

MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
ÚSTAV BIOCHEMIE



GENY SÍRNÉHO METABOLISMU
V BIOOXIDACI PYRITU

Diplomová práce

Alena Šustová

VEDOUCÍ PRÁCE: DOC. ING. MARTIN MANDL, CSc.

BRNO 2015

Bibliografický záznam

Autor: Bc. Alena Šustová
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita
Ústav biochemie

Název práce: Geny sirného metabolismu v biooxidaci pyritu

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie

Vedoucí práce: doc. Ing. Martin Mandl, CSc.

Akademický rok: 2014/2015

Počet stran: 53

Klíčová slova: *Acidithiobacillus ferrooxidans*; tetrathionanhydrolasa;
thiosírandehydrogenasa; oxidace pyritu; proteinová
purifikace; genová exprese

Bibliographic Entry

Author Bc. Alena Šustová
Faculty of Science, Masaryk University
Department of Biochemistry

Title of Thesis: Genes of sulfur metabolism in the biooxidation of pyrite

Degree programme: Biochemistry

Field of Study: Biochemistry

Supervisor: doc. Ing. Martin Mandl, CSc.

Academic Year: 2014/2015

Number of Pages: 53

Keywords: *Acidithiobacillus ferrooxidans*; tetrathionate hydrolase; thiosulfate dehydrogenase; pyrite oxidation; protein purification; gene expression

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá identifikací genů kódujících proteiny, které se účastní oxidace elementární síry a redukovaných anorganických siřných sloučenin u bakterie *Acidithiobacillus ferrooxidans* a jejich exprese při oxidaci pyritu.

V teoretické části jsou shrnuty současné poznatky o buněčné stavbě bakterie *At. ferrooxidans* a předpokládané metabolické dráhy oxidace železa(II) a zejména siřných látek. Dále se tato část zaměřuje na metody molekulární analýzy na úrovni transkripce.

V experimentální části byla optimalizována kultivace bakterií *At. ferrooxidans* na pyritu a následná separace planktonických a adherovaných buněk. Byly purifikovány proteiny tetrathionanhydrolasa a thiosírandehydrogenasa účastnící se metabolismu siřných látek, u nichž byly identifikovány jejich geny. Dále byla sledována exprese těchto a dalších vybraných genů siřného metabolismu v kulturách *At. ferrooxidans* rostoucích na pyritu.

Abstract

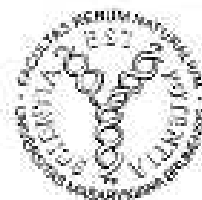
This thesis is focused on the identification of genes encoding proteins that are involved in the oxidation of elemental sulfur and reduced inorganic sulfur compounds and their expression in *Acidithiobacillus ferrooxidans* grown on pyrite.

The theoretical part summarizes the current knowledge about cellular structure of *At. ferrooxidans* and proposed pathways of iron oxidation and especially oxidation of sulfur compounds. Furthermore, this section focuses on methods of molecular analysis used at a transcription level.

In the experimental part were optimized cultivation of *At. ferrooxidans* on pyrite and separation of planktonic and sessile cells. The proteins tetrathionate hydrolase and thiosulfate dehydrogenase involved in the metabolism of sulfur compounds were purified and their genes have been identified. The expression profiles of identified genes and some other genes supposed to be involved in sulfur metabolism in *At. ferrooxidans* grown on pyrite were examined.



Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta
Ústav biochemie
Kotlářská 2, 602 00 Brno, CZ



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Magisterský studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie

Student(ka): **Alena Šustová**

Název tématu: Geny sírného metabolismu v biooxidaci pyritu.

Vedoucí diplomové práce: Doc. Martin Mandl

Odborný konzultant: Mgr. Jiří Kučera

Datum zadání diplomové práce: září 2013

Datum odevzdání diplomové práce: květen 2015


.....
zpracovatel diplomové práce


.....
vedoucí diplomové práce


.....
ředitel Ústavu biochemie

V Brně, dne 1.9.2013

Zásady pro vypracování:

Práce se zaměří na expresi vybraných genů sirného metabolismu. Cílem bude průkaz vybraných potenciálních metabolických drah v tvorbě sirných meziproduktů za účelem zpřesňování modelů biooxidace pyritu. K tomuto účelu budou identifikovány geny kódující proteiny sirného metabolismu souvisejícího s biooxidací pyritu. Práce bude vyžadovat kultivaci bakterií, izolaci vybraných proteinů a identifikaci jejich genů. Po identifikaci genů bude následovat studium jejich exprese na úrovni RNA při oxidaci pyritu.

Formální vypracování diplomové práce se bude řídit oficiálními pokyny Pff MU.

Seznam odborné literatury:

Dopson M., Johnson D.B. 2012. Biodiversity, metabolism and applications of acidophilic sulfur-metabolizing microorganisms. *Environmental Microbiology* 14:2620-2631.

Vera, M., Schippers, A., Sand, W., 2013. Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation-part A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 7529-7541.

Aktuální články z rešerše.

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu své diplomové práce, doc. Ing. Martinu Mandlovi, Csc. za přátelský přístup a Mgr. Jiřímu Kučerovi, Ph.D za vstřícnost, odborné vedení a cenné rady, které mi poskytl v průběhu zpracování této práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracovala samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

Brno 5. měsíce 2015

.....
Bc. Alena Šustová

Obsah

1.	ÚVOD	10
2.	TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1.	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	11
2.1.1.	Bakterie adherované a planktonické	12
2.1.2.	Extracelulární polymerní vrstva	12
2.1.3.	Pily	13
2.1.4.	Metabolismus železa	13
2.1.5.	Metabolismus síry	15
2.2.	Thiosírandehydrogenasa	16
2.2.1.	Gen pro thiosírandehydrogenasu	16
2.3.	Tetrathionanhydrolasa	17
2.3.1.	Gen pro tetrathionanhydrolasu	18
2.4.	Pyrit	19
2.5.	Bioloužení	19
2.5.1.	Thiosíranový mechanismus	20
2.5.2.	Polysulfidový mechanismus	20
2.5.3.	Využití při těžbě mědi	21
2.6.	Molekulární analýza RNA	23
3.	CÍLE PRÁCE	24
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
4.1.	Materiál a metody	25
4.1.1.	Mikroorganismus a kultivační podmínky	25
4.1.2.	Média	25
4.1.2.1.	Kultivace bakterií rostoucích na Fe^{2+}	25
4.1.2.2.	Kultivace bakterií rostoucích na tetrathionanu	26
4.1.2.3.	Kultivace bakterií rostoucích na pyritu	27
4.1.3.	Sběr a zpracování bakterií rostoucích na pyritu	28
4.1.3.1.	Sběr frakce planktonických bakterií	28
4.1.3.2.	Sběr frakce bakterií adherovaných na pyritu	28
4.1.4.	Příprava buněčného cytosolu	29
4.1.5.	Kinetická měření	29
4.1.5.1.	Stanovení pH	29
4.1.5.2.	Stanovení koncentrace Fe^{3+} iontů	29
4.1.5.3.	Stanovení počtu bakterií ve vzorku	30
4.1.6.	Stanovení enzymové aktivity	30
4.1.6.1.	Stanovení aktivity tetrathionanhydrolasy	30
4.1.6.2.	Stanovení aktivity thiosírandehydrogenasy	30
4.1.7.	Purifikace proteinů	30
4.1.7.1.	Afinní chromatografie (AC)	30
4.1.7.2.	Ionexová chromatografie (IEC)	31
4.1.8.	Ultrafiltrace vzorku	31

4.1.9.	SDS-PAGE	31
4.1.10.	LC-MS/MS analýza.....	32
4.1.11.	Manipulace s RNA	32
4.1.12.	Reverzní transkripce a real-time PCR.....	33
4.2.	Výsledky.....	35
4.2.1.	Optimalizace sběru adherovaných bakterií pomocí oscilace	35
4.2.2.	Optimalizace sběru adherovaných bakterií pomocí ultrasonikace.....	35
4.2.3.	Poměr planktonických a adherovaných bakterií během kultivace na pyritu.....	36
4.2.4.	Purifikace a identifikace tetrathionanhydrolasy.....	36
4.2.4.1.	Ionexová chromatografie pro tetrathionanhydrolasu	37
4.2.4.2.	SDS-PAGE pro tetrathionanhydrolasu	38
4.2.4.3.	LC-MS/MS analýza pro tetrathionanhydrolasu.....	38
4.2.5.	Purifikace a identifikace thiosírandehydrogenasy.....	39
4.2.5.1.	Ionexová chromatografie pro thiosírandehydrogenasu.....	39
4.2.5.2.	SDS-PAGE pro thiosírandehydrogenasu.....	40
4.2.5.3.	LC-MS/MS analýza pro thiosírandehydrogenasu.....	41
4.2.6.	Analýza genové exprese pomocí RT-qPCR.....	42
4.3.	Diskuse	46
5.	ZÁVĚR	49
6.	SEZNAM ZKRATEK	50
7.	SEZNAM LITERATURY	51

1. Úvod

Studium bakterie *Acidithiobacillus ferrooxidans* a dalších acidofilních mikroorganismů má nejen aplikační potenciál v biotěžbě kovů, případně v řešení okyselování podzemních vod, ale tyto bakterie jsou velmi zajímavé i jako představitelé extremofilních organismů. Žijí ve velmi kyselém prostředí a využívají anorganické látky jako síru nebo sulfidy kovů jako zdroj energie.

V teoretické části se práce majoritně zabývá studiem metabolismu síry a železa(II) u bakterie *At. ferrooxidans* a v experimentální části práce jsou purifikovány enzymy účastníci se metabolických procesů siřných sloučenin. Studuje se exprese vybraných genů, u kterých se předpokládá, že jsou zapojeny v siřném metabolismu této bakterie. Cílem experimentální práce je přinést další aspekty ve stávajících teoretických modelech siřného metabolismu bakterie *At. ferrooxidans*.

2. Teoretická část

2.1. *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Bakterie *Acidithiobacillus ferrooxidans* je chemolitoautotrofní, Gram-negativní, nesporulující mikroorganismus, který je schopen růstu při extrémních hodnotách pH < 3. Optimální teplotní škála pro růst této bakterie se pohybuje mezi 10 – 37 °C. Na jejím povrchu se vyskytuje slizovité pouzdro a krátké filamentární struktury, tzv. pily. Její přirozený výskyt je hlavně v důlních vodách, jedná se často o depozita rudy nebo uhlí. ¹

Tabulka 1. Taxonomické zařazení bakterie *At. ferrooxidans* ²

Říše	<i>Bacteria</i>
Kmen	<i>Proteobacteria</i>
Třída	<i>Acidithiobacillia</i>
Řád	<i>Acidithiobacillales</i>
Čeleď	<i>Acidithiobacillaceae</i>
Rod	<i>Acidithiobacillus</i>
Druh	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>

Bakterie *At. ferrooxidans* má širokou metabolickou kapacitu. Kromě toho, že získává energii oxidací železnatých iontů (Fe^{2+}) a redukovaných anorganických sirných sloučenin (RISC), dokáže také oxidovat molekulární vodík, kyselinu mravenčí a další kovové ionty. Využívá neobvykle širokou škálu elektronových akceptorů, v jejím genomu bylo identifikováno více než 11 různých cytochromů typu *c*. ³

Tento organismus je také výjimečný svým významným zastoupením v oblastech těžebních ložisek, v depozitech kovů a všude tam, kde je jako zdroj energie přítomen pyrit (FeS_2) nebo další sulfidy kovů. Ukázalo se, že bakterie *At. ferrooxidans* preferuje jako zdroj energie pyrit před chalkopyritem ($CuFeS_2$), sfaleritem (ZnS) a galenitem (PbS). ¹

Bakterie *At. ferrooxidans* získává energii potřebnou pro růst z oxidace železnatých iontů na železité a RISC sloučenin až na kyselinu sírovou. Oxidace železnatých iontů a RISC sloučenin poskytuje elektrony potřebné k redukci kyslíku na vodu, a tím i energii pro tvorbu ATP, ale také k redukci $NAD(P)^+$ na $NAD(P)H$, jenž se účastní dalších anabolických procesů. ⁴

2.1.1. Bakterie adherované a planktonické

Bakterie *At. ferrooxidans* se mohou v přítomnosti pyritu nacházet ve dvou stavech. V jednom z těchto stavů jsou bakterie fyzicky adherované přímo na pyritu, kterých je nižší procento než planktonických, tzn. nacházející se volně v roztoku.⁵

Adherované bakterie na pyritu vykazují vyšší hydrofobicitu než planktonické bakterie, díky čemuž se snižuje povrchové napětí mezi bakterií a povrchem pyritu a tím dochází i k efektivní adhezi buněk na povrchu minerálu. Na adhezi mají podíl van der Waalsovy interakce.⁶

Planktonické bakterie jsou na základě nedávné transkripční analýzy spíše přizpůsobené k oxidaci Fe^{2+} na Fe^{3+} , kdežto bakterie adherované jsou genově uzpůsobené pro oxidaci siřných sloučenin.⁵

Byly pozorovány různé hladiny exprese genů u adherovaných bakterií oproti bakteriím planktonickým. Zvýšená exprese byla pozorována například u sulfidchinonreduktasy a tetrathionanhydrolasy u adherovaných buněk. U planktonických buněk byla zvýšená exprese u oxidoreduktasy SdrA2, cytochromu CycA1, Rieskeho proteinu a cytochromu Cyc2. Porozumění těmto rozdílům by mohlo zlepšit biotěžbu umělým převedením bakterií ze stavu planktonického do stavu adherovaného a naopak.⁵

Planktonické a adherované bakterie se také liší v produkci EPS vrstvy, na povrchu planktonických bakterií se nachází tenčí EPS vrstva než na povrchu adherovaných bakterií na pyritu.⁶

2.1.2. Extracelulární polymerní vrstva

Klíčovou funkci v přichycení se bakterie na minerální povrch má extracelulární polymerní vrstva (EPS), která je složena hlavně z polysacharidů (42 %), hexahydrátů Fe^{3+} (54 %), kyseliny glukuronové (0,5 %) a dalších složek (3,5 %). Na vnější membráně působí elektrostaticky nebo jinými typy interakcí pomocí proteinů bohatých na polární skupiny.⁷

