů S-24 a S2-6 byl sledován pokles hodnot Eh na hodnoty kolem -40 mV a -60 mV. Vysoké hodnoty Eh byly naměřeny u vrtu S-22 (kolem 200mV) a obsah O<sub>2</sub> se pohyboval až kole 3 mg/l. Nestandardní průběh byl sledován u vrtu S-23 s postupným nárůstem Eh až na hodnoty kolem 350 mV a naměřena koncentrace O<sub>2</sub> až 7,8 mg/l (Obr. 11, Obr. 12, Obr. 13, Obr. 14, Obr. 15).



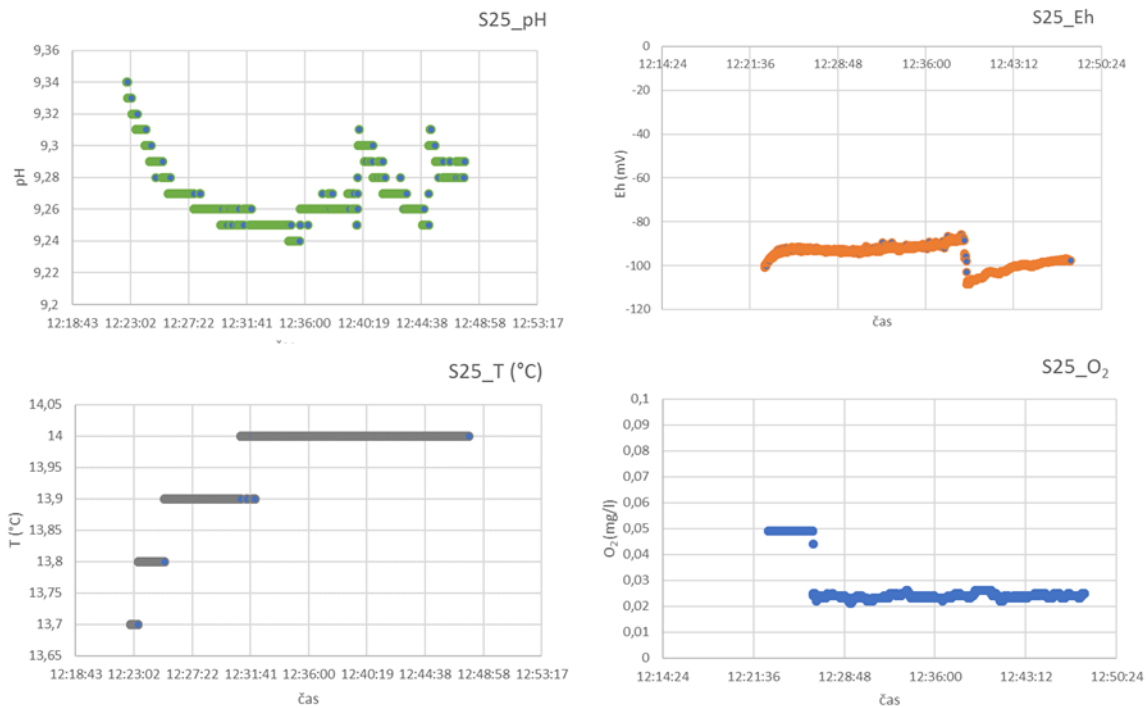
Obr. 11 Záznam hydrochemických parametrů (pH, Eh, T, O<sub>2</sub>) měřených v průtočné cele (vrt S-22)



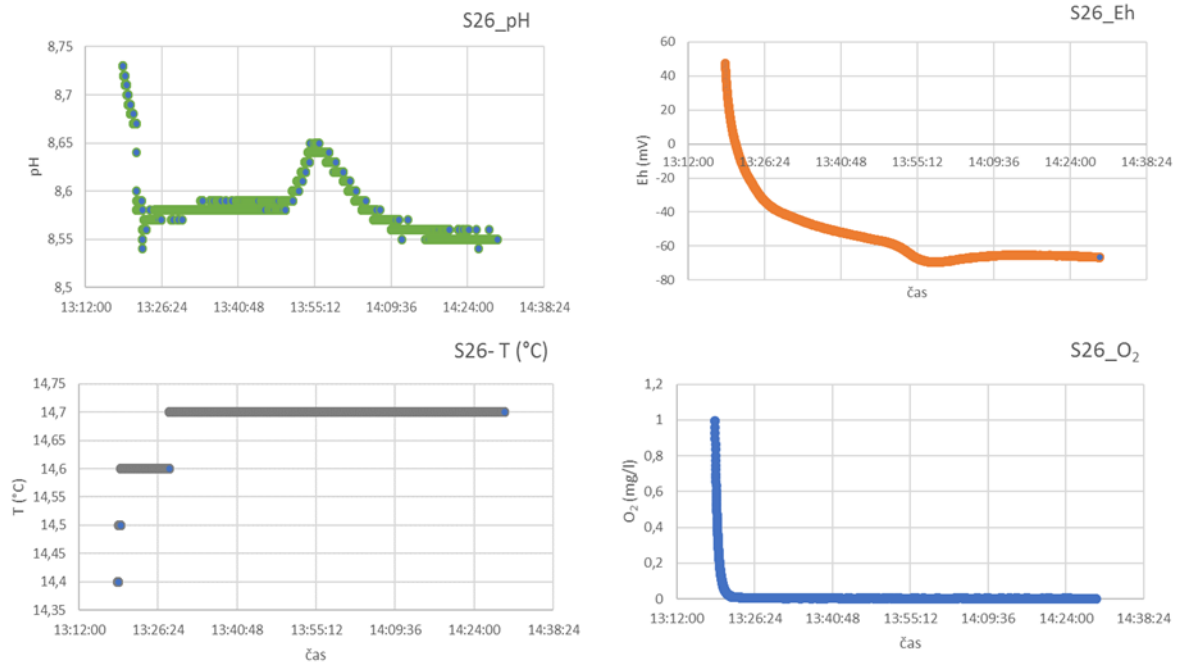
Obr. 12 Záznam hydrochemických parametrů (pH, Eh, T, O<sub>2</sub>) měřených v průtočné cele (vrt S-23)




Obr. 13 Záznam hydrochemických parametrů (pH, Eh, T, O<sub>2</sub>) měřených v průtočné cele (vrt S-24)



Obr. 14 Záznam hydrochemických parametrů (pH, Eh, T, O<sub>2</sub>) měřených v průtočné cele (vrt S-25)



Obr. 15 Záznam hydrochemických parametrů (pH, Eh, T, O<sub>2</sub>) měřených v průtočné cele (vrt S-26)

 <b>SÚRAO</b>	Mikrobiální screening PVP Bukov a dolu Rožná: Závěrečná zpráva projektu	Evidenční označení:
		382/2019

## 4 Molekulárně biologické mikrobiologické analýzy

Všechny získané vzorky byly podrobeny molekulárně-biologickým analýzám, které studují diverzitu mikroorganismů na základě metod pracujících s DNA. Tyto postupy zachytí v podstatě kompletní složení přítomného mikrobiálního společenstva. Jako doplněk byla část vzorků analyzována i tradičními kultivačními postupy (viz. Kapitola 5 Kultivační mikrobiologické analýzy), které poskytnou informace pouze o kultivovatelné části mikrobiologického spektra (do 15%; Amman et al. 1995) a slouží jako srovnání k molekulárně-biologickým postupům.


### 4.1 Použité metody

Pro studium mikrobiální diverzity ve vzorcích podzemní vody i mikrobiálních nárůstů byly využity postupy založené na analýze DNA. Pro extrakci DNA ze vzorků podzemní vody i mikrobiálních nárůstů byl využíván kit PowerWater DNA Isolation Kit (MoBio, USA). Extrakce DNA probíhala dle instrukcí uvedených v protokolu výrobce kitu. Koncentrace získané DNA byla posléze změřena fluorimetricky pomocí přístroje Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Life technologies, USA) dle protokolu výrobce.

Pro studium mikrobiální diverzity byly využity metody sekvenace nové generace (NGS), konkrétně amplikonového sekvenování genu 16S rRNA. Metoda byla podrobněji popsána v průběžné zprávě Černík et al. (2015). Využita byla platforma IonTorrent (Life Technologies, USA). Amplifikována byla variabilní V4 oblast pomocí primerů 530F (Dowd et al. 2008) a 802R (Claesson et al. 2009).

Pro zpracování NGS dat byl využit software Seed verze 2.04 (freeware, původce Laboratoř environmentální mikrobiologie, Mikrobiologický ústav AV ČR; Větrovský a Baldrián 2013). Ze souboru sekvencí byly v tomto programu odstraněny sekvence s kvalitou nižší než 25. Následně byly odstraněny všechny sekvence kratší než 250 bp (včetně tagů a primerů). Sekvence byly podle tagů roztříděny do vzorků a poté byly tagy ořezány. Takto upravené sekvence byly alignovány v programu MAFFT metodou FFT-NS-2 (Kato et al. 2002) a byly odstraněny primery. Po alignování sekvencí byly ručně odstraněny ty sekvence, které nebyly dočteny do konce požadovaného úseku. Ponechání takovýchto sekvencí v datasetu by vytvářelo umělou diverzitu OTU (operační taxonomická jednotka). Z ponechaných sekvencí byly vytvořené OTU pomocí nástroje UPARSE v programu Seed, který zároveň eliminuje chimérické sekvence. Pro jednotlivé OTU byla zvolena standardně užívaná hranice podobnosti 97 %. K OTU byly v tomto programu vytvořeny reprezentativní sekvence, které slouží ke srovnávání jednotlivých OTU s veřejnými databázemi. Pro taxonomické zařazení byla použita veřejně dostupná databáze GenBank. Při interpretaci výsledků nebyly zohledňovány sekvence, které se v datasetu vyskytly pouze jednou (tzv. singletony), protože s relativně vysokou pravděpodobností mohou reprezentovat chybu sekvenční metody. Následně byly určené taxony metabolicky charakterizovány podle dostupné literatury. Takto charakterizovány byly vždy nejhojnější mikroorganismy ve vzorcích tak, aby v každém vzorku byly metabolicky určeny minimálně tři nejhojnější taxony. Tabulka obsahu jednotlivých OTU ve vzorcích byla normalizována na 10 000 sekvencí/vzorek, aby byly vzorky navzájem srovnatelné. Každé číslo v tabulce mikroorganismů tedy představuje počet sekvencí amplikonu 16S rDNA, jestliže by jich bylo osekvenováno 10 000 na každý vzorek. Pokud vzorky obsahovaly více než 50% amplikonů, jejichž sekvence jsou 100% shodné s typickými laboratorními nebo antropogenními kontaminanty, byl daný vzorek vyřazen z následných analýz. Pokud vzorek obsahoval méně než 50 % kontaminantů byl v analýze ponechán s tím,



 <b>SÚRAO</b>	Mikrobiální screening PVP Bukov a dolu Rožná: Závěrečná zpráva projektu	Evidenční označení:
		382/2019

že byly vyřazeny pouze kontaminující OTU. Z nejhojnějších OTU byla poté vytvořena tabulka četností těchto OTU v jednotlivých vzorcích (viz tabulka mikroorganismů) a ze stejných dat byla provedena nepřímá gradientová analýza PCA v programu Canoco (Lepš and Šmilauer, 2000) za účelem zobrazení mikrobiální diverzity na PVP Bukov.


Pro detekci a relativní kvantifikaci konkrétních funkčních skupin mikroorganismů (konkrétně síran-redukující bakterií, denitrifikačních bakterií a celkové bakteriální biomasy) byla využita metoda kvantitativní PCR (qPCR). Konkrétně byly amplifikovány geny kódující expresi adenosin 5' fosfosulfát (APS) reduktázy (pro síran-redukující bakterie) a dusitanové reduktázy (NIR) v případě denitrifikačních bakterií. Pro zhodnocení celkové bakteriální biomasy byly použity univerzální 16S rRNA primery. Podrobnosti o použitých primerech jsou uvedeny v Tab. 2. Analýzy byly provedeny na přístroji LightCycler® 480 Instrument (Roche Biochemicals, USA).

Tab. 2 Seznam použitých qPCR primerů

Primer	Sekvence 5'-3'	Specifita	zdroj
RH1-aps-F	CGCGAAGACCTKATCTTCGAC	SRB: gen kódující adenosin 5' fosfosulfát reduktázu	Ben-Dov et al. 2007
RH2-aps-R	ATCATGATCTGCCAGCGGCCG GA		Ben-Dov et al. 2007
nirK-876F	ATYGGCGGVCA YGGCGA	NRB: gen kódující dusitanovou reduktázu	Henry et al. 2004
nirK-1040R	GCCTCGATCAGRTRTGGTT		Henry et al. 2004
16SqPCR-F	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	Všechny bakterie: univerzální 16S rRNA primery	Nadkarni et al. 2002
16SqPCR-R	GGACTACCAGGGTATCTAATC CTGTT		Nadkarni et al. 2002

## 4.2 Výsledky

Z celkového počtu 122 vzorků bylo pro mikrobiální analýzu použitelných 101 vzorků. Nepoužitelných vzorků bylo 21 – 13 z důvodu chybné sekvenace a 8 z důvodu vysokého podílu laboratorních či antropogenních kontaminujících mikroorganismů. Z 21 nepoužitelných vzorků je 16 odběrů podzemních vod filtrem Sterivex, 2 odběry mikrobiálního matu do falkony a 3 vzorky z pasivního vzorkovače. Důvodem jsou pravděpodobně nízké hodnoty koncentrací získané DNA, které jsou pro mikrobiologicky chudé vzorky hlubokých podzemních vod typické. Při amplifikaci DNA pak dojde k přehlušení signálu ze vzorku cizorodou DNA, která se vyskytuje v použitých chemikáliích a kitech (např. Salter et al. 2014) či v okolním prostředí. Ze sekvenace 109 vzorků (všechny vzorky, kromě těch s chybou během sekvenace) bylo získáno 1 239 682 sekvencí (bez singletonů) rozřazených do 11 361 OTU. Po odstranění vysoce kontaminovaných vzorků, kontaminujících OTU a po výběru nejhojnějších OTU bylo pro analýzy mikrobiální diverzity a metabolickou charakterizaci mikroorganismů použito 510 613 sekvencí spadajících do 131 OTU, které jsou uvedeny v tabulce mikroorganismů (viz Příloha2: Seznam dominantních OTU).

 <b>SÚRAO</b>	Mikrobiální screening PVP Bukov a dolu Rožná: Závěrečná zpráva projektu	Evidenční označení:
		382/2019

#### 4.2.1 Charakteristika metabolické diverzity mikrobiálních komunit

Při hodnocení metabolické diverzity mikrobiálních komunit na studovaném území v souvislosti s plánovaným hlubinným úložištěm je nutné si uvědomit, že pro integritu jednotlivých komponent úložného obalového souboru je potenciálně nebezpečná jakákoli činnost mikroorganismů - aerobních i striktně anaerobních metabolických skupin. Přesto je možné stanovit funkční skupiny, u kterých lze očekávat, že jejich případný výskyt a rozvoj ovlivní bezpečnost v HÚ významně. Jde především o mikroorganismy podílející se na mikrobiálně indukované korozi (především síran-redukující a síru oxidující bakterie, železo-redukující a železo-oxidující bakterie a nitrát-redukující bakterie) a dále mikroorganismy, které mají schopnost ovlivnit funkční vlastnosti bentonitu (především železo-redukující bakterie). Mimo tyto skupiny jsou potenciálně nebezpečné jakékoliv mikroorganismy, které konzumují nebo produkují plyny, a mikroorganismy, které produkují organické sloučeniny. Dále je třeba připomenout, že i když jsou v současné době bakterie určité skupiny na lokalitě přítomné ve velmi malém (případně i nedetekovatelném množství), tak že při nastolení (pro ně) vhodných podmínek (tj. dostatek potřebných donorů a terminálních akceptorů elektronů doplněný absencí limitujících faktorů) dojde k jejich velmi rychlému rozvoji a celkové změně druhového i funkčního spektra. Jak je uvedeno dále v textu, tak všechny potenciálně nebezpečné skupiny mikroorganismů byly na studovaném území zjištěny.


#### Mikroorganismy z hlediska využívaných donorů elektronů

- **Mikrobiální oxidace železa**

Ve zkoumaném souboru vzorků podzemních vod dolu Rožná jsou nejběžnějšími železo oxidujícími mikroorganismy blízce si příbuzné betaproteobakterie *Gallionella* sp., *Gallionella capsiferiformans* a *Sideroxydans* sp. Tyto mikroorganismy patří mezi neutrofilní gradientové mikroorganismy - rostou v úzkém rozmezí nízkých koncentrací kyslíku. Za vysokých koncentrací kyslíku dochází totiž v neutrálním pH k rychlé abiotické oxidaci železa a neutrofilní železité bakterie za takových podmínek ztrácejí zdroj energie pro růst. Velmi často je tedy nacházíme na vývěrech podzemních vod obsahujících železo v místech, kde se tyto vody setkávají s oksyloženou atmosférou a dosud se nestihly zcela nasytit kyslíkem. Také mohou být součástí mikrobiálních matů rostoucích v kyslíkem nasycené atmosféře – například ve větrané důlní chodbě, kde obývají místa, kam se kyslík dostává jen v omezené míře (spodní vrstvy nárůstů). V dole Rožná jsou tyto mikroorganismy v hojné míře přítomny ve vodě vytékající z vrtů S-14, S-20, S-21 a z vývěrů BK-06, BK-06B, BK-07, BK-23, BK-32, BK-29/33, BK-35, BK-31, BK-38, BR-52 na 12. patře a ve vodě z vrtu GR-07 na 24. patře. Dále jsou přítomny v mikrobiálních matech a streamerech rostoucích pod některými z vývěrů (BR-47, BK-06, BR-52, BK-23, BK-06B). Tyto mikrobiální maty či streamery mají zpravidla hnědo-oranžovou barvu v důsledku srážení oxidovaných forem železa.

- **Mikrobiální oxidace síry**

Mikroorganismy se schopností oxidovat redukované formy síry (např. sirovodíky, síru, siřičitany) jsou v podzemních vodách dolu Rožná zastoupeny různorodější skupinou bakterií nežli železo oxidující mikroorganismy. Jedná se o různě si příbuzné mikroorganismy z kmenů Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria a Epsilonproteobacteria. Skupina Alphaproteobacteria je zastoupena bakteriemi *Roseococcus* sp. a *Paracoccus pantrophus*. Obě dvě bakterie jsou v rámci zkoumaných podzemních vod výjimkou a prospívají každá pouze na jednom místě. *Roseococcus* sp. se vyskytuje v mohutném mikrobiálním

 <b>SÚRAO</b>	Mikrobiální screening PVP Bukov a dolu Rožná: Závěrečná zpráva projektu	Evidenční označení:
		382/2019

nárůstu rosolovité struktury a růžové barvy. Tento útvar roste v ústí vrtu 4913 na 24. patře (vzorek VZ19) a nemá ve zkoumaných místech dolu Rožná obdobu. Je známo, že bakterie *Roseococcus* sp. obsahuje růžové pigmenty a pravděpodobně je tedy příčinou barvy nárůstu. Kromě redukovaných forem síry může jako zdroj elektronů pro svůj energetický metabolismus využívat také organické látky, případně být na světle fototrofní. *Paracoccus pantrophus* byl detekován ve vodě z vrtu S26, pro který je typický sirovodíkový zápach. Kromě redukovaných forem síry má tato bakterie schopnost čerpat elektrony z amonných iontů nebo z organických látek. Respirace u ní probíhá buďto aerobně nebo s využitím dusičnanů při nedostatku kyslíku. Ostatní sírné bakterie jsou zpravidla přítomny opakovaně na různých místech (viz tabulka mikroorganismů). Jde o zpravidla autotrofní nebo mixotrofní mikroorganismy *Sideroxydans* sp., *Thiothrix unzii*, *Thiothrix fructosivorans*, *Thiobacillus sajanensis*, *Thiobacillus* sp., *Thioalkalivibrio* sp., *Sulfuricaulis limicola*, *Sulfuricurvum kujense*, *Sulfuricurvum* sp., *Sulfurisoma sediminicola*, *Sulfuritalea* sp. Všechny zmíněné mikroorganismy jsou aerobní či mikroaerofilní (*Sideroxydans* a *Sulfuricurvum*) nebo fakultativně anaerobní (v tom případě respirují dusičnany) a vyskytují se tedy v prostředí s přítomností kyslíku. Lze říci, že mikrobiální oxidace síry je běžným mikrobiálním metabolismem ve vodách dolu Rožná a je typická zejména pro vrty S22, S24, S25, S26 a BR-53, které se nacházejí na 12. patře mimo PVP Bukov. Síru oxidující mikroorganismy jsou přítomné i ve vodě stojící na počvě na 12. patře (VZ23), v oranžovém mikrobiálním matu na BR-49 a ve vodě z BR-21. Na PVP Bukov je mikrobiální oxidace síry typická zejména pro vodu z vrtu S2 a vývěr BK06, v menší míře je tato schopnost přítomna i v mikrobiálních komunitách ve vodách z BK06B, BK07, BK29/33, BK35 a v oranžovém mikrobiálním matu z BK23.

Zajímavé je se podívat podrobněji na vývoj obsahu sírných bakterií v čase. Pro tento účel mohou nejlépe posloužit vrty S-24, S-25 a S-26, kde byly provedeny opakované odběry vod a biofilmů od května do listopadu (případně ledna). Z tabulek 1-3 je patrné, že v každém vrtu je přítomna jiná kombinace síru oxidujících mikroorganismů. Ve vrtu S-24 dominují především různé genotypy bakterie *Thiobacillus*, ve vrtu S-25 převládají dva genotypy bakterie *Sulfuricurvum* a vrt S-26 obsahuje jak *Thiobacillus* tak *Sulfuricurvum*. Každý vrt má zároveň specifický vývoj obsahu sírných bakterií v čase. V biofilmu z vrtu S-24 není zpočátku příliš velké množství síru oxidujících bakterií, v říjnu jejich podíl výrazně stoupá a v listopadu se přidává další síru oxidující bakterie *Thiothrix unzii*. Vrt S-25 je v čase méně proměnlivý, od května do listopadu dominuje jak ve vodě, tak v biofilmu *Sulfuricurvum kujense*, druhý genotyp této bakterie je rovněž hojný celou dobu s tím, že v říjnu se vytrácí z vody. Ve vrtu S-26 dochází v říjnu k výraznému úbytku bakterie *Sulfuricurvum*, zatímco bakterie *Thiobacillus* je nadále hojná. Změny v obsahu těchto bakterií mohou být zapříčiněny jejich odlišným ekologickým vyladěním. Zatímco *Thiobacillus* může využívat pouze sírné sloučeniny jako zdroj elektronů pro respiraci, *Sulfuricurvum* může oxidovat i molekulární vodík a zároveň mu vyhovují nižší koncentrace kyslíku než bakterii *Thiobacillus*. Zrovna tak objevení se bakterie *Thiothrix unzii* v biofilmu v listopadu 2018 může být důsledkem hromadění se organické hmoty v biofilmu, produkované čistě autotrofní bakterií *Thiobacillus*. *Thiothrix* může totiž na rozdíl od ní využívat organické látky jako zdroj elektronů a rovněž jako zdroj uhlíku pro syntézu vlastních organických sloučenin.