Pokud bakterie *At. ferrooxidans* rostou na pyritu, inkorporují do své EPS vrstvy kyselinu močovou a Fe^{3+} , na rozdíl od bakterií rostoucích na síře. Byly provedeny pokusy, kdy pomocí kombinací ultrazvuku a centrifugace byla z bakterií odstraněna EPS vrstva. Takto upravené bakterie poté téměř nebyly schopny adherovat se na minerální povrch. Jakmile byly ale smíchány s EPS suspenzí, jejich schopnost přilnout k minerálnímu povrchu byla znovu obnovena. Maximální adheze bakterií na minerální povrch nastala, když k bakteriím bez EPS

vrstvy byla přidána EPS suspenze spolu s Fe^{3+} ionty, zatímco pokud byly spolu s EPS suspenzí přidány Fe^{2+} ionty, byla pozorována jen slabá adheze bakterií na povrch minerálu. ⁸

Fe^{3+} ionty zakotvené v EPS jí dávají pozitivní náboj, který umožňuje elektrochemickou interakci s negativně nabitým povrchem minerálu. ⁹

2.1.3. Pily

Kromě toho, že se EPS vrstva významně podílí na přichycení se bakterie na minerální povrch, má také podíl na shlukování bakterií a jejich následné soudržnosti. Také tvoří skelet filamentárních útvarů zvaných pily na povrchu bakterie, které jsou schopné kontrakcí takovým způsobem, aby bakterii umožnily pohyb. Počet těchto útvarů na povrchu je závislý na době kultivace. Bakterie *At. ferrooxidans* obsahuje celou řadu genů, které jsou zapojené v jejich biosyntéze. ¹⁰

2.1.4. Metabolismus železa

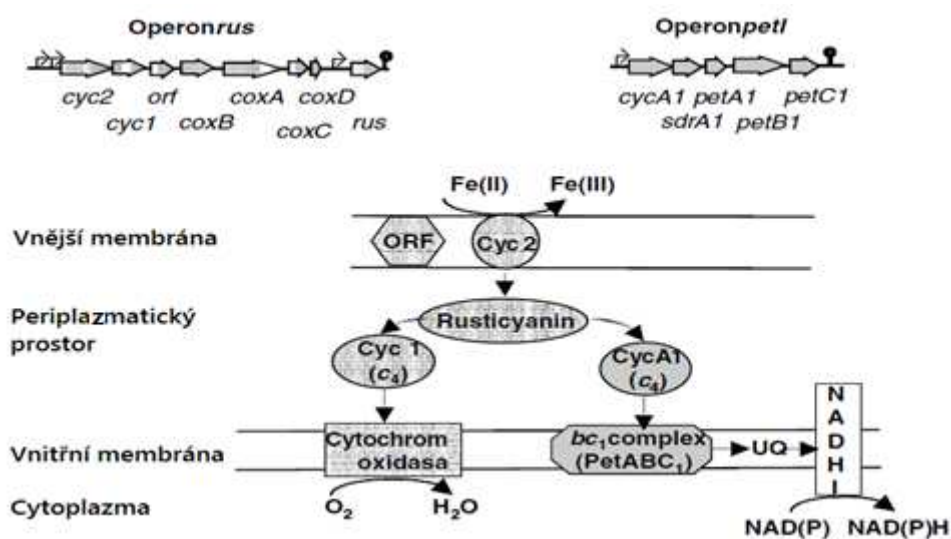
I když je bakterie *At. ferrooxidans* modelovým organismem, oxidace železa je zkoumána již několik let i u dalších acidofilních organismů. V současné době známe více možných variant modelů respiračních řetězců v závislosti na daném organismu. Nicméně všeobecně přijímaný model u bakterie *At. ferrooxidans* je založen na průkazných genetických a biochemických skutečnostech, které jsou dále potvrzovány.

Ukázalo se, že elektrony z Fe^{2+} mohou být transportovány v přímém nebo nepřímém (reverzním) elektronovém toku. Většina (asi 90 %) elektronů je transportována přímým elektronovým tokem z Fe^{2+} na kyslík, jež vede k syntéze ATP. Zbytek elektronů je transportován nepřímým elektronovým tokem z Fe^{2+} na NAD(P)^+ , jehož redukováná forma je využívána k anabolickým aktivitám jako fixace CO_2 a N_2 . ¹¹

Kvůli vysokému redoxnímu potenciálu $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ (+0,77 V při pH = 2) může být železo použito jako donor elektronu jenom v přítomnosti elektronového akceptoru s vyšším redoxním potenciálem, což je například $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ (+1,12 V při pH = 2). ¹¹

Při metabolismu železa je u této bakterie vysoce exprimován operon *rus*, který kóduje geny hlavního přímého elektronového toku respiračního řetězce a jsou to geny *cyc2* (membránový cytochrom *c*), *cyc1* (cytochrom *c*₅₅₂), *coxB* (*aa*₃ cytochrom *c* oxidasa II), *coxA* (*aa*₃ cytochrom

c oxidasa I), *coxC* (*aa₃* cytochrom *c* oxidasa III) a geny *rus* a *acoP* kódující rusticyanin a AcoP. Rusticyanin je periplazmatický modrý Cu protein, který patří mezi tzv. cupredoxiny a je důležitou komponentou respiračního řetězce, kde se podílí na transportu elektronů. Rusticyanin je též větvící bod přímého a nepřímého elektronového toku v respiračním řetězci. AcoP je periplazmatický zelený Cu protein také z rodiny cupredoxinů s vysokým redoxním potenciálem, u něž se předpokládá funkce ve stabilizaci a ochrany Cu_A centra komplexu *aa₃* cytochrom *c* oxidasy před kyselým prostředím (viz Obr. 1). Dále je exprimován *petI* operon, který kóduje geny podílející se na reverzním elektronovém toku, a to *cycA1* (cytochrom *c₄*) a geny tvořící cytochrom *bc₁* komplex I, což jsou *petA1* (ubichinoncytochrom *c* reduktasa, tzv. Rieskeho protein), *petB1* (cytochrom *b*) a *petC1* (cytochrom *c₁*). Reverzní elektronový tok naráží na bioenergetický problém standardního redukčního potenciálu, takže elektrony jsou v reverzním elektronovém toku přenášeny proti redoxnímu gradientu. Tento problém je řešen proton-motivní silou, která se přirozeně vyskytuje na membráně (pH vnější = 2, pH vnitřní = 7).^{4,12,13}



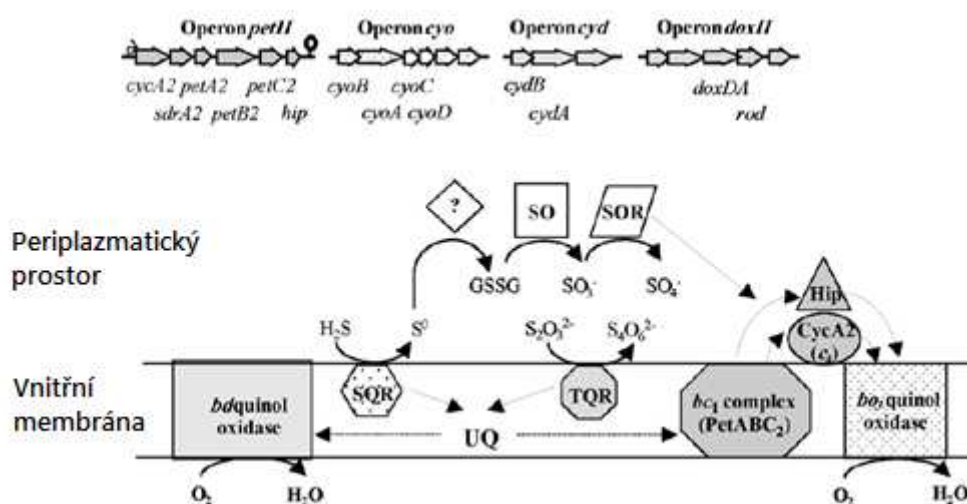
Obr. 1. Předpokládaný model oxidace železa. Cytochrom Cyc2 na vnější membráně, přenáší elektrony z Fe²⁺ na periplazmatický rusticyanin, který je předává v přímé dráze membránově vázanému cytochromu Cyc1 a odsud na cytochrom *c* oxidasu *CoxBACD*, kde je kyslík redukován na vodu. Všechny tyto proteiny jsou kódovány *rus* operonem. Reverzní dráha vede přes cytochrom *bc₁* komplex I a chinonový pool na NAD(P)⁺. Cytochrom *bc₁* komplex I a cytochrom CycA1 jsou kódovány *petI* operonem.⁴

2.1.5. Metabolismus síry

Ve srovnání s metabolizmem železa, které se vyskytuje jen ve dvou oxidačních stavech (+II a +III), síra existuje v oxidačních stavech od -II do +VI, což komplikuje identifikaci meziproductů a enzymů v oxidaci síry. Některé sirmé sloučeniny jsou oxidovány abioticky, což také ztěžuje odlišení enzymatických kroků od ryze chemických.¹³

Na metabolismu RISC se podílí celá škála různých enzymových komplexů a elektronových přenašečů lokalizovaných v různých buněčných kompartmentech. Oxidaci sulfidu HS- zajišťuje sulfidchionreduktasa, která je kódovaná genem *sqr*. Produktem oxidace elementární síry je siřičitan, který je dále pravděpodobně zpracováván síranadenylyltransferasou, která je kódovaná genem *sat*. V sirmém metabolismu se dále vyskytuje operon *hdr* kódující heterodisulfidreduktasový komplex, *tusA* a *drsE* geny, jejichž funkce ještě nebyla zcela objasněna, ale pravděpodobně se účastní oxidace aktivované síry pomocí glutathionu (GSSH, GSSG) na siřičitan.¹⁴

V sirmém metabolismu se více exprimují geny operonů *cyd*, *cyo*, *dox* a *petII*. Operon *cyd* kóduje geny *cydA* a *cydAB* pro *bd* ubichinonoxidasu. Operon *cyo* kóduje geny *cyoABCD* pro *bo3* ubichinonoxidasu. Operon *dox* obsahující *doxDA* gen pravděpodobně kóduje thiosírandehydrogenasu. Operon *petII* kóduje geny *cycA2* (cytochrom *c4*), *hip* (HiPIP – FeS protein s vysokým redoxním potenciálem) a geny cytochrom *bc1* komplexu II jako *petA2* (Rieskeho protein), *petB2* (cytochrom *b*), *petC2* (cytochrom *c1*) (viz Obr. 2).⁴



Obr. 2. Předpokládaný model oxidace síry. Cytochrom *bc1* komplex II je v tomto případě kódován operonem *petII* a získává elektrony z ubiquinonu. Ty pak přenáší na membránově vázaný cytochrom CycA2 nebo na periplazmatický HiPIP, které je dále přenášejí na terminální oxidasu, kde se redukuje kyslík na vodu. Nerozpustná síra je přeměňována na glutathion disulfid (GSSG). Následuje kaskáda enzymových transferas a elektrony jsou předávány až na terminální oxidasu. (TQR – thiosíranchionreduktasa, SQR – sulfidchionreduktasa)⁴

2.2. Thiosírandehydrogenasa

Thiosírandehydrogenasa TDH (také thiosíranchinonoxidoreduktasa, TQO) je enzym, pravděpodobně tetramer, sestávající ze čtyř identických podjednotek o molekulové hmotnosti 45 000 Da. Optimální pH pro aktivitu thiosírandehydrogenasy je 3,0.¹⁵

Její enzymová aktivita byla detekována v bakteriích *At. ferrooxidans* ATCC 19859, rostoucích na síře i na železe. U bakterií rostoucích na síře, však byla aktivita přibližně 20x vyšší než u bakterií rostoucích na železe, což indikuje, že exprese tohoto enzymu je regulována substrátem, na kterém kultura roste.¹⁶

Aktivita thiosírandehydrogenasy byla také nalezena v membráně termoacidofilní archebakterie *Acidianus ambivalens*. Elektronovými přenašeči zde byly ferrikyanid a decyl ubichinon. Enzymová aktivita thiosírandehydrogenasy byla inhibována siřičitanem. Holoenzym byl složen ze dvou podjednotek o velikosti 28 kDa a 16 kDa. Ukázalo se, že větší podjednotka je identická s proteinem DoxA a menší s proteinem DoxD, obě tyto podjednotky byly dříve popsány jako součást komplexu cytochromu *aa*₃.¹⁷

Thiosíran je sirná sloučenina, která se v metabolismu RISC může oxidovat přes tetrathionan a další sirné sloučeniny až na síran, jako finální produkt těchto oxidací. Thiosírandehydrogenasa katalyzuje oxidaci thiosíranu na tetrathionan. Tato reakce probíhá v periplazmatickém prostoru bakterie.¹⁵

2.2.1. Gen pro thiosírandehydrogenasu

V mikroorganismech byly nalezeny nejméně čtyři metabolické cesty oxidace thiosíranu. První z nich byl popsán u bakterie *Thiobacillus versutus* (nyní známá jako *Paracoccus versutus*), která využívá k oxidaci thiosíranu multi-enzymový Sox komplex. Geny kódující Sox komplex byly nalezeny např. u bakterií *Acidithiobacillus caldus* a *Acidithiobacillus thiooxidans*, ale u bakterie *At. ferrooxidans* prokázány nebyly. Druhá metabolická cesta byla prokázána u bakterie *Starkeya novella*, která také má Sox komplex, i když neúplný a k oxidaci thiosíranu navíc využívá další membránově vázaný multienzymový komplex. Třetí metabolickou cestu využívají bakterie *At. ferrooxidans*, *Thermithiobacillus*, *Halothiobacillus*, *Acidiphilium* a *Tetrathiobacter*. Tyto bakterie oxidují thiosíran přes tetrathionan pomocí thiosírandehydrogenasy, nicméně tyto geny nebyly dosud popsány. Prvním z identifikovaných genů pro thiosírandehydrogenasu byl *tsdA* gen popsán u bakterie