Tab. 3 Vývoj obsahu síru oxidujících mikroorganismů ve vrtu S-24. Zobrazeny jsou pouze nejhojněji zastoupené OTU. Čísla uvedená pod jednotlivými vzorky značí množství detekovaných OTU zjištěných v daném vzorku, barevná škála značí množství daného OTU ve vzorku (pokles v řadě červená – žlutá – zelená)

<b>Vrt S-24</b>	voda květen 2018	biofilm květen 2018	biofilm říjen 2018	biofilm listopad 2018
jméno	VZ31	VZ31a	VZ63	VZ110
<i>Paracoccus pantotrophus</i>	0	0	0	1
<i>Roseococcus</i> sp.	0	0	0	2
<i>Sideroxydans</i> sp.	8	0	0	0
<i>Sulfuricurvum kujjense</i>	102	45	21	76
<i>Sulfuricurvum</i> sp.	68	68	0	2
<i>Sulfurisoma sedimicola</i>	12	0	4	15
<i>Sulfuritalea</i> sp.	13	0	11	1
<i>Thioalkalivibrio</i> sp.	3	1	1	2
<i>Thiobacillus sajanensis</i>	37	14	3221	2907
<i>Thiobacillus sajanensis</i>	15	7	143	53
<i>Thiobacillus</i> sp.	1618	0	0	0
<i>Thiothrix unzii</i>	0	0	21	1984

Tab. 4 Vývoj obsahu síru oxidujících mikroorganismů ve vrtu S-25. Zobrazeny jsou pouze nejhojněji zastoupené OTU. Čísla uvedená pod jednotlivými vzorky značí množství detekovaných OTU zjištěných v daném vzorku, barevná škála značí množství daného OTU ve vzorku (pokles v řadě červená – žlutá – zelená)

<b>vrt S-25</b>	voda květen 2018	biofilm květen 2018	voda říjen 2018	biofilm říjen 2018	biofilm listopad 2018	pakr-filtr leden 2019
jméno	VZ28	VZ28a	VZ60	VZ59	VZ111	VZ108
<i>Paracoccus pantotrophus</i>	0	0	0	0	0	52
<i>Sideroxydans</i> sp.	0	0	0	0	0	6
<i>Sulfuricurvum kujjense</i>	1995	2775	1797	1092	1669	29
<i>Sulfuricurvum</i> sp.	1853	2168	3	718	634	0
<i>Sulfurisoma sedimicola</i>	0	0	0	0	0	5
<i>Sulfuritalea</i> sp.	16	4	3	11	7	0
<i>Thioalkalivibrio</i> sp.	0	0	0	0	0	7
<i>Thiobacillus sajanensis</i>	0	0	12	47	120	29
<i>Thiobacillus sajanensis</i>	0	0	2	6	2	0
<i>Thiothrix fructosivorans</i>	0	0	0	0	0	5
<i>Thiothrix unzii</i>	0	0	0	0	0	5


Tab. 5 Vývoj obsahu síru oxidujících mikroorganismů ve vrtu S-26. Zobrazeny jsou pouze nejhojněji zastoupené OTU. Čísla uvedená pod jednotlivými vzorky značí množství detekovaných OTU zjištěných

v daném vzorku, barevná škála značí množství daného OTU ve vzorku (pokles v řadě červená – žlutá – zelená)

<b>vrt S-26</b>	voda květen 2018	biofilm květen 2018 odb. stěrka	biofilm květen 2018 odb. skalpel	voda říjen 2018	biofilm říjen 2018	biofilm listopad 2018	voda leden 2019
jméno	VZ20	VZ20a	VZ29	VZ57	VZ58	VZ112	VZ101
<i>Paracoccus pantotrophus</i>	0	0	0	4	0	1	899
<i>Roseococcus</i> sp.	0	0	0	1	0	0	1
<i>Sideroxydans</i> sp.	0	0	0	19	0	0	11
<i>Sulfuricurvum kujense</i>	2169	1690	652	898	40	25	74
<i>Sulfuricurvum</i> sp.	279	109	99	5	1	0	0
<i>Sulfurisoma sedimicola</i>	0	0	0	0	1	4	1
<i>Sulfuritalea</i> sp.	5	0	2	1	11	32	0
<i>Sulfuritalea</i> sp.	0	0	0	1	0	0	0
<i>Thioalkalivibrio</i> sp.	0	0	0	2	0	1	3
<i>Thiobacillus sajanensis</i>	1389	1244	1291	2223	1631	3387	311
<i>Thiobacillus sajanensis</i>	49	59	488	250	329	32	16
<i>Thiothrix fructosivorans</i>	0	0	0	282	0	0	1258
<i>Thiothrix unzii</i>	0	0	0	1	0	0	0

- **Mikrobiální oxidace vodíku**

Mikroorganismy se schopností oxidovat vodík převládají zejména ve vrtech S-25 a S-26 na 12. patře a ve vrtu 4913 na 24. patře. Jedná se o bakterie *Hydrogenophaga* sp. a *Sulfuricurvum kujense*. Hydrogenovorní mikroorganismy jsou v menší míře přítomné i ve vrtech S-22, S-24, S-2, v neoznačeném vrtu pod BK-38 (VZ76), ve vývěrech BK-06, BK-38, BK-07 v mikrobiálním matu BK-06B a BR-49, ve vodě na počvě na 12. patře (VZ23), dále pak na 24. patře v mikrobiálních matech ve vrtech 4909, v-4588 a 4769. Kromě dvou výše jmenovaných mikroorganismů se jedná o bakterie *Nitrospira moscoviensis*, *Nitrospira* sp., *Dexia* sp., *Sulfuricurvum* sp., *Sulfurisoma sedimicola*, *Sulfuritalea* sp.

 <b>SÚRAO</b>	Mikrobiální screening PVP Bukov a dolu Rožná: Závěrečná zpráva projektu	Evidenční označení:
		382/2019

- **Mikrobiální oxidace metanu**

V dole Rožná patří mezi mikroorganismy schopné oxidovat metan a případně jiné nízkomolekulární deriváty uhlovodíků jako je metanol či acetát tyto bakterie: *Methylocystis rosea*, *Methylobacillus* sp., *Ferribacterium limneticum*, *Methylothermobacterium versatilis*, *Methylomagnus ishizawai* a *Methylocapsa palsarum*. Je zajímavé, že methylotrófní mikroorganismy převládají v biofilmech na 24. patře, zatímco na 12. patře nejsou tak obvyklé. Na 24. patře jsou hojné v mikrobiálních matech ve vrtech 4922, v-4588, 4674, a na počvě ve stružce s černými vlákny biogenního původu (VZ18). Na 12. patře jsou běžnější pouze ve vrtu S-23 a S-1.

- **Mikrobiální oxidace redukovaných forem dusíku**

Schopnost oxidovat redukované formy dusíku (amoniak, dusitany) je stejně jako ostatní metabolismy běžně přítomna v mikrobiálních komunitách ze 12. i 24. patra. Na 12. patře jsou tyto mikroorganismy hojné ve vrtech a vývěrech S-22, S-20, S-26, BK-06, BK-23, BK-07, BK-15, BK-29/33, S-2, BK-31, BK-38, BK-06B, BK-32 a ve vodě na počvě obsahující kvěťákovité měkké útvary a tmavě rudé škrálupy (VZ25 a VZ23). Na 24. patře jsou nitrifikační bakterie hojné ve vrtu v-4588, GR-07, 4680, vrtu u RVPŠ 124-21, 4674 a ve vodě na počvě s měkkými kvěťákovitými útvary (VZ14). Mezi mikroorganismy oxidující buďto amoniak nebo dusitany patří v dole Rožná *Nitrospira moscoviensis*, *Nitrospira* sp., *Nitrosopumilus* sp., *Gemmata* sp., *Nitrososphaera* sp., *Nitrotoga* sp. a *Paracoccus pantrophus*.

- **Mikrobiální oxidace organických látek**

Mikrobiální oxidace organických látek je v dole Rožná běžná na všech vzorkovaných místech. Tento jev je běžný ve všech ekosystémech včetně podzemních vod a ani důl Rožná nepředstavuje v tomto ohledu výjimku. Proto je užitečnější zde zmínit místa, kde je mikrobiální oxidace organických látek oproti oxidaci anorganických sloučenin nejméně významná, nežli se zabývat místy, kde je pro mikroorganismy dominujícím způsobem získávání energie respirace či fermentace organických látek. Je zajímavé, že se zpravidla jedná o vrty, kde dominuje oxidace železa, za kterou je zodpovědná *Gallionella* sp. často doprovázená přítomností archea *Nitrosopumilus* sp. které se specializuje na oxidaci amoniaku. Bakterie *Gallionella* sp. roste v oligotrofních prostředích. V dole Rožná se jedná o tato místa - vrt S-20, BR-52, BK-23, BK-32 a mikrobiální maty u BK-06, BK-23, BK-06B a vrt GR-07 na 24. patře.


## Mikroorganismy z hlediska využívaných akceptorů elektronů

- **Mikrobiální respirace kyslíku**

Mikrobiální respirace kyslíku dominuje ve většině zkoumaných vzorků. Neexistuje vzorek, kde by mikrobiální oxidace kyslíkem nebyla přítomna. Lze říci, že nejmenší zastoupení má tento typ respirace ve vodě z BK-35, v oranžovém streameru na výtoku BR-50, ve třech mikrobiálních matech z 24. patra (vrt 4680, 4517 a vrt na RVPŠ 124-21) a na počvě 24. patra ve stružce s mikrobiálním matem (VZ14).

- **Mikrobiální respirace dusičnanů**

Respirace dusičnanů bývá nejčastěji přítomna u mikroorganismů, které respirují kyslík a je využívána v případě, že kyslík dojde. Tento typ metabolismu je velmi běžný v prostředí, kde koncentrace kyslíku fluktuují. V dole Rožná je schopnost respirovat dusičnany přítomna zejména u mikroorganismů ve vodě a biofilmu z vrtů S-26, a S-25, kde byla detekována

 <b>SÚRAO</b>	Mikrobiální screening PVP Bukov a dolu Rožná: Závěrečná zpráva projektu	Evidenční označení:
		382/2019

opakovaně. V těchto vrtech se jedná o bakterie oxidující vodík a redukované formy síry *Hydrogenophaga* sp., *Hydrogenophaga aquatica*, *Sulfuricurvum kujiense* a *Sulfuricurvum* sp. Dalšími místy s významnou mikrobiální respirací dusičnanů jsou především biofilmy na různých místech – ve vrtu S-22, na počvě na 12. patře (VZ23), ve vrtech na 24. patře 4913, 4922, v-4588, a 4680.

- **Mikrobiální respirace železa (redukce železa)**

Mikrobiální redukce železa je v dole Rožná spíše výjimečným způsobem respirace. Mikroorganismy redukující železo jsou na 12. patře běžné pouze ve vrtu S-1 na PVP Bukov, kde byly zjištěny opakovaně v říjnu a listopadu 2018. Vody na PVP Bukov mají pH mezi 6 a 10, oxidované železo ( $Fe^{3+}$ ) je zde s nejvyšší pravděpodobností přítomné v pevné fázi (např. hydroxidy, oxyhydroxidy železa). Tyto minerální produkty zvětrávání železa mohou pak ve zdejších horninách (v případě vrtu S-1 i v potrubí vycházejícím z vrtu) sloužit jako terminální akceptory elektronů z mikrobiální respirace. Mimo PVP Bukov byly tyto mikroorganismy významné pouze na 24. patře ve dvou vzorcích - okrovém mikrobiálním matu u ústí vrtu 4922 a v bílém mikrobiálním matu ve stružce na počvě. Nejběžnějšími zástupci redukce železa v dole Rožná jsou heterotrofní bakterie *Ferribacterium limneticum*, které respiruje také dusičnany nebo fumarát a *Metallibacterium scheffleri*, které využívá železo pouze, pokud mu k respiraci nestačí v prostředí přítomný kyslík. Zatímco první jmenovaný mikroorganismus je typický pro vrt S-1, druhý převládá ve zbylých dvou vzorcích z 24. patra

- **Mikrobiální respirace síranů, thiosíranů a elementární síry**

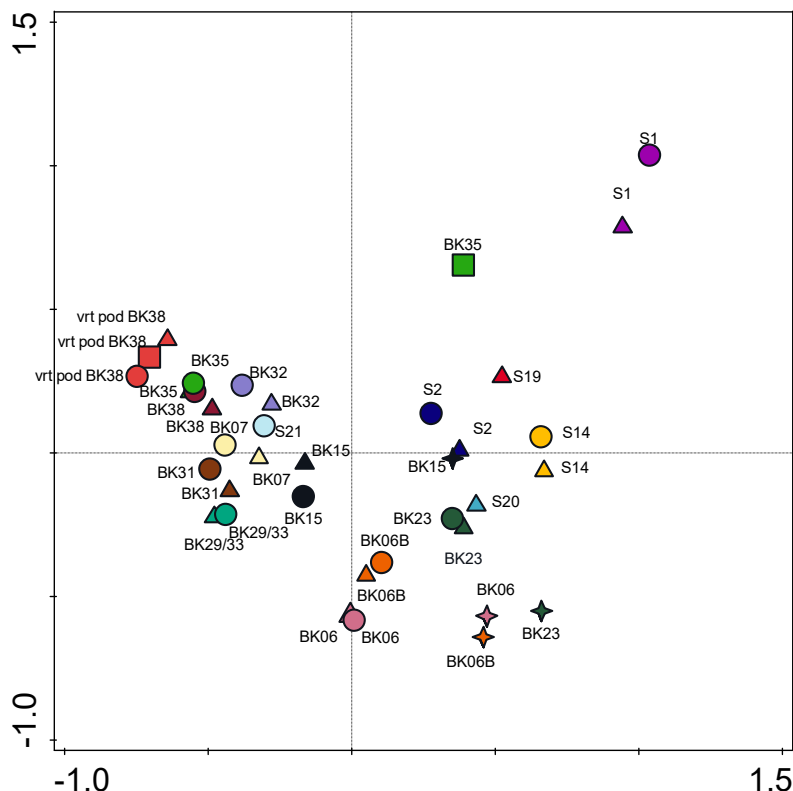
Mikrobiální redukce sírných sloučenin je ve zkoumaných oblastech dolu Rožná ještě méně významná než redukce železa. Prakticky jediný hojnější mikroorganismus, který má schopnost redukovat oxidované formy síry je zde *Alkaliphilus* sp., který oxiduje organické látky pomocí elementární síry, thiosíranu nebo fumarátu. Není vyloženě dominantní v žádném místě, tvoří pouze minoritní část mikrobiálních komunit ve vodě BR-51 a BR-52, kde je rovněž součástí oranžového streameru tvořícím se na stěně pod výtokem. Dále je přítomen v mikrobiálním matu ve vrtu 4680.

- **Mikrobiální fermentace organických látek**

Mikrobiální fermentace organických látek je v mikrobiálních komunitách v dole Rožná také spíše ojedinělým způsobem, jak se zbavovat elektronů při oxidaci redukovaných sloučenin. Je však běžnější než redukce železa a sírných sloučenin. Tento metabolismus je typický jednoznačně pro biofilmy a sedimenty na počvách v ústích vrtů, tedy pro prostředí, kde se v důsledku hromadění organické hmoty a její degradace spotřebovává kyslík, takže již neproniká do spodnějších vrstev sedimentu/biofilmu a vzniká zde prostor právě pro fermentující mikroorganismy. Ty jsou nejhojnější v biofilmu ve vrtech v-4689 a 4769 na 24. patře. Zde se jedná o fakultativně anaerobní bakterii *Caldilinea* sp., která fermentuje pouze v případě nedostatku kyslíku. Dalšími místy s početnějšími fermentujícími mikroorganismy (především obligátní anaerobové *Levilinea* sp. a *Terrimicrobium sacchariphylum*) jsou mikrobiální mat ve vrtu 4674, mat na počvě 24. patra ve stružce s okrovými květákovitými nárůsty (VZ14), biofilm ve vrtu S-26 a černý sediment ve vrtu 4513. Ve vodě jsou fermentující bakterie významnější pouze ve vrtu S-21 a na BK-15, kde se jedná zejména o fakultativního anaeroba *Planctomyces* sp.

#### 4.2.2 Vývoj mikrobiální diverzity na PVP Bukov

Ze všech odběrů na PVP Bukov byla provedena nepřímá gradientová analýza PCA za účelem rozpoznání hlavních rysů mikrobiální diverzity. Z Obr. 16 je patrné, že vzorky odebrané na stejném místě jsou si z hlediska mikrobiálního obsahu podobnější než vzorky odebrané ve stejném čase. Během odběrů v časovém rozmezí říjen až listopad tedy nedochází k významným změnám v mikrobiálním složení. Rozdíl je vidět pouze u vzorku BK-35 mezi podzimními a lednovým odběrem. U vzorku z vrtu pod BK-38 jsou rovněž k dispozici tři časové body, zde se však lednový odběr neliší od těch podzimních. U ostatních vzorků nejsou k dispozici data z lednových odběrů kvůli opakovanému problému při sekvenaci DNA v těchto vzorcích. Změna diverzity mezi dvěma odběry v různém čase je zanedbatelná, markantní rozdíl ovšem existuje mezi mikrobiálním složením vody a mikrobiálního matu přestože se jedná o odběr ze stejného vrtu/vývěru. Tento fenomén je poměrně běžný, protože při vzniku biofilmu dochází k významným změnám podmínek – hromadění organické hmoty a jiných produktů metabolismu, vznik mikroaerofilních a anaerobních mikroprostředí v biofilmu což vede k rozrůznění mikrobiální komunity.




Obr. 16 Mikrobiální diverzita vod a mikrobiálních matů na PVP Bukov. Mikrobiální diverzita je znázorněna pomocí grafu PCA analýzy v programu Canoco. Jednotlivé symboly představují jednotlivé vzorky. Obsahem vzorků jsou nejhojnější OTU. Čím jsou si vzorky v grafu blíže, tím podobnější je jejich mikrobiální složení. Vzorky ze stejného vrtu/vývěru jsou označeny stejnou barvou a jménem místa. Kolečko – odběr vody v říjnu, trojúhelník – odběr vody v listopadu, čtverec – odběr vody v lednu, hvězda – odběr mikrobiálního matu v říjnu.

#### 4.2.3 Výsledky qPCR analýz

Výsledky qPCR analýz pro všechny tři analyzované markery jsou zobrazeny v



 <b>SÚRAO</b>	Mikrobiální screening PVP Bukov a dolu Rožná: Závěrečná zpráva projektu	Evidenční označení:
		382/2019

Tab. 6. Celková bakteriální biomasa byla zjištěna ve všech vzorcích v různých abundancích a závisí především na typu odběru vzorku (mikrobiální nárůst vs. voda).

Síran-redukující bakterie byly pomocí genu *apsA* detekovány v 48 vzorcích, přičemž v žádném analyzovaném vzorku nebyly vyloženě hojné, což odpovídá i výsledkům sekvenční analýzy. Poměrně hojně byly zjištěny SRB ve vzorcích odebraných pomocí pasivního vzorkovače (ve srovnání s předchozími odběry pomocí Sterivex filtrů zachycující stav před instalací pakrů), což indikuje nárůst reduktivního prostředí ve vrtech. Mimo tyto vzorky byly SRB hojně zastoupeny ve vzorcích 25 a 59 (oba mikrobiální nárůsty) a ve vodě z vrtu S19 (vzorek 82).

Denitrifikační bakterie byly pomocí genu *nirK* zjištěny v 84 vzorcích. Ačkoliv se mezi vzorky lišily v abundanci, tak v žádném ze studovaných vzorků nebyly extrémně hojné. Vzorky s nejvyšším zastoupením NRB byly mikrobiální nárůsty ve vzorcích 30, 44 a 102.


Tab. 6 Výsledky qPCR analýz. SRB: síran redukující bakterie, NRB: denitrifikační bakterie, PV: pasivní vzorkovač, +++: bakterie dané skupiny abundantní, ++: střední množství bakterií dané skupiny, +: malé množství bakterií dané skupiny, -: bakterie dané skupiny nedetekovány.

číslo vzorku DNA	název místa odběru (např. označení vrtu, vývěru)	datum odběru	typ odběru	celková bakteriální biomasa (16S rRNA)	SRB ( <i>apsA</i> )	NRB ( <i>nirK</i> )
1	BR-21	22. 5. 18	voda	+	+	+
2	vrt 4470	22. 5. 18	nárůst	++	+	+
2a	vrt 4470	22. 5. 18	nárůst	++	-	+
3	vrt 4513	22. 5. 18	nárůst	+	-	+
4	vrt 4517	22. 5. 18	nárůst	+	+	-
5	vrt 4674	22. 5. 18	nárůst	+++	+	++
6	vrt v-4588, RVPŠ 124-13	22. 5. 18	nárůst	++	-	+
6a	vrt v-4588, RVPŠ 124-13	22. 5. 18	nárůst	++	-	-
7	vrt 4680	22. 5. 18	nárůst	+	-	-
8	vrt v-4689, RZPŠ 124-19	22. 5. 18	nárůst	+++	-	-
9	vrt RVPŠ 124-21	22. 5. 18	nárůst	++	+	+
9a	vrt RVPŠ 124-21	22. 5. 18	nárůst	+	-	+
10	vrt 4769	22. 5. 18	nárůst	+++	++	+
11	vrt 4922, RVPŠ 124-29	22. 5. 18	nárůst	++	-	++
11a	vrt 4922, RVPŠ 124-29	22. 5. 18	nárůst	+	+	+
12	vrt 4905	22. 5. 18	nárůst	+	-	-
13	vrt 4909	22. 5. 18	nárůst	++	-	+
14	počva 4m severně od vrtu 4909	22. 5. 18	nárůst	+++	+++	++
15	počva mezi vrty 4907 a 4908	22. 5. 18	nárůst	++	-	+
16	počva mezi vrty 4909 a 4910	22. 5. 18	nárůst	++	+	+
17	počva 4m severně od vrtu 4910	22. 5. 18	nárůst	+	-	-