Allochromatium vinosum. Tento gen nebyl nalezen u žádné z bakterií z rodu *Acidithiobacillus*. Čtvrtá metabolická cesta byla nalezena u bakterie *Acidianus ambivalens*, kde je thiosíran metabolizován membránově vázaným enzymem thiosíranchinonoxidoreduktasou (TQO). Geny, které pravděpodobně kódují TQO byly nalezeny u bakterií *At. ferrooxidans*, *At. caldus*, *At. thiooxidans* a *At. ferrivorans*, ale biochemická funkce TQO ještě nebyla úplně objasněna.^{18,19}

Gen pro TDH byl identifikován na lokusu AFE_0042 u bakterie *At. ferrooxidans* ATCC 23270. Je to gen o velikosti 810 bp a kóduje protein o 270 aminokyselinách a velikosti 25 kDa. Prvních 37 aminokyselin tvoří signální peptid. Ukázalo se, že exprese genu na lokusu AFE_0042 je výrazně zvýšená u bakterií rostoucích na síře nebo na thiosíranu oproti bakteriím rostoucím na železe.¹⁸

Odpovídající gen byl původně anotován jako gen kódující protein s doménou vyskytujících se u proteinů, jež jsou součástí twin-arginin translokační dráhy.¹⁹

2.3. Tetrathionanhydrolasa

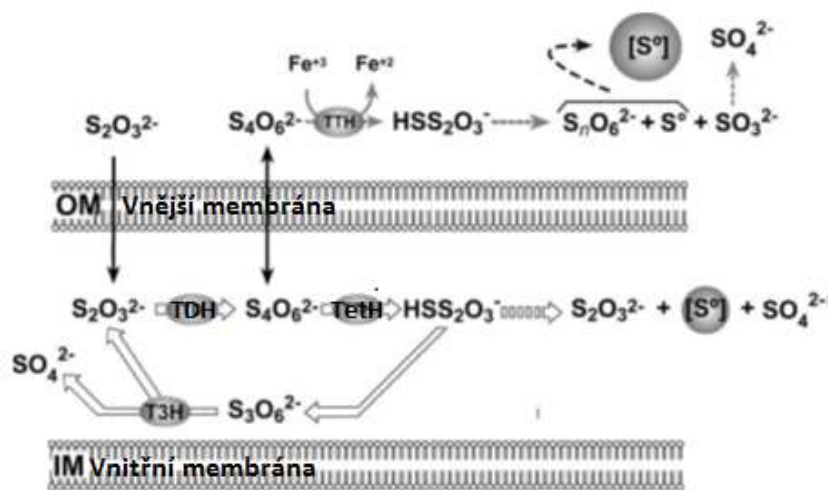
Tetrathionanhydrolasa (TTH) je pravděpodobně dimer sestávající ze dvou identických podjednotek o molekulové hmotnosti přibližně 52 kDa. Optimální hodnota pH pro aktivitu enzymu je 3,0 stejně jako u thiosírandehydrogenasy. Podílí se na oxidaci redukovaných sirných sloučenin rozkladem tetrathionanu způsobem, který nebyl zatím jednoznačně stanoven.²⁰

Tento enzym má rozdílnou lokalizaci v závislosti na bakteriálním druhu, ve kterém se vyskytuje. U bakteriálních druhů *At. caldus* KU ATCC 51756, *At. thiooxidans* ON 107, *Ap. acidophilum* DSM 700 a *At. ferrooxidans* ATCC 19859 byl lokalizován v periplazmě, kdežto u bakteriálních druhů *At. ferrooxidans* Funis 2-1 a *At. ferrooxidans* ATCC 23270 byl popsán jako membránově vázaný enzym.²¹

Výslednými sloučeninami této metabolické cesty jsou $S_2O_3^{2-}$, SO_4^{2-} a S^0 . Možným intermediátem je velmi reaktivní kyselina disulfan-monosulfanová ($HS_2SO_3^-$) nebo polythionany, které jsou však velmi reaktivní a ihned se rozpadají.²⁰

Některé studie naznačují, že aktivita tetrathionanhydrolasy je zodpovědná za produkci nápadných extracelulárních sirných globulárních útvarů, které byly pozorovány při aerobní i mikroaerobní kultivaci bakterie *At. ferrooxidans* na thiosíranu. U těchto kultivací byla

zaznamenána extracelulární aktivita tetrathionanhydrolasy, která by mohla být vysvětlením pro tato extracelulární depozita elementární síry. Samotný enzym byl v extracelulární frakci také identifikován i v extracelulární frakci. Nicméně mechanismus produkce těchto sirných globulárních útvarů u bakterií oxidujících sírné sloučeniny, nebyl dosud ještě objasněn (viz Obr. 3).²²



Obr. 3. Předpokládaný model produkce extracelulárních sirných globulárních útvarů u bakterie *At. ferrooxidans*.²²

2.3.1. Gen pro tetrathionanhydrolasu

Gen pro TTH (*tetH*) se nachází na lokusu AFE_0029 u bakterie *At. ferrooxidans* ATCC 23270, o celkové velikosti 449 aminokyselin obsahující signální peptid o velikosti 32 aminokyselin. Protein bez signálního peptidu má velikost 49 714 Da a je považován za protein vázaný na vnější membráně zapojený do sírného metabolismu. Tetrathionanhydrolasa byla detekována u bakterií rostoucích na síře, tetrathionanu i na pyritu jako hlavní zdroje energie. To naznačuje, že tetrathionan i produkt jeho hydrolýzy, thiosíran, jsou meziprodukty sírného metabolismu bakterie *At. ferrooxidans*.²¹

Tetrathionanhydrolasa byla heterologně exprimována u bakterie *E. coli*. Nicméně protein se syntetizoval pouze v inaktivní formě inkluzních tělísek.²¹

2.4. Pyrit

Pyrit je minerál, který patří mezi sulfidy kovů a je nejrozšířenějším sulfidickým minerálem naší planety. Má chemický vzorec FeS_2 a jeho Fe i S atomy jsou vázány v krystalické mřížce. Stejně jako podobné sulfidy MoS_2 (molybdenit) a WS_2 (tungstenit) se skládá ze dvou atomů síry, které tvoří ne vazebné orbitály. Vazby v pyritu mohou být přerušeny jen vícestupňovým elektronovým přenosem za pomoci silného oxidovadla, jako je například Fe^{3+} iont. U některých jiných sulfidů kovů může vazbu mezi S atomem a atomem kovu přerušit i proton odebráním elektronů z valenční vrstvy. Jsou to například CuFeS_2 (chalkopyrit), FeS (troilit), ZnS (sfalerit), PbS (galenit) a další. Tyto sulfidy kovů jsou relativně rozpustné v kyselině, kdežto pyrit je v kyselině nerozpustný.³

2.5. Bioloužení

Bioloužení je proces získávání vzácných kovů z rud s nízkým obsahem těchto kovů pomocí mikroorganismů. K mikroorganismům, které jsou schopné převádět sulfidy kovů do rozpustné formy, patří jak acidofilní bakterie, tak archebakterie. Kromě kmene Proteobacteria (hlavně rody *Acidithiobacillus*, *Acidiphilium*, *Acidiferrobacter*, *Ferrovum*), se k bioloužícím organismům řadí dále bakteriální kmeny Nitrospirae (*Leptospirillum*), Firmicutes (*Alicyclobacillus*, *Sulfobacillus*) a Actinobacteria (*Ferrimicrobium*, *Acidimicrobium*, *Ferrithrix*).³

Bioloužící bakterie se musí vypořádat s problémem nedostatku anorganického fosfátu (P_i), který je pro všechny živé organismy nezbytný. Tento nedostatek je způsoben srážením P_i v prostředí bohatém na Fe^{3+} ionty na ve vodě nerozpustný FePO_4 . Bylo zjištěno, že bakterie *At. ferrooxidans* a některé další bioloužící bakterie dokáží hromadit zásoby anorganických polyfosforečnanů a využívat je jako alternativní zdroj P_i .³

Byl popsán přímý a nepřímý mechanismus bioloužení. Přímý mechanismus bioloužení znamená přímý přenos elektronu ze sulfidu kovu do buňky přisedlé na minerálním povrchu. Nepřímý mechanismus bioloužení zprostředkovávají Fe^{3+} ionty, které jsou produkovány jak planktonickými bakteriemi, tak i těmi adherovanými.³

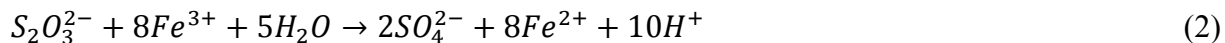
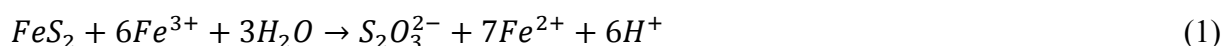
Oxidace sulfidů kovů byla popsána dvěma různými mechanismy – (a) thiosíranovým mechanismem, kterým se pravděpodobně oxiduje pyrit, a (b) polysulfidovým mechanismem, kterým dochází k oxidaci v kyselině rozpustných sulfidů. Tvorba meziproductů sirných

sloučenin v těchto procesech záleží na složení daného sulfidu kovu a také na parametrech okolního prostředí, hlavně na hodnotách pH. Meziprodukty jsou nejprve tvořeny díky rozkladu sulfidů a následně jsou oxidovány metabolickou činností mikroorganismů, které oxidují ionty Fe^{2+} na Fe^{3+} . Acidofilní sírné mikroorganismy mohou katalyzovat oxidaci sírných meziproduktů až na kyselinu sírovou.³

2.5.1. Thiosíranový mechanismus

Pyrit je pomocí Fe^{3+} iontu oxidován na první rozpustný sírný meziprodukt, kterým je thiosíran ($S_2O_3^{2-}$). Ten je téměř ihned oxidován na tetrathionan chemicky pomocí Fe^{3+} nebo enzymaticky za účasti thiosírandehydrogenasy. Tetrathionan je pak pomocí tetrathionanhydrolasy degradován na síran za vzniku dalších sírných sloučenin jako je elementární síra a thiosíran. Tyto sírné sloučeniny jsou dále biochemicky oxidovány na konečný produkt, síran (viz Obr. 4).

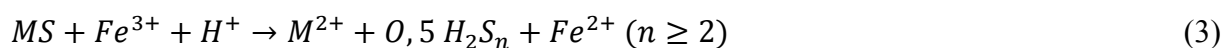
Thiosíranový mechanismus se dá shrnout následujícími sumárními rovnicemi 1 – 2:³

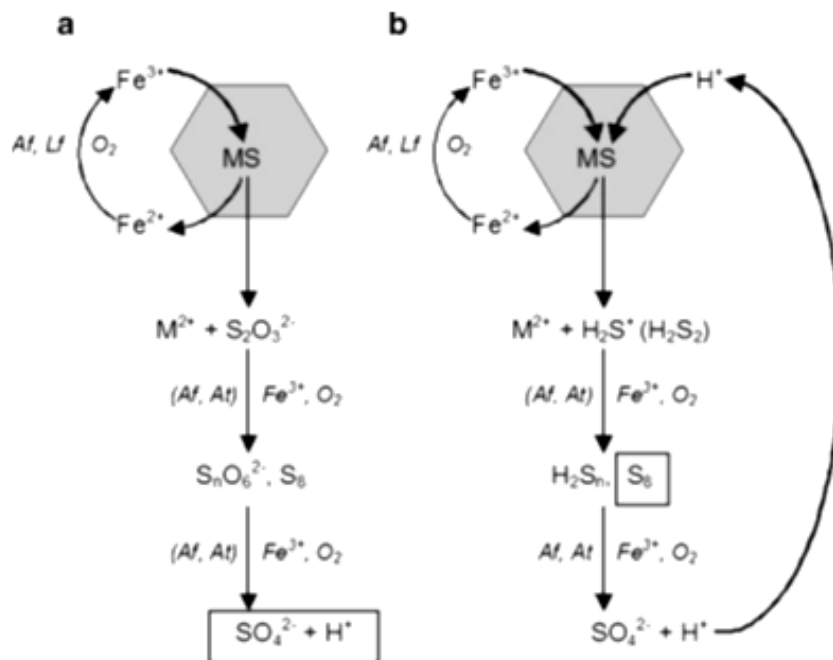


2.5.2. Polysulfidový mechanismus

Ve srovnání s oxidací pyritu je u sulfidů, které jsou rozpustné v kyselině, nejprve přerušena vazba mezi kovem a sulfidem pomocí protonů z kyselého prostředí, a teprve poté dochází k oxidaci sírných sloučenin. Při nízkém pH se sírná část tohoto sulfidu oxiduje hlavně na elementární síru (S_8). Ačkoliv je elementární síra chemicky inertní, v přírodních podmínkách dochází kvůli aktivitě mikroorganismů k její oxidaci na kyselinu sírovou.

Polysulfidový mechanismus (viz Obr. 6) se dá shrnout následujícími sumárními rovnicemi 3 – 5:³





Obr. 4. Schémata bioloužení. A) thiosíranový mechanismus, B) polysulfidový mechanismus.³

2.5.3. Využití při těžbě mědi

Bakterie *At. ferrooxidans* je hojně využívána při biotěžbě nebo bioloužení především pro získávání mědi z chalkopyritu. Technologie bioloužení obecně využívá metabolické činnosti vhodného konsorcia bakterií pro získávání kovů z minerálů jejich převedením na rozpustnou formu. Dalšími kovy, které se takto získávají, jsou například zlato, stříbro, kobalt, nikl, zinek a uran.³

Většina ze známých acidofilních bakterií oxidujících železo, je inhibována vysokými koncentracemi chloridových iontů, což ztěžuje biotěžbu v pouštních oblastech Chile nebo Austrálie, kde je nedostatek sladkovodních zdrojů. Nicméně právě v severní Chile byly objeveny halotolerantní, acidofilní bakterie, které jsou schopné aktivně oxidovat železo až do koncentrace 1 M NaCl.³

Při získávání mědi biotěžbou nedochází k uvolňování oxidu siřičitého a arsenu, jako při klasické těžbě, ale musí se zabránit úniku kyseliny sírové, jež je během biotěžby bakteriálně produkována. Biotěžba zajišťuje 10 % světové produkce mědi a některé haldy mohou být značně rozsáhlé. Jedna z největších hald používající tuto technologii je zřízena v

dole Escondida v poušti Atacama v severní Chile. Bioloužící halda je 5 km dlouhá, 2 km široká a 126 m vysoká. ³

Drcená ruda s obsahem mědi se nashromáždí do haldy, je pokropena kyselinou sírovou a provzdušněna k iniciaci bakteriální oxidace sloučenin železa a síry. Prvním krokem procesu je oxidace Fe^{2+} na Fe^{3+} a druhým krokem je oxidace Cu^+ na více rozpustnou Cu^{2+} za současné redukce Fe^{3+} zpět na Fe^{2+} . Současně dochází k produkci kyseliny sírové biologickou oxidací redukovaných sloučenin síry, což také přispívá ke zvyšování rozpustnosti mědi. Měď je potom z kyselého roztoku získávána pomocí fyzikálně-chemických technologií za použití rozpouštědel nebo elektrolyticky. ¹

2.6. Molekulární analýza RNA

Existuje více molekulárních metod pro analýzu transkriptomu – kompletní sady molekul RNA organismu. Nejvíce se používají metody RT-PCR a Northernův přenos, využívají se ale i DNA mikročipy a různé další modifikace těchto metod. Molekuly RNA jsou citlivé na degradaci RNasami, proto se musí zabránit kontaminaci vzorku těmito stabilními enzymy.²³

Reverzně transkripční PCR (RT-PCR) využívá enzymu reverzní transkriptasy, která katalyzuje syntézu řetězců cDNA komplementárních k mRNA templátům. Řetězce cDNA mohou být syntetizovány za použití oligo(dT) primerů, které nasedají na 3'-poly(A)-konce všech mRNA nebo specifických oligonukleotidových primerů. PCR potom zahrnuje tři kroky, v prvním kroku je DNA obsahující sekvence, které mají být amplifikovány, denaturována zahřátím na 92 – 95 °C po dobu asi 30 sekund, ve druhém kroku je DNA hybridizována s nadbytkem specifických primerů při teplotě 50 – 60 °C po dobu asi 30 sekund a ve třetím kroku je použita DNA-polymeráza k replikaci úseku DNA mezi komplementárními místy ke specifickým primerům při teplotě 70 – 72 °C po dobu asi 90 sekund. V následujícím cyklu dojde k denaturaci produktů z předchozího cyklu a proces se opakuje, dokud není dosaženo potřebné amplifikace.²³

Northernův přenos se používá ke studiím genové exprese. Je to přenos molekul RNA separovaných pomocí gelové elektroforezy na membránu. Většina molekul RNA má sekundární strukturu a musí během elektroforezy zůstat denaturovaná, aby došlo k separaci na základě velikosti. Denaturace se provádí přidávkem formaldehydu nebo jiného denaturačního činidla do elektroforetického pufru. Po přenosu na membránu se RNA imobilizuje pomocí UV záření nebo vysušením a hybridizuje se značenými RNA nebo DNA sondami.²³

Pro analýzu celých genomů se využívají mikročipy. Nukleotidové sekvence specifické pro konkrétní gen se navážou na membránu ve specifickém uspořádání. Tyto matrice se potom hybridizují se značenými RNA nebo cDNA, jejichž množství se dále zjišťuje skenováním, kdy se měří množství radioaktivity nebo fluorescence, podle typu značení. Výsledky se analyzují na základě srovnání se signálem známých kontrolních sond.²³

3. Cíle práce

1. Purifikace vybraných proteinů metabolismu sirných látek a identifikace jejich genů
2. Optimalizace separace planktonických a adherovaných buněk *At. ferrooxidans* rostoucích na pyritu
3. Analýza exprese vybraných genů sirného metabolismu v kulturách *At. ferrooxidans* rostoucích na pyritu

4. Experimentální část

4.1. Materiál a metody

4.1.1. Mikroorganismus a kultivační podmínky

Všechny experimenty byly prováděny s bakterií *At. ferrooxidans* CCM 4253 původem ze Zlatých Hor v Jeseníkách. Tento kmen je na základě sekvenace genu pro 16S rRNA (GenBank: EF465493) téměř 100% identický s kmenem bakterie *At. ferrooxidans* ATCC 23270.

4.1.2. Média

4.1.2.1. Kultivace bakterií rostoucích na Fe^{2+}

Bakteriální kultura byla kultivována v 9K médiu (viz Tabulka 2) ²⁴. Každá složka byla sterilizována varem. Po vychladnutí na laboratorní teplotu se smíchaly složky A1 a A2 za vzniku složky A. Tato složka byla přidána ke složce B a za stálého míchání byly přidány 2 ml složky C. Kultivace probíhala na rotační třepačce při 28 °C a pH bylo udržováno pod 1,8 pomocí kyseliny sírové. Vyrostlá kultura (obvykle po 3 dnech) byla sklizena centrifugací (15 000 × g, 10 min, 4 °C) a získané buňky byly promyty médiem s obsahem základních solí (viz Tabulka 4). Takto připravené buňky byly použity jako inokulum pro následné kultivace na tetrathionanu a pyritu.

Tabulka 2. Složení 9K kultivačního média

Složka	Jednotlivé složky	Množství na 1 l média
A1	dH ₂ O	600 ml
	(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0 g
	KCl	0,1 g
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5 g
A2	dH ₂ O	100 ml
	K ₂ HPO ₄	0,5 g
B	dH ₂ O	300 ml
	FeSO ₄ · 7 H ₂ O	44,2 g
C	dH ₂ O	100 ml
	Ca(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	0,71 g

4.1.2.2. Kultivace bakterií rostoucích na tetrathionanu

Pro účely purifikace enzymů tetrathionanhydrolasy a thiosírandehydrogenasy byly bakteriální železité kultury adaptovány na tetrathionan a poté pěstovány v bioreaktoru o objemu 10 l v růstovém médiu se složením uvedeným v Tabulce 3. Jako substrát sloužil tetrathionan draselný ve složce B, která byla před přidáním do složky A sterilizována membránovou filtrací přes TM (0,22 μm). Jednotlivé složky byly sterilizovány varem.

Tabulka 3. Složení tetrathionanového kultivačního média.

Složka	Jednotlivé složky	Množství na 1 l média
A	dH ₂ O	980 ml
	(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0 g
	KCl	0,1 g
	K ₂ HPO ₄	0,5 g
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5 g
	Ca(NO ₃) ₂	0,01 g
B	dH ₂ O	20 ml
	K ₂ S ₄ O ₆	2,0 g

Kultivace probíhala na elektromagnetické míchačce (300 rpm) při 28 °C za nepřetržitě aerace. Počáteční pH bylo okolo 4. Indikátorem růstu bakterií na tetrathionanu byl pokles pH k hodnotám 1 – 2 a vznik zákalu. Doba kultivace se pohybovala okolo 14 dnů. Vyrostlé bakteriální kultury byly asepticky sklizeny centrifugací při 15 000 × g po dobu 10 min a 4 °C.

Bakteriální pelet byl dále promyt v mediu s obsahem základních solí a uskladněn při teplotě -70 °C.

4.1.2.3. Kultivace bakterií rostoucích na pyritu

Pro účely stanovení exprese vybraných genů siřného metabolismu u buněk rostoucích na pyritu byly železité buňky kultivovány v mediu s obsahem základních solí (viz Tabulka 4) a pyritu v koncentraci 10 g/l. Pyrit (separovaný přírodní materiál o průměru částic 40µm) byl před použitím sterilizován převařením ve vodě o pH = 1,3 a ponechán za stálého míchání 24 hodin. Kyselá voda z něj byla poté asepticky odsáta a tím i odstraněna značná část Fe³⁺ a jiných kovových kontaminantů, jež jsou při nízkém pH rozpustné. Každá složka media s obsahem základních solí byla sterilizována varem. Po vychladnutí na laboratorní teplotu se smíchaly složky A1 a A2 za vzniku složky A, ke které byly za stálého míchání přidány 2 ml složky B.

Tabulka 4. Složení média s obsahem základních solí.

Složka	Jednotlivé složky	Množství na 1l média
A1	dH ₂ O	900 ml
	KCl	0,1 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0 g
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5 g
A2	dH ₂ O	100 ml
	K ₂ HPO ₄	0,5 g
B	dH ₂ O	100 ml
	Ca(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	0,71 g

Kultivace probíhala v 10 l bioreaktoru na elektromagnetické míchačce (400 rpm) při 28 °C za nepřetržitě aerace. Kultivace trvaly zpravidla 14 dní, během kterých byly v pravidelných intervalech odebírány vzorky bakteriální populace, u nichž byly sledovány základní kinetické parametry kultury. Bylo testováno několik postupů zpracování pyritových bakteriálních kultur, které jsou popsány níže.

4.1.3. Sběr a zpracování bakterií rostoucích na pyritu

Pro účely následujících molekulárně-biologických analýz byly bakteriální kultury rostoucí na pyritu homogenně odebírány každý třetí den v objemu 250 – 300 ml.

4.1.3.1. Sběr frakce planktonických bakterií

Pyrit s frakcí adherovaných bakterií byl z média odstraněn papírovou filtrací. Filtrát, ve kterém se nacházely planktonické bakterie, byl centrifugován při $15\,000 \times g$ po dobu 10 min při 4 °C. Bakteriální pelet byl dále promyt ($10\,000 \times g$, 10 min, při 4 °C.) v médiu s obsahem základních solí a uskladněn při teplotě -70 °C.

4.1.3.2. Sběr frakce bakterií adherovaných na pyritu

A) Dekantace pomocí oscilačního mlýnku

Papírovou filtrací zachycený pyrit byl opatrně promyt médiem s obsahem základních solí, aby se odstranily případné zbylé planktonické bakterie. Poté byl pyrit smíchán s 8 ml média s obsahem základních solí a protřepáván na oscilačním mlýnku se skleněnými mikrokuličkami. Optimalizace této metody byla prováděna s variabilními průměry skleněných mikrokuliček, za použití různých frekvencí a času oscilace. Následně byla provedena další papírová filtrace, kde došlo k záchytu pyritu a skleněných perel. Filtrát byl centrifugován ($10\,000 \times g$ po dobu 10 min, při 4 °C) a takto byla získána frakce adherovaných bakterií. Bakteriální pelet byl uskladněn při -70 °C.

B) Dekantace pomocí ultrasonikace

Papírovou filtrací zachycený pyrit byl opět opatrně promyt médiem s obsahem základních solí, aby došlo k odstranění možných zbylých planktonických bakterií. K takto promytému pyritu a na něm adherovaným bakteriím byly přidány 3 ml deionizované vody o pH = 1,5 a homogenní směs byla rozdělena do tří zkumavek. Vzorky byly vortexovány 5 s, a poté vloženy do ultrasonické lázně (Branson Ultrasonic Bath, M Series) při 4 °C a frekvenci 40 kHz po různé časové intervaly. Poté byly vzorky papírově filtrovány, filtráty uschovány a stejný postup byl opakován ještě jednou. Získané uvolněné bakterie z obou kroků byly smíchány a uskladněny při -70 °C.

4.1.4. Příprava buněčného cytosolu

K mechanickému narušení bakteriální stěny se silnou vrstvou EPS byl využit cyklus ultrasonických vysokofrekvenčních pulzů v pravidelných krátkých intervalech při 4 °C, aby nedošlo k nadměrnému přehřívání buněk a denaturaci proteinů. Biomasa byla rozsuspendována v 50 mM Tris/HCl pufru o pH 3. Díky nízkému pH tohoto pufru bylo zajištěno srážení a oddělení proteinů, jež jsou nestabilní v kyselém pH. Tento krok byl primárním krokem purifikace cílových sirných enzymů. Pro sonikaci byl použit přístroj Sono plus HD 2200 s hrotem TT3.

Dále byl vzorek umístěn do oscilačního mlýnku s 0,5 g skleněných mikrokuliček (balotina) o průměru 0,17 – 0,18 mm. Frekvence oscilace byla 30 Hz po dobu 20 min.

Po rozrušení buněčných membrán byl vzorek centrifugován při $40\,000 \times g$ po dobu 40 min a teplotě 4 °C. Supernatant reprezentující celkový buněčný cytosol s proteiny byl uskladněn při -20 °C.

4.1.5. Kinetická měření

4.1.5.1. Stanovení pH

Ke stanovení pH byla použita elektroda (Radiometer) a pH metr – PHM 93 (Radiometer Copenhagen)

4.1.5.2. Stanovení koncentrace Fe^{3+} iontů

Stanovení koncentrace Fe^{3+} iontů probíhalo na spektrofotometru ULTRASPEC 2000, Pharmacia Biotech při vlnové délce 300 nm²⁵. Jako slepý vzorek sloužila voda o pH = 0,5 (upraveno pomocí H_2SO_4), která se používala i na samotné ředění vzorku. Vzorek byl 100x ředěný. Koncentrace železitých iontů bez zahrnutí ředění vzorku byla vypočítána na základě lineární kalibrace metody podle vztahu:

$$Fe^{3+} [mg \cdot l^{-1}] = \frac{30 \cdot A_{300}}{1,13}$$

4.1.5.3. Stanovení počtu bakterií ve vzorku

Stanovení počtu bakterií bylo prováděno mikroskopicky pomocí optického mikroskopu BX50 (Olympus). Byla použita komůrka Cyrus II a výsledek byl získán pomocí vzorce:

$$\frac{\text{počet buněk}}{1 \text{ ml}} = \emptyset \text{ počet buněk} \times \text{ředění} \times 2 \times 10^6$$

4.1.6. Stanovení enzymové aktivity

4.1.6.1. Stanovení aktivity tetrathionanhydrolasy

Aktivita tetrathionanhydrolasy byla spektrofotometricky stanovována jako nárůst absorbance za čas při vlnové délce 300 nm. Byla sledována tvorba síranu draselného po přidání enzymu projevující se jako bílá sraženina. Slepým vzorkem pro toto měření byla reakční směs bez přidaného enzymu. Reakční směs obsahovala 1 M síranový pufr o pH = 2,8 (upraveno H₂SO₄) a 10 mM K₂S₄O₆.