18	počva 4m severně od vrtu 4910	22. 5. 18	nárůst	++	-	+
19	vrt 4913, 61 - geotest	22. 5. 18	nárůst	++	-	+
20	vrt S-26	22. 5. 18	voda	++	++	-
20a	vrt S-26	22. 5. 18	nárůst	++	+	-
21	výtok BR-49	23. 5. 18	nárůst	++	+	++
21a	výtok BR-49	23. 5. 18	nárůst	++	+	++
22	puklina u 12011	23. 5. 18	nárůst	+	-	-
23	počva u 12736	23. 5. 18	nárůst	+	+	+
24	BR-51, vrt 911	23. 5. 18	voda	+	-	-
25	počva u 12052	23. 5. 18	nárůst	++	+++	++
26	BR-52, vrt na západní straně chodby	23. 5. 18	voda	+	-	-
26a	BR-52, vrt na západní straně chodby	23. 5. 18	nárůst	+	-	-
26b	BR-52, vrt na západní straně chodby	23. 5. 18	nárůst	++	-	-
27	BR-53, vrt na západní straně chodby	23. 5. 18	voda	++	-	+
27a	BR-53, vrt na západní straně chodby	23. 5. 18	nárůst	+++	+	++
28	vrt S-25	23. 5. 18	voda	+++	+	++
28a	vrt S-25	23. 5. 18	nárůst	+++	+	+
29	vrt S-26	23. 5. 18	nárůst	++	-	-
30	vrt S-22	23. 5. 18	nárůst	+++	++	+++
31	vrt S-24	23. 5. 18	voda	+	-	-
31a	vrt S-24	23. 5. 18	nárůst	++	+	+
32	výtok BR-47	23. 5. 18	nárůst	+	-	-
33	výtok BR-50	23. 5. 18	nárůst	++	+	++
34	GR-06 výtok z vrtu na východ od RZ1 <sub>24-113</sub>	4. 4. 18	voda	++	-	+
35	GR-07 výtok z vrtu v RZ1 <sub>24-117</sub>	4. 4. 18	voda	++	+	+
36	BK23	9. 10. 18	voda	+	-	-
37	BK23	9. 10. 18	nárůst	++	-	++
38	BK06	9. 10. 18	voda	+	-	-
39	BK06B	9. 10. 18	voda	+	-	-
40	BK06B	9. 10. 18	nárůst	++	-	-
41	BK07	9. 10. 18	voda	+	-	++
42	BK29/33	9. 10. 18	voda	+	-	-
43	BK15	9. 10. 18	voda	+	-	+
44	BK15	9. 10. 18	nárůst	++	-	+++
45	vrt S1	9. 10. 18	voda	+	-	-
46	vrt S2	9. 10. 18	voda	+	-	+
47	BK31	9. 10. 18	voda	++	-	-
48	BK32	9. 10. 18	voda	++	-	-
49	neoznačený vrt ve stěně pod BK38	9. 10. 18	voda	+++	-	+

50	vrt S20	9. 10. 18	voda	+	-	+
51	vrt S14	9. 10. 18	voda	+	-	-
52	vrt S21	10. 10. 18	voda	++	-	+
53	BK35	10. 10. 18	voda	++	-	+
54	BK38	10. 10. 18	voda	++	-	+
55	naproti BK06	10. 10. 18	nárůst	++	+	+
56	vrt S23	10. 10. 18	voda	+	-	-
57	vrt S26	10. 10. 18	voda	+	+	-
58	vrt S26	10. 10. 18	nárůst	+++	+	+
59	vrt S25	10. 10. 18	nárůst	+++	+++	+
60	vrt S25	10. 10. 18	voda	++	+	++
61	vrt S22	10. 10. 18	nárůst	++	+	+++
62	vrt S24	10. 10. 18	voda	++	+	+++
63	vrt S24	10. 10. 18	nárůst	+++	-	++
64	BR-52	10. 10. 18	voda	+	-	-
65	BR-52	10. 10. 18	nárůst	+++	-	+
66	BK23	21. 11. 18	voda	+	+	+
67	BK06	21. 11. 18	voda	++	-	-
68	BK06B	21. 11. 18	voda	++	+	-
69	BK07	21. 11. 18	voda	++	-	+
70	BK29/33	21. 11. 18	voda	++	+	+
71	BK15	21. 11. 18	voda	+	+	+
72	vrt S1	21. 11. 18	voda	+	-	-
73	vrt S2	21. 11. 18	voda	++	-	-
74	BK31	21. 11. 18	voda	++	+	+++
75	BK32	21. 11. 18	voda	++	-	+
76	neoznačený vrt ve stěně pod BK38	21. 11. 18	voda	+	-	+
77	vrt S20	21. 11. 18	voda	+	-	+
78	vrt S14	21. 11. 18	voda	++	-	+
79	vrt S21	21. 11. 18	voda	++	-	+
80	BK35	21. 11. 18	voda	+++	-	+
81	BK38	21. 11. 18	voda	++	-	+
82	vrt S19	21. 11. 18	voda	+++	+++	+
83	BK23	9. 1. 19	voda	+	-	-
84	BK06	9. 1. 19	voda	++	-	-
85	BK06B	9. 1. 19	voda	+	-	-
86	BK07	9. 1. 19	voda	++	-	+
87	BK29/33	9. 1. 19	voda	++	-	+
88	BK15	9. 1. 19	voda	++	-	+
89	vrt S1	9. 1. 19	voda	++	+	+
90	vrt S2	9. 1. 19	voda	++	+++	+
91	BK31	9. 1. 19	voda	++	-	+
92	BK32	9. 1. 19	voda	++	-	+++
93	neoznačený vrt ve stěně pod BK38	9. 1. 19	voda	++	-	-

94	vert S20	9. 1. 19	voda	+	-	-
95	vert S14	9. 1. 19	voda	+	-	++
96	vert S21	9. 1. 19	voda	++	-	++
97	BK35	9. 1. 19	voda	++	-	+
98	BK38	9. 1. 19	voda	++	-	+
99	vert S19	9. 1. 19	voda	++	+++	+++
100	vert S23	15. 11. 18	voda	+	+	+
101	vert S26	15. 11. 18	voda	++	++	+++
102	vert S22	15. 11. 18	nárůst	+++	+	+++
103	vert S1	15. 11. 18	voda (PV)	++	+++	-
105	vert S22	9. 1. 19	voda (PV)	++	++	+++
106	vert S23	9. 1. 19	voda (PV)	++	+	+
107	vert S24	9. 1. 19	voda (PV)	+++	+++	++
108	vert S25	9. 1. 19	voda (PV)	+	+++	+
109	vert S23	15. 11. 18	nárůst	++	+	+++
110	vert S24	15. 11. 18	nárůst	+++	-	+++
111	vert S25	15. 11. 18	nárůst	+++	+++	++
112	vert S26	15. 11. 18	nárůst	+++	+++	++

 <b>SÚRAO</b>	Mikrobiální screening PVP Bukov a dolu Rožná: Závěrečná zpráva projektu	Evidenční označení:
		382/2019

## 5 Kultivační mikrobiologické analýzy

### 5.1 Úvod

Vzorky odebrané pro řešení projektu byly analyzovány kultivačními metodami za účelem vytvoření uceleného popisu mikrobiálního osídlení mikroorganismy kultivovatelnými definovanými postupy, které jsou minimálně selektivní v rámci vlastního stanovení. Celkový počet kultivovatelných mikroorganismů byl stanoven jako počet heterotrofních mikroorganismů za aerobních a anaerobních podmínek. Pro stanovení denitrifikačních mikroorganismů byl použit v rámci kultivačního média jako terminální akceptor elektronů dusičnanový anion. Síran redukující bakterie byly stanoveny pomocí API média. Pro stanovení mikroorganismů, které respiračně redukují železité ionty, se využilo Lovley agaru. A konečně metanogenní mikroorganismy byly ve vzorcích stanoveny semikvantitativní metodou ve vialkách s inertní atmosférou. Sulfid oxidující bakterie reprezentují lithotrofní mikroorganismy a k jejich kvantifikaci byl použito DSMZ médium 35.


### 5.2 Materiály a metody

#### 5.2.1 Zpracování vzorků

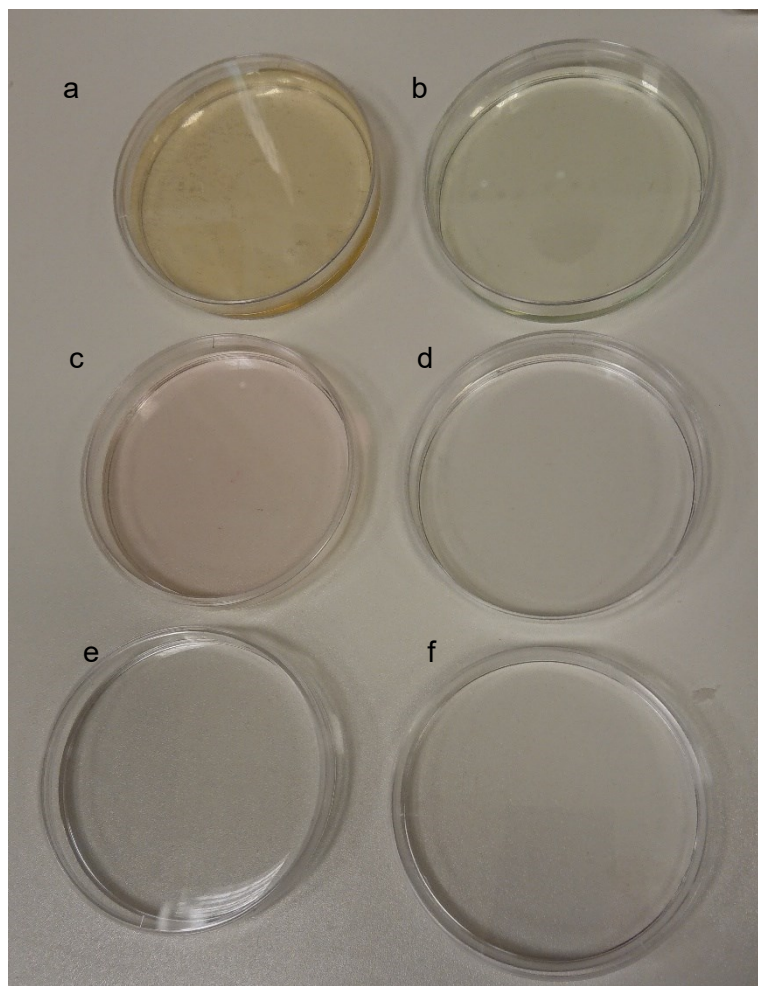
Všechny analyzované vzorky byly dodány v podobě vzorků podzemních vod odebraných asepticky a intaktně. Bezprostředně po doručení byly vzorky pomocí metody desetinného ředění (Goldman a Green, 2008) naředěny do definovaných koncentračních řad pomocí sterilního fyziologického roztoku (0,9 % roztok chloridu sodného v destilované vodě) a umístěny do sterilních mikrobiologických zkumavek se šroubovacím uzávěrem. K distribuci zředěných vzorků na povrchu agaru byly použity standardizované metody roztírání a zalévání (Goldman a Green, 2008). Roztírání pomocí očkovací hokejky probíhalo na suchých agarových plotnách, k zalévání byl použit příslušný agar zchlazený na teplotu okolo 40–45 °C. V přehledu (Tab. 7) je konkrétně uvedeno, jaké metody a postupu bylo při konkrétním stanovení použito.