4.1.6.2. Stanovení aktivity thiosírandehydrogenasy

Aktivita thiosírandehydrogenasy byla spektrofotometricky stanovována jako pokles absorbance za čas při vlnové délce 420 nm. Pokles absorbance byl způsoben úbytkem hexakyanoželezitanu draselného po přidání enzymu projevující se jako postupné odbarvování se žluté reakční směsi. Slepým vzorkem byla reakční směs bez přidaného enzymu. Reakční směs obsahovala 50 mM acetátový pufr o pH = 5,0, 1 mM K₃Fe(CN)₆ a 5 mM Na₂S₂O₃.

4.1.7. Purifikace proteinů

4.1.7.1. Afinity chromatografie (AC)

K afinitní chromatografii na systému Pharmacia LKB FPLC byla použita kolona naplněná sorbentem Sepharose CL-4B s imobilizovaným cytochromem *c*, která byla již dříve připravena a použita pro purifikaci thiosírandehydrogenasy.²⁶

Nejprve byl systém promyt 50 mM Tris/HCl puftrem o pH = 7,0 s přidavkem 2 M NaCl. Vysoká iontová síla zajistila důkladné promytí kolony od případných předešlých navázaných kontaminantů. Poté se kolona promyla Tris/HCl puftrem pro odstranění veškeré soli. Vzorek

buněčného cytosolu, ve kterém byla předem spektrofotometricky zjištěna tetrathionanhydrolasová a thiosírandehydrogenasová aktivita, byl aplikován v objemu 10 ml (4 ml cytosolu + 6 ml Tris/HCl pufru) a nechal se opakovaně protékat kolonou při nízkém průtoku tak, aby se požadované proteiny byly schopny zachytit na koloně. Eluce navázaných proteinů byla poté provedena jednorázovým přídávkem 50 mM Tris/HCl pufru s 2 M NaCl, kdy došlo k uvolnění proteinů z kolony. U výsledného vzorku byla spektrofotometricky ověřena aktivita požadovaných enzymů.

4.1.7.2. Ionexová chromatografie (IEC)

K ionexové chromatografii byla použita katexová kolona Mono S HR 5/5. Systém byl ekvilibrován 50 mM citrátovým pufrům o pH = 3,0 a do systému byl aplikován vzorek. Na koloně docházelo k zachytávání částic s kladným nábojem, včetně enzymů tetrathionanhydrolasa a thiosírandehydrogenasa, které v daném pH mají celkově kladný náboj. Poté byly proteiny postupně eluovány v lineárním gradientu 0-2 M NaCl v 50 mM citrátovém pufru o pH = 3,0. TTH a TDH aktivita byla u frakcí ověřována spektrofotometricky.

4.1.8. Ultrafiltrace vzorku

Pro další práci se vzorkem bylo třeba jej odsolit a zahustit. Pro tyto účely byla použita nízkoobjemová ultrafiltrační cela Amicon s membránou ULTRACEL propustnou pouze pro molekuly o velikosti menší než 3 kDa. Ve vzorku byla poté spektrofotometricky ověřena TTH a TDH aktivita.

4.1.9. SDS-PAGE

Pro SDS-PAGE byly vytvořeny 5% koncentrační gel (celkový objem 5 ml) a 10% separační gel (celkový objem 10 ml) o složení uvedeném v Tabulce 5.

Tabulka 5. Složení koncentračního a separačního gelu pro SDS-PAGE

5% koncentrační gel		10% separační gel	
Látka/roztok	Objem (ml)	Látka/roztok	Objem (ml)
30% akrylamid + BIS	0,85	30% akrylamid + BIS	3,35
1 M Tris/HCl, pH = 6,8	0,625	1,5 M Tris/HCl pH = 8,8	2,5
10% persíran amonný	0,05	10% persíran amonný	0,1
10% SDS	0,05	10% SDS	0,100
TEMED	0,005	TEMED	0,005
H ₂ O	3,4	H ₂ O	3,95

Elektroforetická aparatura (Bio-Rad Mini-Protean®) byla připojena ke zdroji stejnosměrného napětí a byl nastaven konstantní proud 30 mA. Elektroforéza probíhala tak dlouho, dokud zóna bromfenolové modři nedoputovala až ke spodnímu okraji gelu. Gel byl poté obarven pomocí Coomassie Brilliant Blue R250 a skenován na denzitometru Bio-Rad GS-800TM. Vybrané bandy byly vyřezány skalpelem.

4.1.10. LC-MS/MS analýza

Pro přípravu vzorku byla použita in-gel digesce s trypsinem (2h, 40 °C, c = 5 ng/μl v hydrogenuhličitan amonném pufru).

Analýza proběhla na RSLCnano + Impact II (Bruker Daltonics), data z hmotnostní spektrometrie byla zaznamenána hmotnostním spektrometrem Qq-Time-Of-Flight (QqTOF) s rozlišením přes 50 000.

MS/MS data byla kalibrována (podle měrného náboje 1222 *m/z*) a byla srovnána s databází UniProt_AF_ATCC23270_final.

4.1.11. Manipulace s RNA

Celková RNA byla izolována pomocí komerčního kitu TRI Reagent® (Sigma) s následnou purifikací na kolonkách Direct-zolTM RNA MiniPrep (Zymogene Research) dle pokynů výrobce. Odstranění zbytkové DNA bylo provedeno v mezikroku purifikace na kolonkách použitím DNasy I (Thermo Scientific) podle pokynů výrobce.

Stanovení koncentrace a čistoty RNA bylo provedeno na přístroji NanoPhotometer. Z koncentrace RNA bylo vypočteno takové ředění, aby výsledná koncentrace vzorků byla u všech stejná, a to 0,1 µg/µl. Vzorky byly naředěny formamidem.

4.1.12. Reverzní transkripce a real-time PCR

Relativní exprese genů byla analyzována reverzně-transkripční kvantitativní PCR (RT-qPCR) s použitím fluorescenčního interkalačního barviva SYBR Green v Light Cyclers 480 (Roche). Reverzní transkripce byla provedena pomocí kitu ImProm-II Reverse Transcription System (Promega). cDNA byla amplifikována pomocí qPCR s použitím specifických primerů (Tabulka 6) a GoTaq qPCR Master Mixu (Promega) podle pokynů výrobce.

Amplifikace probíhala v následujících cyklech: 35 cyklů DNA denaturace při 95 °C po dobu 20 min a nasednutí primerů a prodlužování při teplotě 60 °C po dobu 40 s. Každá analýza probíhala vždy v triplikách. Míra relativní exprese každého genu v daném dni kultivace byla vztažena k vnitřní kontrole, tzv. normalizačnímu faktoru a poté k nultému dni kultivace. Normalizační faktor byl vypočten ze tří konstitutivně se exprimujících genů (*rrs*, *map*, *alaS*). Takto byla zajištěna kvantifikace genové exprese vztahující se k vnitřní kontrole pomocí metody $\Delta\Delta C_T$.^{27,28}

Jako signifikantní změna byla považována taková změna, která způsobila dvojnásobný nárůst nebo pokles transkriptu, což znamená mimo interval -0,3 až +0,3 na logaritmické škále.

Tabulka 6. Seznam specifických primerů použitých při RT-qPCR

	Gen	Lokus	Sekvence (5' → 3')	Reverzní sekvence (5' → 3')
Referenční geny	<i>rrs</i>		GTTAGGTCTGTCGTGAAATCCC	CTAATCCTGTTTGCTCCCCAC
	<i>alaS</i>	AFE_0934	ACGGTTTACGAGGAGGATGAT	TCCAGAAGTTGTCCTTTTCGC
	<i>map</i>	AFE_0925	GTTACCACCGATGAACTGGAC	GAATGCCGTGACAGATCACAT
RISC geny	<i>tetH</i>	AFE_0029	CCGTTTCGGGAGTAAGACCTAT	ATCATCGCTTTCCGCATAGAC
	<i>sqrA</i>	AFE_1792	CGAAGCGTACACGAACTGTAA	GGCAGAACCATCTCCTTGATG
	<i>sqrB</i>	AFE_0267	ACCCAAGTGACCATTATCGGC	AAGAAACGGTCCAGGGGAATC
	<i>sat</i>	AFE_0539	ATTCCATCGGTTTCATGTGCTG	TCAGACGCATATCCTGTAGCA
<i>hdr</i> operon	<i>sdhC</i>	AFE_2550	GAGACGGAGTTCGGCATCAA	TTGGCGGCAAGAAGATCCAT
	<i>hdrC1</i>	AFE_2551	TTTACGCATCAGTGCATCGAA	ACACCACATTCATGCCCATTT
	<i>orf</i>	AFE_2552	CGATATCATCCTGGCCTACCA	TTCTACGCCCAGCAATTTACG
	<i>hdrA</i>	AFE_2553	TTCTCCGAGTACCGATGTGTT	GCCTTGACGAACTTGGTTTTG
	<i>hdrB1</i>	AFE_2554	TACTCCACCTGGTATGACTGC	CGACCTTGATCTTGCGATTCA
	<i>hdrC2</i>	AFE_2555	ATGCAGTCGGCTAAAGATGTG	CGGAATGGCTTTACGCAGTAT
	<i>dsrE</i>	AFE_2556	GCAAAATGAAGGCAAAGGGTG	AAAGATCAACGGTCATCTGGC
	<i>tusA</i>	AFE_2557	AGAAGACAAAGTACTCGACGC	GTTCCAACAGGGGATTCTTGG
	<i>p11</i>	AFE_2558	ATGGATAAATCGCAACCGCTC	GATTCCGCCACGCAAATTAAG
	<i>hdrB2</i>	AFE_2586	ATGTGGGAACTGGAGAAGGAA	GGTTGTTGGTGGGGATCTTTT
<i>dox</i> operon	<i>p14.3</i>	AFE_0046	TCAAAGAAGCAACCTGTCAGC	CTGATTATCCACCAGTGCGTC
	<i>p21</i>	AFE_0045	CTTTGCGGATCAGAAACCCTT	AAATCGTGATAGGTTGGCGTC
	<i>doxDA</i>	AFE_0044	CGGATCATCTGGTCGCTTTTT	CGGGTATACAAGCCGACAATC
	<i>psb</i>	AFE_0043	CGTCGCCAGACAGATCAAAAT	AAGATCGCTTCCGATTTCCAC
	<i>tat</i>	AFE_0042	ACCAAAGGTAATGGAAGGCG	GCCCTTGGAATGTAAACCCAT
	<i>tdt</i>	AFE_0041	TTCACGGTATTGTTTCTGGGG	AGAGATAGTGGGCAACGAGG

4.2. Výsledky

4.2.1. Optimalizace sběru adherovaných bakterií pomocí oscilace

Optimalizace sběru adherované frakce bakterií byla prováděna v závislosti na frekvenci oscilace, době oscilace a průměru přidávaných skleněných mikrokuliček (viz Tabulka 7). Kuličky byly přidávány v množství 0,1 g na 1 ml vzorku.

Tabulka 7. Sběr adherovaných bakterií pomocí oscilačního mlýnku.

	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4	Vzorek 5	Vzorek 6
f (Hz)	5	5	5	10	10	5
t (min)	5	5	5	5	10	10
Průměr mikrokuliček (mm)	0,1 – 0,11	0,25 – 0,30	0,45 – 0,50	0,25 – 0,30	0,25 – 0,30	0,25 – 0,30
Počet bakterií v 1 ml	$3,6 \times 10^8$	$7,5 \times 10^8$	$5,5 \times 10^8$	$7,5 \times 10^8$	$7,5 \times 10^8$	$7,5 \times 10^8$

Při získávání adherované frakce bakterií pomocí oscilačního mlýnku nezáleželo příliš na zvolené frekvenci ani době oscilace, jako na průměru použitých skleněných mikrokuliček. Pro odběry adherovaných buněk byla zvolena optimální kombinace oscilace při frekvenci 10 Hz, po dobu 5 min s mikrokuličkami o průměru 0,25 – 0,30 mm.

4.2.2. Optimalizace sběru adherovaných bakterií pomocí ultrasonikace

Sonikace adherovaných bakterií byla prováděna v ultrasonické lázni při teplotě 4 °C a frekvenci 40 kHz. Výsledky víceokrové ultrasonikace s různými časovými intervaly jsou zobrazeny v Tabulce 8.

Tabulka 8. Odběr adherovaných bakterií pomocí ultrazvukové lázně.

První sonikace (min)	1	5	10
Počet bakterií v 1 ml	$0,8 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$
Druhá sonikace (min)	1	5	10
Počet bakterií v 1 ml	$2,1 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$
Celkový počet bakterií v 1 ml	$2,9 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7$	$2,9 \times 10^7$

Ukázalo se, že při ultrasonikaci po dobu 10 min se z pyritu uvolnilo nejvíce bakterií. Při opakování ultrasonikace u téhož pyritu se uvolnilo ještě jednou stejné množství bakterií. Celkem se dá při dvojnásobném opakování 10 min ultrasonikace získat $2,9 \times 10^7$ bakterií, což je ale řádově pořád méně než při použití oscilačního mlýnku.

4.2.3. Poměr planktonických a adherovaných bakterií během kultivace na pyritu

Experiment byl proveden s kulturou *At. ferrooxidans* rostoucí v médiu s obsahem základních solí a pyritu v objemu 200 ml po dobu 14 dní. Bylo zjištěno, že adherovaných bakterií je v roztoku méně než 15 % z celkového počtu bakterií, v dalších experimentech se tedy pracovalo s majoritní frakcí planktonických bakterií (viz Tabulka 9).

Tabulka 9. Zastoupení planktonických a adherovaných bakterií *At. ferrooxidans* při kultivaci na pyritu.