Tab. 7 Přehled zpracování vzorků

Druh stanovení	Metoda vnesení vzorku do agaru	Typ kultivačního systému	Podmínky kultivace
aerobní heterotrofní bakterie	1 ml roztěrem	Petriho miska	kultivační box
anaerobní heterotrofní bakterie	1 ml zaléváním	Petriho miska	jar box
denitrifikační bakterie	1 ml zaléváním	Petriho miska	jar box
železo redukující bakterie	1 ml zaléváním	Petriho miska	jar box
síran redukující bakterie	1 ml zaléváním	Petriho miska	jar box

 <b>SÚRAO</b>	Mikrobiální screening PVP Bukov a dolu Rožná: Závěrečná zpráva projektu	Evidenční označení:
		382/2019

metanogenní mikroorganismy	injekční stříkačkou 0,1 ml vpichem přes septum	Petriho miska	vialky (oxid uhličitý a vodík)
sulfid oxidující bakterie	1 ml roztěrem	Petriho miska	kultivační box



Obr. 17 Sada základních kultivačních médií: plate count agar (a), R1A (b), FWA-FeIII (c), API (d), agar pro methanogeny (e) a DSMZ medium 35 (f)

V případě analýzy metanogenních mikroorganismů musela být dodržena přísná anaerobní technika, která byla zajištěna manipulací se vzorky pomocí injekční stříkačky a vialek se septem. Kapalná média byla odzdušněna varem a přidavkem antioxidantu, absence kyslíku byla kontrolována resazurinem. Pro kontrolu anaerobního prostředí byl využit resazurinový test (resazurin barevnou změnou velmi citlivě reaguje na zvýšení hodnoty Eh). Resazurinový test je v mikrobiologii při kultivaci anaerobních organismů běžně využíván (např. Proctor 1997) jako spolehlivý prostředek pro potvrzení anaerobních podmínek.


### 5.2.2 Kultivační analýza na agarových plotnách

V rámci stanovení byla zaměřena pozornost na různé funkční skupiny mikroorganismů. Vyjma metanogenních populací byly zbývající kultivační analýzy provedeny v prostředí Petriho misek, které byly umístěny do termostatu při konstantní teplotě (15 °C). Vzhledem ke

skutečnosti, že charakter analyzovaných vzorků jeví znaky výrazně oligotrofních systémů (nedostatek snadno využitelných zdrojů uhlíku a energie jako sacharidy, lipidy nebo bílkoviny), je vysoce pravděpodobné, že v řadě případů může adaptace stanovovaných mikroorganismů trvat výrazně delší dobu, než jaká je obvyklá u referenčních kmenů. Z důvodů potlačení falešně pozitivních nebo negativních výsledků byly kultivace prováděny v delším období a s více odečty nárůstů v podobě vytvořených kolonií. Za účelem zabránění vysychání agarových ploten byl v kultivačním prostředí po celou dobu kultivace umístěn zdroj sterilní vody, který udržoval stabilní hodnotu vlhkosti v prostředí. Názvy, složení a původ použitých kultivačních médií (Tab. 8) jsou doplněny i grafickým znázorněním ploten (Obr. 17) před inokulací.

Tab. 8 Použité ztužené kultivační půdy

Název půdy	Složení	Analýza	Zdroj
plate count agar	agar 9.0 g/L, dextrosa, 1.0 g/L, trypton, 5.0 g/L, kvasničný extrakt, 2.5 g/L	heterotrofní mikroorganismy	Sigma Aldrich
R2A	v 1 L destilované vody 0.5 g KNO <sub>3</sub> , 0.5 g kvasničného extraktu, 0.5 g peptonu, 0.5 g glukosy, 0.5 g škrobu, 0.3 g pyruvátu sodného, 0.3 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0.05 g MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O a 10 ml roztoku stopových prvků (složených z 10 ml HCl, 1.5g FeCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O, 70 mg ZnCl <sub>2</sub> , 100 mg MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O, 6 mg H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , 190 mg CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O, 2 mg CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O, 24 mg NiCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O, 36 mg Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O), 15g agaru	denitrifikující bakterie	Massa, Carusso, Trovatelli, Tosques (1998)
FWA-Fe(III)	v 1 L destilované vody 2,5 g NaHCO <sub>3</sub> ; 0,1 g CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O, 0,1 g KCl, 1,5 g NH <sub>4</sub> Cl; 0,6 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O, 6,8 g NaCH <sub>3</sub> COO a 200 mmol amorfních železitých iontů/L a 15 g agaru	železo redukující bakterie	Lovley a Phillips (1988)
API	agar, 14 g/L, askorbová kyselina, 0.1 g/L, hydrogenfosforečnan sodný, 0.01 g/L, síran železnatoamonný, 0.1 g/L, sulfid hořečnatý, 0.2 g/L	síran redukující bakterie	Sigma Aldrich
agar pro metanogeny	NH <sub>4</sub> Cl, 1 g/L; NaCl, 0.6 g/L; NaHCO <sub>3</sub> , 5 v; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.3 g/L; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0.3 g/L; MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O, 0.16 g/L; CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O, 0.009 g/L; resazurin 0.1% roztok, 1 mL;	metanogenní mikroorganismy	Wolfe (2011)

 <b>SÚRAO</b>	Mikrobiální screening PVP Bukov a dolu Rožná: Závěrečná zpráva projektu	Evidenční označení:
		382/2019

	cystein.HCl a Na <sub>2</sub> S.9H <sub>2</sub> O a 15 g agaru		
DSMZ medium 35	NH <sub>4</sub> Cl 0.10 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 3.00 g MgCl <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O 0.10 g CaCl <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O 0.14 g práškové síry 10.00 g destilovaná voda 1000.00 ml	sulfid oxidující bakterie	DSMZ

### 5.2.3 Kultivace metanogenních mikroorganismů

Kultivace metanogenních mikroorganismů byla provedena podle metodiky (Wolfe 2011), zjednodušené na prostředí 2 mL vialek, do nichž bylo nalito 0,5 mL agaru pro metanogeny (Tab. 8) a po ztuhnutí a uzavření septem vytvořena inertní atmosféra směsi oxid uhličitý-vodík (80:20). Inokulace byla prováděna pomocí injekční stříkačky, vizualizace narostlé biomasy pomocí TTC.

### 5.2.4 Výsledky

Jak již bylo uvedeno (kapitola 5.2.2) s ohledem na vysoce oligotrofní charakter vzorků, kultivace byla prováděna tak dlouho, dokud se počet vytvořených kolonií neustálil na konstantní hodnotě. V přehledu (Tab. 9) je tato skutečnost zohledněna uvedením parametru délky kultivace. Semikvantitativní charakter stanovení metanogenních mikroorganismů se projevuje stanovením pouze řádu koncentrace vyjádřené jako cfu v mL původního vzorku. V ostatních případech byl počet mikroorganismů ve vzorku stanoven odečtem nárůstu na plotně a přepočtem na původní vzorek.

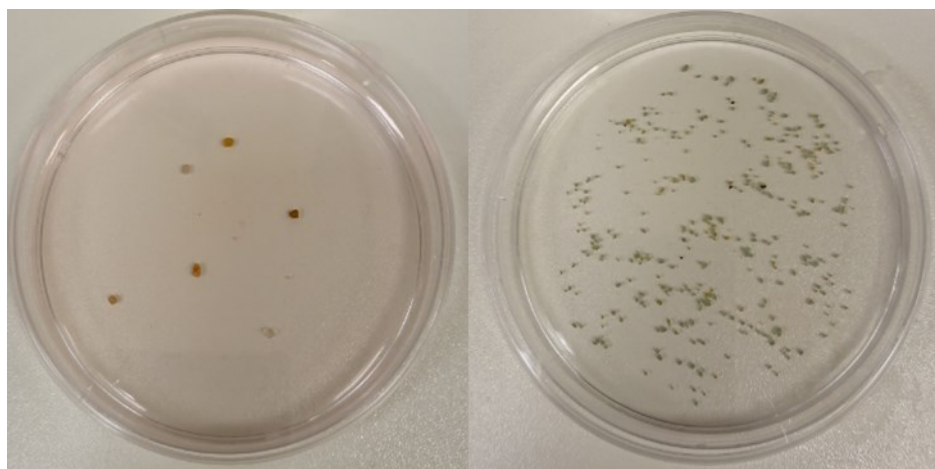
Tab. 9 Výsledky mikrobiologických analýz v cfu na mL (TČK – technicky čistá kultura)

Vzorky	Analýza	2 dny	7 dní	21 dní	42 dní	70 dní	TČK
BK 06	aerobní heterotrofní bakterie	8,3E+03					1
BK 06 B		7,8E+03					2
BK 30		7,1E+03					2
BK 26		6,2E+03					1
BK 27		1,9E+03					3
BK 31		2,6E+03					1
BK 19		9,9E+03					2
BK 06	anaerobní heterotrofní bakterie			1,1E+02			2
BK 06 B			5,2E+02				1
BK 30				9,7E+02			1
BK 26			7,9E+02				1
BK 27				4,2E+02			2
BK 31				7,7E+02			1
BK 19				5,4E+03			2

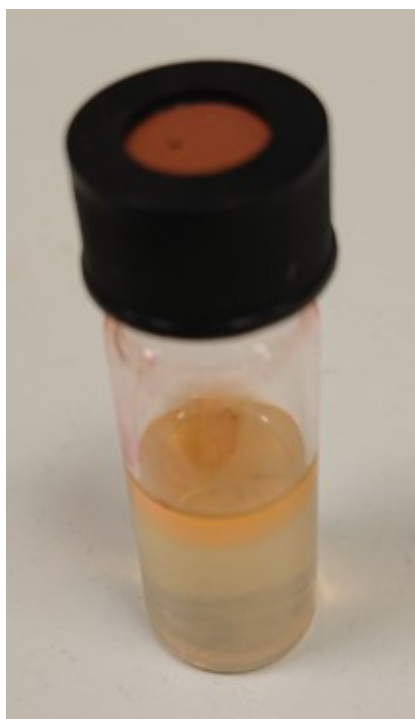


BK 06	denitrifikační bakterie		7,5E+01				1
BK 06 B			2,0E+02				1
BK 30		4,6E+01					1
BK 26		7,5E+01					1
BK 27			3,6E+02				1
BK 31			4,1E+02				2
BK 19			1,3E+02				1
BK 06	železo redukující bakterie			3,8E+01			1
BK 06 B			5,4E+01				1
BK 30				2,9E+00			1
BK 26				4,7E+00			1
BK 27					2,1E+01		1
BK 31				9,0E-01			1
BK 19				1,3E+00			1
BK 06	síran redukující bakterie					0	
BK 06 B						0	
BK 30						0	
BK 26						0	
BK 27						0	
BK 31						0	
BK 19						0	
BK 06	metanogenní mikroorganismy				1,0E+01		
BK 06 B					0		
BK 30					0		
BK 26					0		
BK 27					1,0E+01		
BK 31					1,0E+01		
BK 19					0		
BK 06	sulfid oxidující bakterie		2,2E+01				2
BK 06 B			3,7E+02				3
BK 30			2,0E+03				3
BK 26			1,2E+03				2
BK 27			4,3E+03				1
BK 31			1,0E+02				2
BK 19			3,3E+03				2

Poslední sloupec vyjadřuje počet izolovaných technicky čistých kultur (kultura, která vznikla z jedné kolonie, která je osamocená, ohraničená a dostatečně vzdálená). Zároveň toto číslo uvádí počet dostupných izolátů biologických činitelů, které se podařilo z přirozeného systému izolovat a morfologicky selektovat.




Obr. 18 Příklady kultivovaných mikroorganismů, vlevo IRB, vpravo SOB ze vzorku BK 30



Obr. 19 Pozitivní reakce při kultivaci metanogenních mikroorganismů

### 5.2.5 Závěr

V sedmi analyzovaných vzorcích byly stanoveny profily přítomných mikroorganismů s důrazem na jejich funkční charakteristiky a odlišné doby nárůstu. Nejvýrazněji zastoupenou skupinou jsou aerobní heterotrofní bakterie, které v podobných řádech byly stanoveny ve všech zkoumaných vzorcích. Zároveň vykazují největší míru heterogenity, tzn. nejvyšší počet izolovatelných biologických činitelů. Anaerobní heterotrofní mikroorganismy se pohybovaly ve zhruba o řád nižším zastoupení. Ve vzorcích jsou přítomná nízká množství denitrifikačních bakterií, avšak v tomto parametru je nutné vzít v úvahu možný fakultativní charakter jejich

 <b>SÚRAO</b>	Mikrobiální screening PVP Bukov a dolu Rožná: Závěrečná zpráva projektu	Evidenční označení:
		382/2019


metabolismu, např. schopnost přepnout mezi aerobní respirací a denitrifikací. Z dalších metabolických typů, kde figuruje na pozici terminálního akceptoru elektronů jiná látka než kyslík nebo dusičnan, byla potvrzena přítomnost železo redukujících bakterií (Obr. 18 vlevo), kde se podařilo izolovat jeden morfologicky identický izolát vyskytující se ve všech vzorcích. Naopak bakterie se schopností transferovat elektrony v respiračním procesu na sírany, které by byly kultivovatelné, se opět prokázat nepodařilo. V rámci metabolismu sirných látek je však pozoruhodná vysoká četnost bakterií, které redukované sírné sloučeniny oxidují (Obr. 18 vpravo). Ve třech vzorcích po kultivaci trvající 42 dní byla potvrzena přítomnost kultivovatelných metanogenních mikroorganismů (Obr. 19).

### 5.3 Srovnání výsledků kultivačních metod a molekulárních metod

Kultivačními metodami bylo zpracováno 7 vzorků vod ze 7 různých vývěřů/vrtů na PVP Bukov. Analýzou 16S rDNA ampliconů byly z těchto 7 vod zpracovány 4 vzorky. Jedná se o vzorky BK-06, BK-06B, BK-27 (S-2), BK-31. Výsledky obou dvou metod se poměrně liší. Je to dáno především nízkou kultivabilitou oligotrofních autotrofních mikroorganismů v důsledku čehož dochází k nadhodnocení eutrofních heterotrofně aerobních metabolických skupin při kultivaci. Molekulární metody ukazují, že ve vzorcích BK-06 a BK-31 dominují oxidátoři amoniaku, železa a síry - tedy aerobní autotrofové a nikoli aerobní heterotrofové (nutno podotknout, že oxidace amoniaku a železa nebyla kultivačními metodami testována). Co se týče využívaných akceptorů elektronů, ukazují molekulární metody naprostou dominanci aerobních mikroorganismů, z nichž řada má možnost využívat dusičnany jako TAE. Fermentující, síran redukující a železo redukující mikroorganismy zde hrají zcela nedůležitou roli (řádově promile z celkového počtu ampliconů). Metanogeneze v těchto 4 vodách nebyla při analýze nejhojnějších OTU detekována vůbec. Kultivační metody byly oproti tomu schopné detekovat poměrně překvapivé množství reducentů železa a metanogenů. Tento rozdíl lze vysvětlit tím, že k úspěšné kultivaci teoreticky stačí i malé množství v původním prostředí neaktivních buněk, které začnou růst až při výskytu vhodných podmínek (výsev na dané médium). Kultivační metody jsou vysoce selektivní a prokáží výskyt mikroorganismů kultivovatelných v daném médiu, přičemž z nich není možné určit relativní zastoupení jednotlivých metabolických skupin v původním společenstvu. K tomuto účelu slouží lépe molekulární metody.

## 6 Ovlivnění mikrobiálních komunit antropogenní činností

Podzemní prostředí, jakými jsou důlní díla, vznikla lidskou činností. Horninové prostředí je zde ovlivněné antropogenním působením a tento vliv se promítá i do charakteru mikrobiálních komunit zkoumaných v důlních dílech. Tak tomu je i v případě dolu Rožná. Mikroorganismy potřebují ke svému růstu energii, tu v podzemí, kde není možná fototrofie, získávají výhradně chemotrofně, tedy oxidačně-redukčními reakcemi, kde jsou elektrony přenášeny z donorů na akceptory elektronů a uvolněná energie je uložena do molekul ATP. Energeticky nejvýhodnější je vždy přenos elektronů na kyslík, tedy aerobní respirace. Jelikož jsou důlní díla větraná, je v důlních chodbách dostatek kyslíku, který mikroorganismy využívají k aerobní respiraci. V dole Rožná takovýto typ metabolismu zcela jednoznačně převládá i ve vývěrech či vrtech, ze kterých byly vzorky odebrány těsně u výtoku ze stěny, tedy bez dlouhého průtoku důlní chodbou. Je třeba si uvědomit, že i do hlubokých vrtů proniká kyslík z důlních chodeb a že pro růst aerobně respirujících mikroorganismů stačí velmi malé koncentrace kyslíku, právě protože se jedná o energeticky výhodnou reakci. Výskyt kyslíku v těchto prostředích podporuje mikrobiální aerobní oxidaci sirných sloučenin, železa, dusíkatých látek, vodíku metanu či jiných organických látek, a naopak potlačuje anaerobní metabolismy jako je respirace síranů, redukce železa, metanogeneze (analýzou nejhojnějších mikroorganismů nebyla vůbec detekována) nebo fermentace. Největší množství obligátních anaerobů je typicky v biofilmech, kde ve spodních mikrovrstvách dochází kyslík spotřebovávaný mikroorganismy rostoucími ve vyšších vrstvách biofilmu (např. biofilm ve vrtu S-26, S-22 nebo řada nárůstů odebraných na 24. patře – vrt 4922, 4674 a mnohé další). O podílu anaerobů v biofilmech rostoucích ve větraných důlních chodbách nerozhoduje poloha místa odběru (hloubka pod povrchem, ale spíše jeho tloušťka, která pozitivně koreluje s mírou anoxie v jeho vnitřku). Zajímavější je proto se podívat na vzorky vod, u kterých lze předpokládat, že anaerobní mikroorganismy jsou zde unášené proudem z hlubších anoxických míst v hornině. Nejvyšší relativní zastoupení sekvencí náležejících obligátním anaerobům byly maximálně jednotky procent z celkového podílu zjištěných sekvencí. Jedná se především o vrt S-1 (vrt je dlouhodobě opatřený pakrem a kohoutem a jsou zde měřeny výtoky z vrtu), kde 7 % sekvencí patří obligátnímu anaerobovi *Ferribacterium limneticum*, který jako TAE využívá fumarát, dusičnany nebo železité ionty. Dalším příkladem mohou být vrty a vývěry BR-21, BR-51, BR-52, BR-53 s 3 %, 4 %, 2 % a 1,2 % sekvencí obligátních anaerobů. V těchto vodách se jedná buď o bakterii *Levilinea* sp., která fermentuje organické látky, nebo o bakterii *Alkaliphilus* sp., která respiruje pomocí síry, thiosíranu nebo fumarátu. Lze předpokládat, že obligátně anaerobní metabolismy jsou běžné ve větší vzdálenosti od důlních chodeb v horninovém masívu a zrovna tak by převládly v případě, že by došlo k uzavření důlního díla a následnému úbytku kyslíku v dole Rožná.

 <b>SÚRAO</b>	Mikrobiální screening PVP Bukov a dolu Rožná: Závěrečná zpráva projektu	Evidenční označení:
		382/2019


## 7 Návrh dalšího možného řešení mikrobiologického monitoringu

V návaznosti na výsledky uvedené v předchozích kapitolách byl vytvořen návrh, jak by bylo vhodné dále postupovat při monitoringu mikrobiologické aktivity na zkoumaném území. Vysoký počet analyzovaných vzorků a jejich heterogenita umožnil stanovit základní omezení, na které je třeba brát v případě dalších aktivit zřetel. Tato omezení jsou především velká míra ovlivnění mikrobiologické diverzity lidskou činností vedoucí k vysokému zastoupení aerobních mikroorganismů a nízká míra oživení hlubokých podzemních vod, která je typická pro obdobná prostředí a výrazně zvyšuje riziko kontaminace vzorků.

Jak bylo uvedeno výše v textu, pro integritu inženýrských bariér v plánovaném HÚ je potenciálně nebezpečná jakákoli mikrobiální aktivita, nicméně jako hlavní nebezpečné procesy je třeba uvažovat mikrobiálně indukovanou korozi (především síran-redukující a síru oxidující bakterie, železo-redukující a železo-oxidující bakterie a nitrát-redukující bakterie), ovlivnění funkčních vlastností bentonitu (především železo-redukující bakterie ale i další skupiny), jakoukoliv mikrobiální produkci či konzumaci plynů a mikrobiální produkci organických látek. Všechny skupiny, které mají potenciál bezpečnost HÚ takto ovlivnit, byly na lokalitě zjištěny. Při nastolení pro ně vhodných podmínek dojde zákonitě k jejich rozvoji. Hlavním cílem dalších aktivit by tedy mělo být nalezení takových podmínek, které rozvoj mikrobiální aktivity výrazně omezí.

V potenciálních hlubinných úložištích je plánováno anaerobní nastavení podmínek, ve kterém jsou abiotické i biotické formy zvětrávání obalových materiálů pomalejší. Proto je důležité další pokusy zabývající se mikrobiální diverzitou navrhovat tak, aby se prostředí, ve kterém pokusy probíhají, co nejvíce podobalo budoucímu reálnému úložišti s anaerobními podmínkami. V kapitole 3.2.1 byla demonstrována metabolická diverzita mikroorganismů v hlubinném úložišti ovlivněném aerobními podmínkami (antropogenní činností – viz kapitola 5). V dalším kroku navrhujeme pokusy, kde bude nastolen anaerobní režim, který podpoří růst anaerobních mikroorganismů, tedy těch potenciálně přítomných v podmínkách uzavřeného hlubinného úložiště. Tímto způsobem bude možné zhodnotit mikrobiální diverzitu a metabolickou pestrost mikrobiálních komunit v podzemních vodách co nejméně ovlivněných přítomností kyslíku.

Budou-li v oblasti PVP Bukov či v dole Rožná plánovány další aktivity, kde by bylo vhodné monitorovat mikrobiologickou aktivitu v podzemních vodách, tak je třeba vždy zvážit cíl experimentů a jim přizpůsobit i způsob odběru, který je pro výsledky mikrobiologických analýz klíčový. Pro monitoring změn v anaerobně probíhajících experimentech je zásadní odebírat vzorky vody z odzdušněných zapakrovaných vrtů, kde je minimalizován obsah kyslíku a může tak dojít k ustavení nejvyšší možné míry redukčního prostředí. Pro monitoring je vhodné volit vrty s nízkou porušeností horniny. Dále je třeba vzít v potaz, že ustavení mikrobiologické rovnováhy trvá určitou (těžko odhadnutelnou) dobu v závislosti na typu vrtu a dalších okolnostech (např. disturbance v blízkém okolí vrtu), a proto je při plánování veškerých aktivit vhodné počítat s určitým časovým odstupem po uzavření vrtu. Po uzavření vrtu totiž dochází v postupným změnám ve složení mikrobiálního společenstva do doby, než je dosaženo stabilního, tzv. klimaxového stadia. Teprve v tento moment je možné sledovat změny v mikrobiálním spektru v závislosti na jiné proměnné, než je čas od uzavření vrtu. Paralelně s mikrobiologickými odběry je pro interpretaci výsledků žádoucí sledovat i hydrochemické parametry ve vrtu (optimálně in-situ). Ideální by bylo prodloužit dobu záznamu hydrochemických parametrů pro dosažení ustálených podmínek, především u měření

 <b>SÚRAO</b>	Mikrobiální screening PVP Bukov a dolu Rožná: Závěrečná zpráva projektu	Evidenční označení:
		382/2019


oxidačně-redukčního potenciálu (Eh). Dále by bylo vhodné měření doplnit o hydrochemickou analýzu podzemní vody z filtrátu. Tyto doplňující analýzy napomohou spolehlivě interpretovat získaná data.