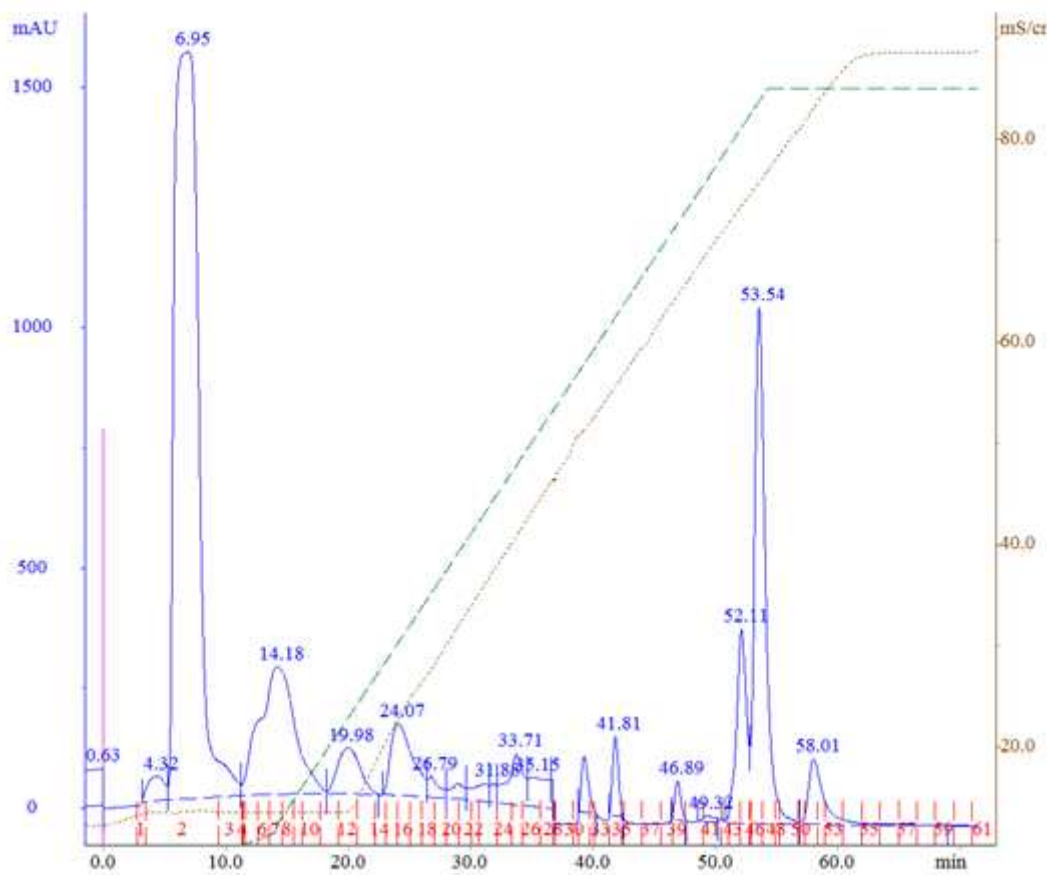
	Planktonické bakterie	Adherované bakterie
Počet bakterií v 1 ml	$6,1 \times 10^9$	$0,98 \times 10^9$
Podíl z celkového počtu bakterií	86,18 %	13,82 %

4.2.4. Purifikace a identifikace tetrathionanhydrolasy

Tetrathionanhydrolasa byla purifikována pomocí ionexové chromatografie, pak byl vzorek pomocí ultrafiltrace odsolen a zahuštěn. Nakonec byl vzorek separován pomocí SDS-PAGE a analyzován LC-MS/MS.

4.2.4.1. Ionexová chromatografie pro tetrathionanhydrolasu

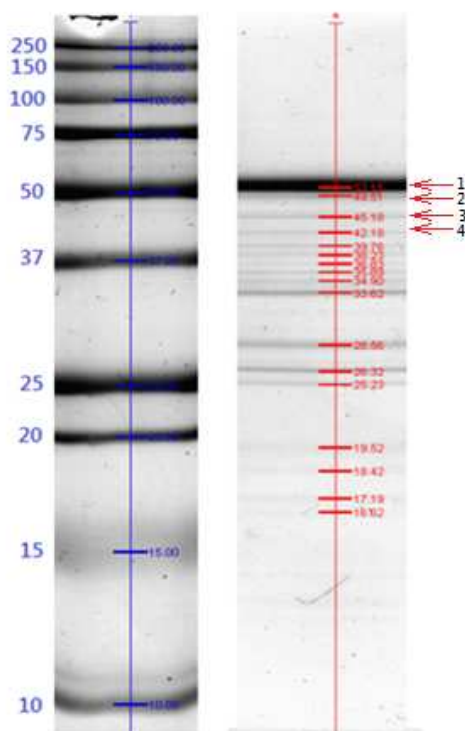
Chromatogram z ionexové chromatografie je znázorněn na Obr. 5. Na koloně se zachytily proteiny, které byly v další fázi eluovány v lineárním gradientu 0-2 M NaCl. Frakce s TTH aktivitou (50-53) se uvolnily až téměř při 2 M koncentraci NaCl.



Obr. 5. Celkový průběh ionexové chromatografie. Modře je znázorněna absorbance v UV oblasti, hnědou je vyznačena vodivost roztoku, světle zelenou barvou je vyznačena koncentrace NaCl. Červená čísla značí čísla frakcí.

4.2.4.2. SDS-PAGE pro tetrathionanhydrolasu

SDS-PAGE pro TTH byla provedena s IEC frakcemi 50-53. Tyto frakce byly smíchány dohromady a výsledný vzorek byl zahuštěn a odsolen pomocí ultrafiltrace. Gel byl obarven Coomassie Brilliant Blue R250 (viz Obr. 6).



Obr.6. SDS-PAGE společné IEC frakce, jež vznikla smícháním frakcí 50-53 s tetrathionanhydrolasovou aktivitou (vpravo). Hmotnostní standard (vlevo), hodnoty molekulové hmotnosti v kDa. Šipky označují bandy, u nichž byla dále provedena hmotnostní analýza.

4.2.4.3. LC-MS/MS analýza pro tetrathionanhydrolasu

Byly analyzovány 4 vzorky z gelu SDS-PAGE, ve všech vzorcích byla identifikována tetrathionanhydrolasa (AFE_0029) jako jediná složka (viz Tabulka 10), ve vzorku 4 kvůli nižší intenzitě signálu jen s nesignifikantním skóre. Další komponenty nebyly pomocí LC-MS/MS nalezeny.

Tabulka 10. Proteiny identifikované pomocí LC-MS/MS u frakce s tetrathionanhydrolasovou aktivitou.

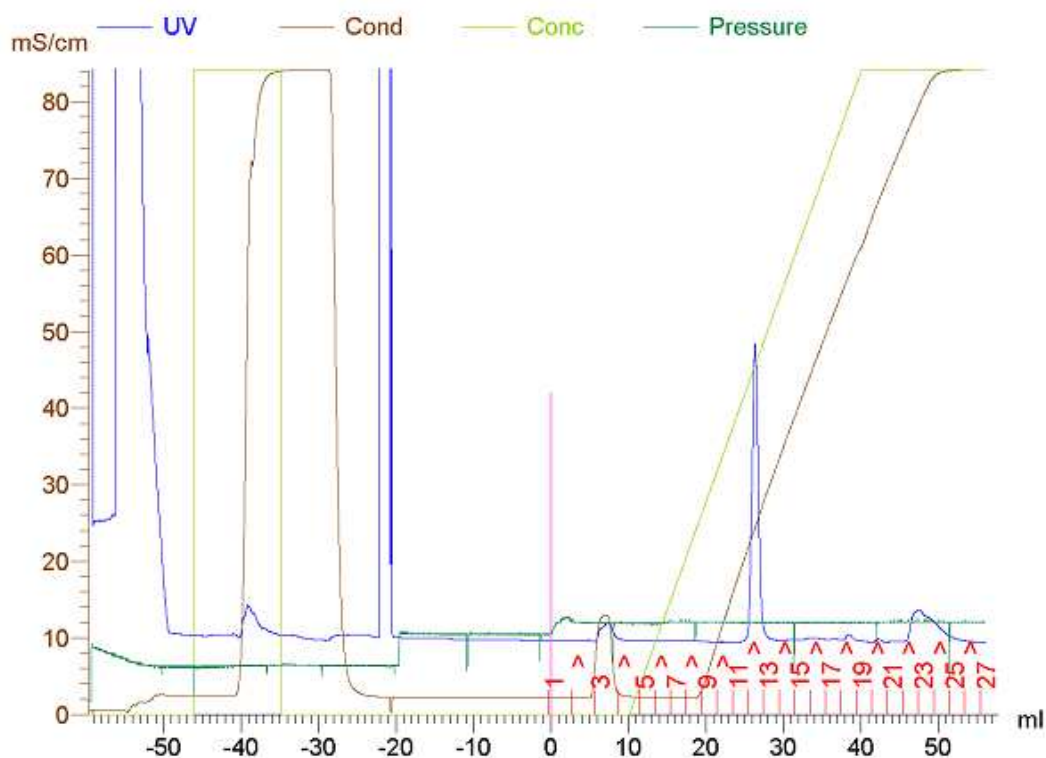
Název proteinu	Název genu	SDS-PAGE (bandy)	Lokus	Počet AMK	pI	Mol. hmotnost (kDa)
Tetrathionanhydrolasa	<i>tetH</i>	1,2,3,4	AFE_0029	499	9,1	53

4.2.5. Purifikace a identifikace thiosírandehydrogenasy

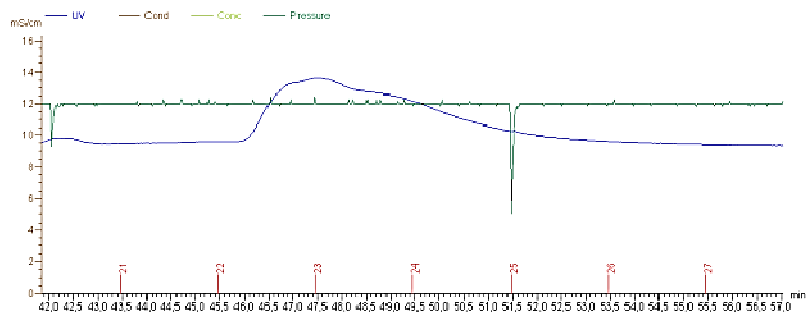
Thiosírandehydrogenasa byla purifikována pomocí afinitní chromatografie s kolonou naplněnou sorbentem s imobilizovaným cytochromem *c*, poté pomocí ionexové chromatografie na koloně Mono S HR 5/5. Nakonec byl vzorek separován pomocí SDS-PAGE a poté identifikován LC-MS/MS.

4.2.5.1. Ionexová chromatografie pro thiosírandehydrogenasu

Celková frakce proteinů, která byla získána AC s imobilizovaným cytochromem *c* byla dále přečištěna pomocí IEC. Chromatogram z ionexové chromatografie je znázorněn na Obr. 7. Na koloně se zachytily proteiny, které byly v další fázi eluovány v lineárním gradientu 0-2 M NaCl. Frakce s TDH aktivitou (22, 23, 24 a 25) se uvolnily až téměř při 2 M koncentraci NaCl (viz Obr. 8).



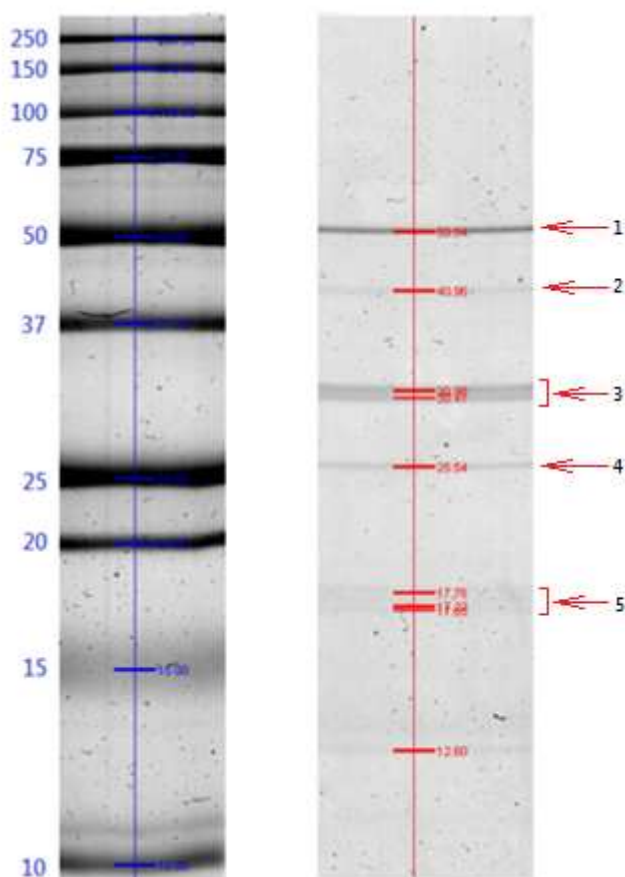
Obr. 7. Celkový průběh ionexové chromatografie. Modře je znázorněna absorbance v UV oblasti, hnědou je vyznačena vodivost roztoku, světle zelenou barvou je vyznačena koncentrace NaCl, tmavě zelenou tlak v systému. Červená čísla značí čísla frakcí.



Obr. 8. Úsek chromatogramu z obrázku 10. Eluované frakce s TDH aktivitou (22-25).

4.2.5.2. SDS-PAGE pro thiosírandehydrogenasu

SDS-PAGE byla provedena s ICE frakcemi 22-25. Před provedením SDS-PAGE byly frakce smíchány, zahuštěny a odsoleny pomocí ultrafiltrace. Gel byl obarven Coomassie Brilliant Blue R250 (viz Obr. 9).



Obr. 9. SDS-PAGE společné IEC frakce, jež vznikla smícháním frakcí 22-25 s TDH aktivitou (vpravo). Hmotnostní standard (vlevo), hodnoty molekulové hmotnosti v kDa. Šipky označují bandy, u nichž byla dále provedena hmotnostní analýza.

4.2.5.3. LC-MS/MS analýza pro thiosírandehydrogenasu

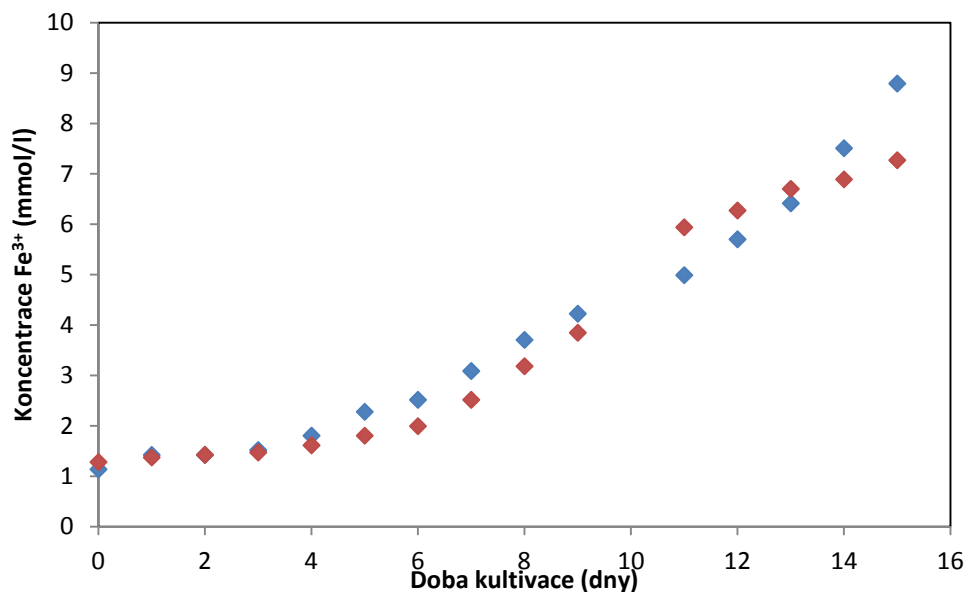
Bylo analyzováno 5 bandů z SDS-PAGE, vzorek 5 byl rozdělen na tři části, celkem se analyzovalo 7 vzorků. (viz Tabulka 11). Celkem bylo nalezeno 6 proteinů.

Tabulka 11. Proteiny identifikované pomocí LC-MS/MS analýzy u frakce s thiosírandehydrogenasovou aktivitou.

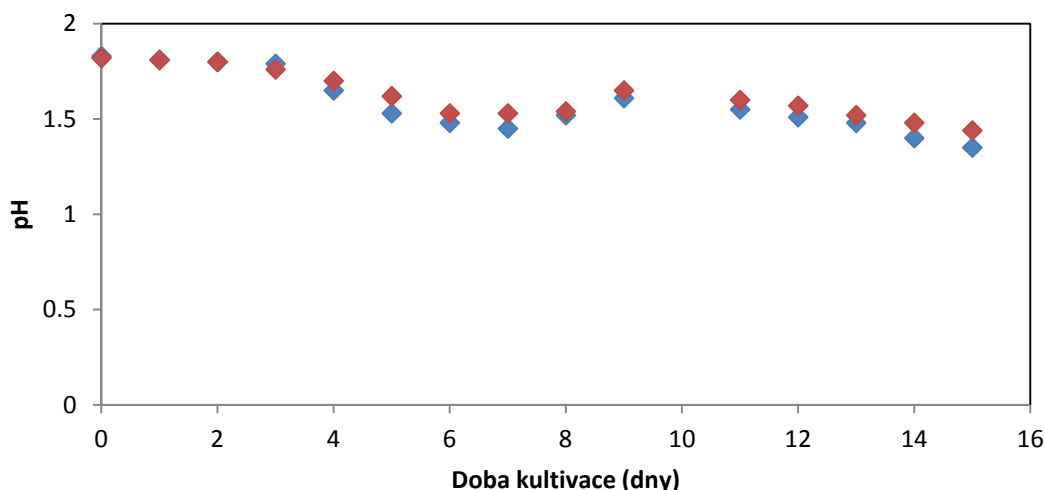
Název proteinu	Název genu	SDS-PAGE (bandy)	Lokus	Počet AMK	pI	Mol. hmotnost (kDa)
Tetrathionanhydrolasa	<i>tetH</i>	1,2,3,4,5	AFE_0029	499	9,1	53
ABC transportérový protein		3	AFE_0602	294	8,4	32
Protein s TAT-signálním peptidem	<i>tat</i>	3,4	AFE_0042	270	7,1	29
Thioredoxin	<i>trx</i>	4	AFE_0657	108	4,8	12
30S ribozomální protein S3	<i>rpsC</i>	4	AFE_0333	228	10,3	26
Rusticyanin	<i>rus</i>	5	AFE_3146	187	8,8	20

4.2.6. Analýza genové exprese pomocí RT-qPCR

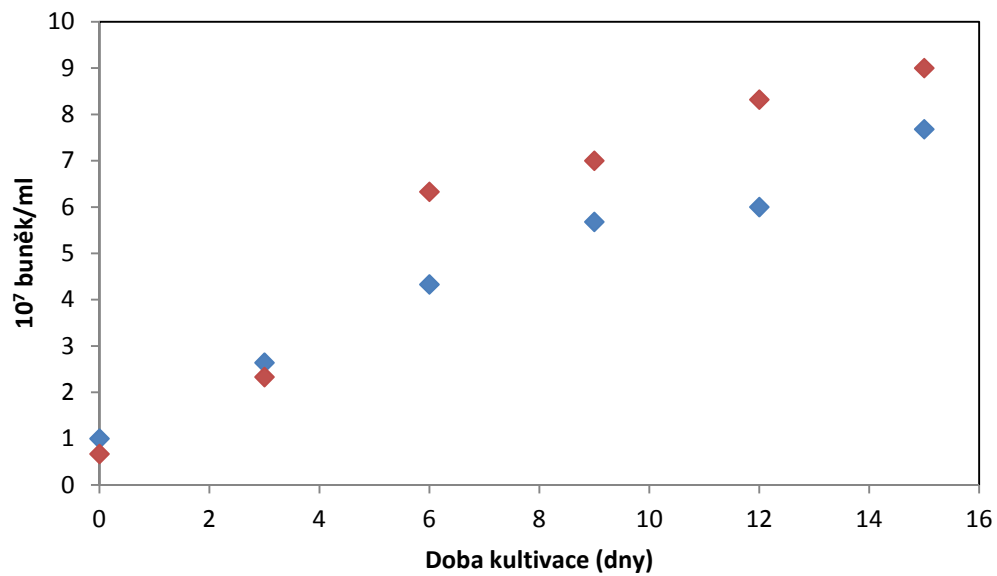
Probíhaly dvě paralelní kultivace (A, B) bakterie *At. ferrooxidans* po dobu 15 dnů na pyritu v objemech 10 l. Z obou kultivací byly pravidelně odebírány vzorky buněk, ke stanovení relativní exprese genů byly použity odběry ve dnech 0, 3, 6, 9, 12 z obou kultivací. Průběhy obou kultivací jsou zobrazeny na Obr. 10 – 12. Údaje o průběhu relativní exprese genů jsou zaznamenány v Tabulce 12 a na Obr. 13.



Obr. 10. Oxidace Fe³⁺ iontů v průběhu kultivací A (♦) a B (♦) bakterie *At. ferrooxidans* na pyritu.



Obr. 11. Pokles pH v průběhu kultivací A (♦) a B (♦) bakterie *At. ferrooxidans* na pyritu.

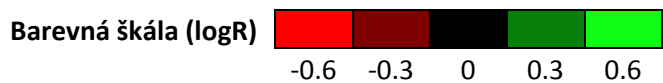
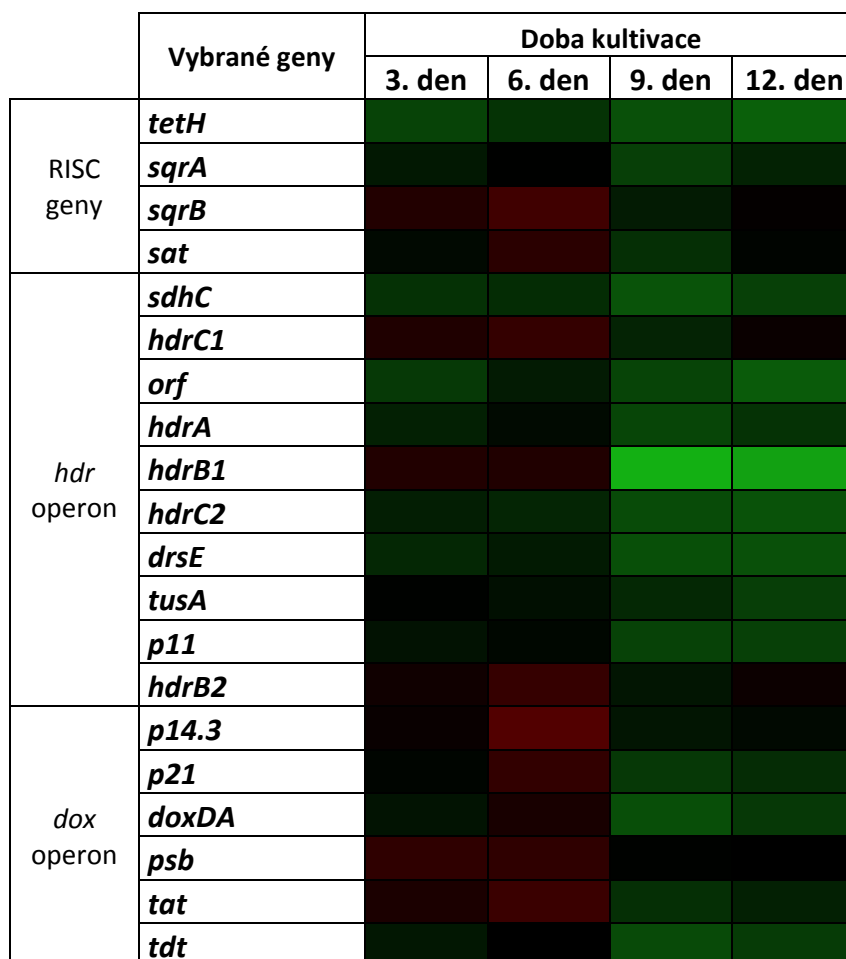


Obr. 12. Nárůst počtu bakterií v průběhu kultivací A (♦) a B (♦) bakterie *At. ferrooxidans* na pyritu.

Tabulka 12. Relativní exprese (R) vybraných genů účastnících se sírného metabolismu při kultivaci bakterie *At. ferrooxidans* na pyritu. Jde o průměr hodnot obou kultivací A a B a jejich směrodatné odchylky (s).

Geny		Doba kultivace			
		3. den	6. den	9. den	12. den
		logR ± s	logR ± s	logR ± s	logR ± s
RISC geny	<i>tetH</i>	0,22 ± 0,07	0,16 ± 0,04	0,26 ± 0,06	0,31 ± 0,05
	<i>sqrA</i>	0,08 ± 0,05	0,00 ± 0,06	0,20 ± 0,05	0,11 ± 0,04
	<i>sqrB</i>	-0,08 ± 0,06	-0,15 ± 0,05	0,09 ± 0,07	-0,01 ± 0,04
	<i>sat</i>	0,03 ± 0,08	-0,10 ± 0,07	0,15 ± 0,08	0,02 ± 0,06
hdr operon	<i>sdhC</i>	0,16 ± 0,06	0,14 ± 0,06	0,27 ± 0,06	0,21 ± 0,04
	<i>hdrC1</i>	-0,07 ± 0,06	-0,12 ± 0,05	0,12 ± 0,06	-0,02 ± 0,05
	<i>orf</i>	0,18 ± 0,06	0,09 ± 0,06	0,22 ± 0,05	0,29 ± 0,05
	<i>hdrA</i>	0,10 ± 0,05	0,03 ± 0,06	0,22 ± 0,05	0,16 ± 0,04
	<i>hdrB1</i>	-0,08 ± 0,07	-0,08 ± 0,06	0,57 ± 0,06	0,52 ± 0,04
	<i>hdrC2</i>	0,10 ± 0,09	0,12 ± 0,06	0,24 ± 0,05	0,27 ± 0,05
	<i>drsE</i>	0,13 ± 0,07	0,08 ± 0,05	0,26 ± 0,05	0,26 ± 0,06
	<i>tusA</i>	0,01 ± 0,07	0,05 ± 0,06	0,13 ± 0,04	0,20 ± 0,05
	<i>p11</i>	0,06 ± 0,07	0,03 ± 0,07	0,21 ± 0,07	0,21 ± 0,06
	<i>hdrB2</i>	-0,04 ± 0,05	-0,12 ± 0,06	0,07 ± 0,04	-0,03 ± 0,05
dox operon	<i>p14.3</i>	-0,02 ± 0,05	-0,19 ± 0,05	0,07 ± 0,05	0,03 ± 0,04
	<i>p21</i>	0,02 ± 0,05	-0,12 ± 0,05	0,18 ± 0,05	0,14 ± 0,06
	<i>doxDA</i>	0,06 ± 0,05	-0,05 ± 0,05	0,25 ± 0,05	0,18 ± 0,04
	<i>psb</i>	-0,11 ± 0,06	-0,11 ± 0,06	0,01 ± 0,05	0,00 ± 0,04
	<i>tat</i>	-0,06 ± 0,06	-0,14 ± 0,06	0,15 ± 0,05	0,10 ± 0,04
	<i>tdt</i>	0,07 ± 0,06	0,00 ± 0,07	0,24 ± 0,06	0,19 ± 0,06

Obrázek 13. Grafické znázornění relativní exprese vybraných genů účastnících se sírného metabolismu při kultivaci bakterie *At. ferrooxidans* na pyritu.



4.3. Diskuse

Byla provedena purifikace enzymu tetrathionanhydrolasy a thiosírandehydrogenasy pomocí chromatografií a SDS-PAGE. Thiosírandehydrogenasa byla stejným postupem purifikována již dříve.²⁶ Při IEC docházelo k vymytí obou proteinů TDH i TTH z katexu až při téměř 2 M koncentraci NaCl. Podle toho by se dalo předpokládat, že protein je na koloně držen i jinými než Coulombovskými silami, a protože byla ve vzorku s předpokládanou TDH aktivitou překvapivě detekována i TTH aktivita, je na místě se domnívat, že tyto dva proteiny spolu silně interagují.