Bude-li to možné, tak optimální způsob odběru představují v této zprávě předložené nové pasivní vzorkovače. Hlavním důvodem je, že filtr, na kterém je zachycena mikrobiální biomasa, se do nich vkládá (a zároveň i vyjímá) ve sterilním prostředí v laboratoři a nedochází tedy ke kontaminaci mikroorganismy vyskytujícími se v prostředí podzemních chodeb. Vzorkovače jsou plně sterilizovatelné a umožňují přefiltrovat větší objem vody. Výsledky našich měření ukazují, že v případě málo oživených vrtů je optimální filtrovat minimálně tři litry (lépe pět litrů a více) vody, tak aby bylo získáno dostatečné množství DNA. Přefiltrovat takové množství podzemní vody je však časově i technicky (omezené připojení k rozvodům 220V v podzemních podmínkách na lokalitě) náročné, takže si postup odběru bude vyžadovat ještě další optimalizaci a součinnost se zadavatelem. Nebude-li z jakéhokoliv důvodu možné použít pasivní vzorkovač, tak použití Sterivex filtrů se jeví jako další vhodná varianta. Sterivex filtry se velmi osvědčily u vzorků, kde je vyšší míra oživení.

V rámci řešení tohoto projektu byly pro účely mikrobiologických odběrů zapakrovány vrty S-22 až S-26 a bylo by vhodné pokračovat v monitoringu změn jejich mikrobiálního složení. Až na vrt S-22 byly hadičky ze všech ostatních vrtů vyvedeny až po posledním odběru. Bylo by tedy vhodné sledovat změny způsobené odvodu vzdušným vrtu. Další výhodou pokračujícího monitoringu těchto vrtů by bylo získání orientační představy, jak dlouho potrvá, než se ustaví mikrobiologická rovnováha po uzavření vrtu (což je poznatek důležitý zejména pro plánování dalších experimentů, kde je zvažováno hodnocení mikrobiologických parametrů). V neposlední řadě pokračující monitoring umožní dořešit poslední problematické technické oblasti při použití vzorkovacího systému, tak aby ho bylo možné využívat rutinně. Tyto monitorovací body je možné rozšířit o další vrty v oblasti PVP Bukov, kde by byly odběry technicky jednodušší (především z důvodu dostupných 220V rozvodů) a výsledky monitoringu zároveň pravděpodobně (s ohledem na budoucí experimenty, kde dodavatel předpokládá, že budou probíhat především v oblasti PVP) i relevantnější. Optimální rozestup pro dlouhodobý monitoring mezi jednotlivými odběry je doba dvou až třech měsíců (čerstvě po zapakrování vrtu kratší).

Další parametr, který velmi pravděpodobně ovlivňuje složení mikrobiálních společenstev, je tlak ve vrtu. Pro studium tohoto vlivu je možné využít zapakrované vrty, ve kterých po uzavření dochází k nárůstu tlaku, a v nich sledovat změny ve složení komunity v závislosti na hodnotách tlaku (in-situ tlakové experimenty).

V neposlední řadě by bylo vhodné pozornost zaměřit i na sesilní mikroorganismy, které porůstají dostupný substrát (v případě studovaného území především horninu). Pro tyto případy jsou v zahraničí používány pasivní vzorkovače s vloženým inertním sterilním substrátem, které jsou umístěny do uzavřených vrtů. Jako vhodný substrát, který může být vložen do vzorkovače, by bylo vhodné použít sklo, vysterilizovanou nadrcenou horninu z lokality či nanovláknenné nosiče, jejichž velký povrch umožní poměrně rychlý nárůst dostatečného množství biologického materiálu (ačkoliv v těchto extrémně chudých biotopech těžko odhadnout, jak rychle tento proces může trvat). Takovéto nosiče je možné umístit jak do horizontálních, tak do vertikálních vrtů. U vertikálních vrtů by bylo možné vzorkovače umístit do různých hloubek a sledovat tak vliv hloubky na mikrobiální diverzitu. Pro tyto účely se jeví vhodným např. vrt S-18.

 <b>SÚRAO</b>	Mikrobiální screening PVP Bukov a dolu Rožná: Závěrečná zpráva projektu	Evidenční označení:
		382/2019

## 8 Závěr

Předložená závěrečná zpráva shrnuje výsledky komplexního mikrobiologického screeningu, který proběhl v dole Rožná a v prostorách PVP Bukov v období od ledna 2018 do ledna 2019. Celkem bylo pro účely mikrobiologických analýz odebráno 129 vzorků.

Průzkum prokázal výskyt metabolicky i fylogeneticky různorodých skupin mikroorganismů sekvenční analýzou amplikonů 16S rDNA i kultivačními metodami. Dále byly vzorky hodnoceny metodou kvantitativní PCR, která cílila na celkovou bakteriální biomasu (gen pro 16S rRNA), síran-redukující bakterie a denitrifikační bakterie. Analýza amplikonů byla provedena jak na 12. tak na 24. patře a prokázala, že tato dvě patra se mikrobiálními metabolismy významně neliší. Jediný rozdíl, který stojí za zmínku je větší výskyt aerobních methylotrófních mikroorganismů na 24. patře. To může být ovšem způsobeno tím, že většina vzorků zde byla odebrána z mikrobiálních matů (biofilmů) a nikoli z vytékající vody, které je na 24. patře nedostatek, nebo tím, že prostředí na 24. patře je obecně chudší na výskyt donorů elektronů (možná opět v důsledku nižších průtoků), a proto převládá oxidace krátkých metylovaných organických látek jako produktů degradace organické hmoty. Dalším významným poznatkem je, že mikrobiální komunity jsou ve zkoumaném prostředí dolu Rožná významně ovlivněny antropogenní činností, zejména důlním větráním a přítomností kyslíku v důlních chodbách a vrtech. Následkem toho představují v dole Rožná obligátně anaerobní mikroorganismy, které jinak lze v přirozeném prostředí v podobných hloubkách očekávat, vzácnou výjimku. Mezi nejhojněji zastoupené funkční skupiny patří mikroorganismy schopné oxidovat organické látky, sloučeniny železa a síry.


V průběhu řešení projektu byl vyvinut a úspěšně použit vzorkovací systém pro mikrobiologické analýzy využívající pasivní vzorkovače. Tyto pasivní vzorkovače byly umístěny na výstupech z vrtů S-22, S-23, S-24, S-25 a S-26. Při jejich používání je umožněno zachycení nativního druhového spektra mikroorganismů přítomných v anaerobních podzemních vodách, dále umožňují zachytit větší množství biomasy, minimalizovat vliv aerobního prostředí tunelu/budovaného úložiště a eliminovat vliv současných antropogenních zásahů na lokalitě. Na vrtech, kde byly použity pasivní vzorkovače, byla rovněž provedena hydrochemická in-situ měření.

Na základě dosavadních zjištění byla formulována doporučení pro případné další aktivity zahrnující mikrobiologické analýzy na studovaném území. Jedná se především o nastavení podmínek mikrobiologických pokusů tak, aby byl ve zkoumaném prostředí podpořen růst mikroorganismů, které lze očekávat v uzavřeném hlubinném úložišti s minimálním obsahem kyslíku. Cílem tedy bude zaměřit se na diverzitu anaerobních mikrobiálních skupin.

## 9 Citace a seznam literatury

- AMANN R. I., LUDWIG W., SCHLEIFER K. H. (1995): Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. – *Microbiological Reviews*, 5, 143–169.
- BEN-DOV E., BRENNER A., KUSHMARO A. (2007): Quantification of Sulfate-reducing Bacteria in Industrial Wastewater, by Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) Using *dsrA* and *apsA* Genes. – *Microbial Ecology*, 54, 439–451.
- CLAESSON M. J., O'SULLIVAN O., WANG Q., NIKKILA J., MARCHESI J. R., SMIDT H., DE VOS W. M., ROSS R. P., O'TOOLE P. W. (2009): Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. – *PLoS One*.
- ČERNÍK M., SHRESTHA R., STEINOVÁ J., STOULIL J., ŠEVCŮ A., ŠPAČEK P., DOBREV D. (2015): Mikrobiální koroze za podmínek hlubinného úložiště pro koncepci ocelový UOS – zhutněný bentonit – Rešeršní práce a plán experimentů – Průběžná technická zpráva. Zpráva SÚRAO, 31/2015, 73 str.
- DOWD S. E., CALLAWAY T. R., WOLCOTT R. D., SUN Y., MCKEEHAN T., HAGEVOORT R. G., EDRINGTON T. S. (2008): Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). – *BMC Biol.*, 6.
- GOLDMAN E., GREEN L. H. (2008): *Practical Handbook of Microbiology*. – Boca Raton: CRC Press.
- HENRY S., BAUDOIN E., LÓPEZ-GUTIÉRREZ J. C., MARTIN-LAURENT F., BRAUMAN A., PHILIPPOT L. (2004): Quantification of denitrifying bacteria in soils by *nirK* gene targeted real-time PCR. *Journal of microbiological methods* 59, 327–335.
- KATOH K., MISAWA K., KUMA K., MIYATA T. (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform, *Nucleic Acids Research* 30, 3059–3066.
- LEPŠ J., ŠMILAUER P. (2000) Mnohorozměrná analýza ekologických dat. Biologická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích
- LOVLEY D. R., PHILLIPS E. J. (1988): Novel Mode of Microbial Energy Metabolism: Organic Carbon. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 1472–1480.
- MASSA S., CARUSSO M., TROVATELLI F., TOSQUES M. (1998): Comparison of plate count agar and R2A medium for enumeration of heterotrophic bacteria in natural mineral water. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14, 727–730.
- NADKARNI M. A., MARTIN F. E., JACQUES N. A., HUNTER N. (2002): Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. – *Microbiology* 148, 257–266.
- PROCTOR L. M. (1997): Nitrogen-fixing, photosynthetic, anaerobic bacteria associated with pelagic copepods. – *Aquatic microbial ecology* 12, 105–113.
- SALTER S. J., COX M. J., TUREK E. M., CALUS S. T., COOKSON W. O., MOFFATT M. F., WALKER A. W. (2014): Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC biology* 12, 87.
- STEINOVÁ J., BURKARTOVÁ K., PLUHAŘ T., ČERNÍK M. (2018): Mikrobiální screening PVP Bukov a dolu Rožná - Etapa 1: Přípravné práce. Průběžná technická zpráva. Zpráva SÚRAO, 258/2018, 25 str.
- VĚTROVSKÝ T., BALDRIAN P. (2013): Analysis of soil fungal communities by amplicon pyrosequencing: current approaches to data analysis and the introduction of the pipeline SEED. – *Biology and Fertility of Soils* 49, 1027–1037.



 <b>SÚRAO</b>	Mikrobiální screening PVP Bukov a dolu Rožná: Závěrečná zpráva projektu	Evidenční označení:
		382/2019

Wolfe R. S. (2011). Techniques for cultivating metanogens. *Methods in Enzymology* 494, 1–22.