Po provedení SDS-PAGE a následné LC-MS/MS byla ve vzorku s TTH aktivitou prokázána jako jediná složka tetrathionanhydrolasa, která byla pomocí databáze Uniprot identifikována jako membránový protein kódovaný genem *tetH* na lokusu AFE_0029. Ke stejnému výsledku došel dříve už i Kanao a kol. (2007), který purifikoval tetrathionanhydrolasu u bakterie *At. ferrooxidans* ATCC 23270.²⁹

U vzorku s TDH aktivitou, u kterého byla paralelně naměřena i TTH aktivita, bylo po provedení SDS-PAGE a hmotnostní spektrometrii s následným porovnáním s databází Uniprot určeno více proteinů. Ve všech bandech byla identifikována TTH. Dále byl identifikován periplazmatický ABC transportérový protein, jehož předpokládaná funkce je řízený pohyb iontů kovu do buňky, z buňky nebo mezi buňkami a protein s TAT-signálním peptidem, jehož předpokládaná funkce je transport proteinů skrz membránu do buňky, ale byl už také zmíněn dříve jako součást *dox* operonu spolu s *doxDA* genem.¹ Gen *doxDA* vznikl sloučením genů *doxA* a *doxD*, které kódují pojednotky TDH např. u bakterie *Acidianus ambivalens*.¹⁷ Poměrně nedávno byl purifikován a identifikován protein tvořící tetrathionan u bakterie *At. ferrooxidans* ATCC 23270. Maximální enzymová aktivita této thiosírandehydrogenasy byla zaznamenána při pH 2,5 a teplotě 70 °C. Gen kódující tento protein byl na lokusu AFE_0042. Jedná se tedy o již zmíněný protein s TAT-signálním peptidem, jehož gen leží v *dox* operonu.¹⁸ Výsledky purifikace TDH u lokálního kmene *At. ferrooxidans* CCM 4253 v této práci tak korelují s výsledky v literatuře u kmene ATCC 23270.

Protein kódovaný *doxDA* nebyl analýzou prokázán. Přítomnost TTH ve všech bandech a zjištěná TTH aktivita také u frakcí s TDH aktivitou by mohla indikovat přítomnost většího multienzymového komplexu kódovaného geny *dox* operonu a genem *tetH*. Přítomnost podobného multienzymového komplexu není u bakterie *At. ferrooxidans* výjimkou, u této

bakterie byl již prokázán multienzymový komplex kódovaný *rus* operonem, který spojuje vnější a vnitřní membránu a vytváří tzv. elektronový drát.¹¹ Tuto hypotézu by bylo třeba ještě ověřit pomocí nedenaturující separační metody, např. za podmínek nativní elektroforezy.

Další identifikované proteiny nemají předpokládanou funkci v sírném metabolismu bakterie *At. ferrooxidans*. Je možné, že interakcí s imobilizovaným cytochromem *c* a vzájemnými interakcemi dokázaly projít skrz jednotlivé separační kroky. Jsou to proteiny thioredoxin, který pomáhá udržovat v buňce správné redoxní prostředí, 30S ribozomální protein S3, který se účastní translačních procesů a rusticyanin, který přenáší elektrony v metabolismu železa.

Podle výsledků analýzy genové exprese lze usoudit, že v průběhu kultivace bakterie *At. ferrooxidans* na pyritu dochází k nárůstu exprese genů, jež mají vztah k sírnému metabolismu u majoritní planktonické frakce. Signifikantní nárůst exprese genů sírného metabolismu nicméně pozorujeme až v plně aktivní fázi oxidace pyritu, nejdříve po devátém dni kultivace. To může znamenat, že k oxidaci sírných meziproductů dochází až v aktivní fázi a než k této fázi dojde (tato doba zahrnuje i lag fázi), buňka nejspíš přednostně exprimuje geny účastnící se metabolismu železa a tím přispívá k recyklaci Fe^{3+} z Fe^{2+} .

Gen *tetH* kódující protein TTH vykazoval od začátku kultivace vyšší expresi ve srovnání s ostatními geny, i když těsně pod hranicí signifikance. Jako jeden z mála proteinů sírného metabolismu se vůbec nevyskytuje u železitých kultur. Jeho syntéza u železitých buněk oxidujících pyrit probíhá tedy de novo. To by mohlo naznačovat potřebu enzymaticky dále degradovat tetrathionan na různé sírné sloučeniny jako je elementární síra a siřičitan. Vznik tetrathionanu oxidací thiosíranu jako prvního rozpustného sírného meziproductu oxidace pyritu, je součástí teoretického modelu thiosíranového mechanismu.^{30,31}

Méně se pak exprimovaly geny *dox* operonu, jehož součástí je i gen *tat*, jež kóduje enzym s TDH aktivitou. U *dox* operonu celkově pozorujeme zvyšující se trend exprese, i když pod hranicí signifikance. Z genů *hdr* operonu kódující komplex, u něhož se předpokládá, že se účastní oxidace elementární síry, resp. glutathionem aktivované síry, se nejvíce exprimoval gen *hdrB* v aktivní fázi kultivace na pyritu. Tento gen kóduje jednu z podjednotek heterodisulfidreduktasy a již dříve byla prokázána jeho zvýšená exprese na síře.¹³

Z výsledků expresních profilů vybraných genů u železitých kultur *At. ferrooxidans* během růstu na pyritu je zřejmé, že i u planktonických frakcí dochází k regulaci genů, jež mají vztah k sírnému metabolismu. To je v rozporu s literaturou, podle které se u buněk planktonických při růstu na pyritu více exprimují geny oxidace železa a naopak u adherovaných zase geny

oxidace elementární síry a RISC.⁵ Tento nesoulad může být výsledkem stanovení exprese v různých časech kultivace. V této práci byly sledovány expresní profily genů siřného metabolismu v průběhu dvou týdnů na rozdíl od výše zmíněné end-point analýzy, která srovnávala expresi po čtyřech dnech kultivace. V citovaném případě navíc nebyla brána v úvahu ani možná lag fáze. Expese genů siřného metabolismu může být navíc ovlivněna redoxním potenciálem prostředí. V prostředí s nižším redoxním potenciálem na úplném začátku oxidace pyritu může být expese genů siřného metabolismu potlačena RegBA regulačním systémem, který je v tomto prostředí indukován a pozitivně reguluje pouze geny oxidace železa. V pozdější aktivní fázi oxidace pyritu, kdy se redoxní potenciál zvyšuje, RegBA systém je neaktivní a nedereguluje tak expresi genů siřného metabolismu.³²

5. Závěr

1. U bakterií *At. ferrooxidans* rostoucích na tetrathionanu byl identifikován jediný protein vykazující tetrathionanhydrolasovou aktivitu, kódovaný genem *tetH* (AFE_0029).
2. Bylo identifikováno více proteinů v purifikované frakci s thiosírandehydrogenasovou aktivitou. Na základě bioinformatické analýzy a srovnáním výsledků s literaturou byl z identifikovaných proteinů vybrán protein s TAT-signálním peptidem kódovaný genem *tat* (AFE_0042), který s největší pravděpodobností reprezentuje thiosírandehydrogenasu, případně podjednotku s thiosírandehydrogenasovou aktivitou v rámci většího multienzymového komplexu.
3. Analýza genové exprese planktonických bakterií *At. ferrooxidans* rostoucích na pyritu prokázala nárůst exprese genů s předpokládanou účastí v sirném metabolismu.
4. Geny sirného metabolismu se exprimovaly až v pozdější aktivní fázi oxidace pyritu, což znamená, že v rané fázi kultivace buňka získává energii zejména oxidací železa, případně dominantní mechanismus biooxidace pyritu enzymy sirného metabolismu nezahrnuje.

6. Seznam zkratek

AC	afinitní chromatografie
At.	<i>Acidithiobacillus</i>
BIS	methylenbisakrylamid
EPS	extracelulární polymerní vrstva
ESI	ionizace pomocí elektrospreje
FPLC	střednětlaká kapalinová chromatografie
GSSG	glutathion disulfid
HiPIP	železo-sírný protein s vysokým redoxním potenciálem
IEC	ionexová chromatografie
LC	kapalinová chromatografie
MALDI	ionizace laserem za přítomnosti matrice
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
PAGE	polyakrylamidová elektroforeza
PCR	polymerázová řetězová reakce
RISC	redukované anorganické sírné sloučeniny
RT	reverzní transkripce
SDS	dodecylsírán sodný
SQR	sulfidchinonreduktasa
TDH	thiosírandehydrogenasa
TEMED	tetramethylethyldiamin
TOF	průletový analyzátor
TQO	thiosíranchinonoxidoreduktasa
TTH	tetrathionanhydrolasa

7. Seznam literatury

1. Valdés, J. *et al.* *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC Genomics* **9**, 597–597 (2008).
2. Williams, K. P., Kelly, D. P. Proposal for a new class within the phylum *Proteobacteria*, *Acidithiobacillia* classis nov., with the type order *Acidithiobacillales*, and emended description of the class *Gammaproteobacteria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**, 2901–2906 (2013).
3. Vera, M., Schippers, A., Sand, W. Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation--part A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 7529–7541 (2013).
4. Quatrini, R. *et al.* Insights into the iron and sulfur energetic metabolism of *Acidithiobacillus ferrooxidans* by microarray transcriptome profiling. *Hydrometallurgy* **83**, 263–272 (2006).
5. Vera, M. *et al.* Characterization of biofilm formation by the bioleaching acidophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* by a microarray transcriptome analysis. *Adv. Mater. Res.* **71-73**, (2009).
6. González, D. *et al.* Evolution of biofilms during the colonization process of pyrite by *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**, 763–775 (2012).
7. Liu, J.-S., Xie, X.-H., Li, B.-M., Dong, Q.-H. Adsorption characteristics of *Thiobacillus ferrooxidans* on surface of sulfide minerals. *J. Cent. South Univ. Technol. Engl. Ed.* **12**, 671–676 (2005).
8. YU, R. *et al.* Effect of EPS on adhesion of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on chalcopyrite and pyrite mineral surfaces. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China* **21**, 407–412 (2011).
9. Gehrke, T., Telegdi, J., Thierry, D., Sand, W. Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2743–2747 (1998).
10. Tu, B. *et al.* Analysis of genes and proteins in *Acidithiobacillus ferrooxidans* during growth and attachment on pyrite under different conditions. *Geomicrobiol. J.* **30**, 255–267 (2013).
11. Roger, M. *et al.* Mineral respiration under extreme acidic conditions: from a supramolecular organization to a molecular adaptation in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biochem. Soc. Trans.* **40**, 1324–1329 (2012).

12. Cox, J. C., Boxer, D. H. The purification and some properties of rusticyanin, a blue copper protein involved in iron(II) oxidation from *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biochem. J.* **174**, 497–502 (1978).
13. Quatrini, R. *et al.* Extending the models for iron and sulfur oxidation in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *BMC Genomics* **10**, 394 (2009).
14. Dopson, M., Johnson, D. B. Biodiversity, metabolism and applications of acidophilic sulfur-metabolizing microorganisms. *Environ. Microbiol.* **14**, 2620–2631 (2012).
15. Janiczek, O., Zemanova, J., Mandl, M. Purification and some properties of thiosulfate dehydrogenase from *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **37**, 101–111 (2007).
16. Brasseur, G. *et al.* Apparent redundancy of electron transfer pathways via *bc₁* complexes and terminal oxidases in the extremophilic chemolithoautotrophic *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **1656**, 114–126 (2004).
17. Müller, F. H. *et al.* Coupling of the pathway of sulphur oxidation to dioxygen reduction: characterization of a novel membrane-bound thiosulphate:quinone oxidoreductase. *Mol. Microbiol.* **53**, 1147–1160 (2004).
18. Kikumoto, M., Nogami, S., Kanao, T., Takada, J., Kamimura, K. Tetrathionate-forming thiosulfate dehydrogenase from the acidophilic, chemolithoautotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 113–120 (2013).
19. Sargent, F., Berks, B. C., Palmer, T. Pathfinders and trailblazers: a prokaryotic targeting system for transport of folded proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* **254**, 198–207 (2006).
20. Bugaytsova, Z., Lindström, E. B. Localization, purification and properties of a tetrathionate hydrolase from *Acidithiobacillus caldus*. *Eur. J. Biochem.* **271**, 272–280 (2004).
21. Kanao, T., Kamimura, K., Sugio, T. Identification of a gene encoding a tetrathionate hydrolase in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *J. Biotechnol.* **132**, 16–22 (2007).
22. Beard, S., Paradela, A., Albar, J. P., Jerez, C. A. Growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 in thiosulfate under oxygen-limiting conditions generates extracellular sulfur globules by means of a secreted tetrathionate hydrolase. *Front. Microbiol.* **2**, (2011).

23. Snustad, D. P. *et al. Genetika*. **2009**, (Masarykova univerzita, 2009).
24. Silverman, M. P., Lundgren, D. G. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **77**, 642–647 (1959).
25. Mandl, M., Nováková, O. An ultraviolet spectrophotometric method for the determination of oxidation of iron sulphide minerals by bacteria. *Biotechnol. Tech.* **7**, 573–574 (1993).
26. Janiczek, O., Pokorna, B., Zemanova, J., Mandl, M. Use of immobilized cytochrome *c* as a ligand for affinity chromatography of thiosulfate dehydrogenase from *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *J. Biotechnol.* **117**, 293–298 (2005).
27. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45 (2001).
28. Kucera, J. *et al.* Ferrous iron oxidation by sulfur-oxidizing *Acidithiobacillus ferrooxidans* and analysis of the process at the levels of transcription and protein synthesis. *A. Van. Leeuw. J. Microb.* **103**, 905–919 (2013).
29. Kanao, T., Kamimura, K., Sugio, T. Identification of a gene encoding a tetrathionate hydrolase in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *J. Biotechnol.* **132**, 16–22 (2007).
30. Schippers, A., Jozsa, P., Sand, W. Sulfur chemistry in bacterial leaching of pyrite. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3424–3431 (1996).
31. Schippers, A., Sand, W. Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 319–321 (1999).
32. Ponce, J. S., Moinier, D., Byrne, D., Amouric, A., Bonnefoy, V. *Acidithiobacillus ferrooxidans* oxidizes ferrous iron before sulfur likely through transcriptional regulation by the global redox responding RegBA signal transducing system. *Hydrometallurgy* **127–128**, 187–194 (2012).