VLIV SPOLEČENSTVA ŘAS A BAKTERIÍ NA TVORBU KOROZIVNĚ AKTIVNÍCH SLOUČENIN, KTERÉ DEGRADUJÍ SILIKÁTOVÉ STAVEBNÍ MATERIÁLY

RICHARD WASSERBAUER, ZUZANA RÁCOVÁ a IVANA LOUŠOVÁ

Mikrobiologická a chemická laboratoř, Katedra konstrukcí pozemních staveb, Fakulta stavební ČVUT v Praze, Thákurova 7, 166 29 Praha 6
richard.wasserbauer@fsv.cvut.cz

Došlo 30.10.14, přepracováno 12.2.15, přijato 12.3.15.

Klíčová slova: fototrofi, sinice, bakterie, společenstvo, metabolity

Úvod

Mikrobiální kolonizace stavebního kamene začíná obvykle fototrofními organismy, které vytvářejí viditelný biofilm na povrchu zdiva[1]. Dlouho se předpokládalo, že fototrofi působí pouze estetické škody a nemají přímý vliv na poškození stavebního kamene (tzv. funkční degradace neboli soiling)[2]. Nyní je zřejmé, že fototrofi působí fyzikální a chemickou deterioraci kamene, a to zvláště tam, kde dochází ke znečištění staveb polutanty antropogenního původu[3]. Biodeterioračních procesy jsou provázeny exkrecí organických kyselin, a to především na vápencích a mramorech, ale také na pískovci, žule a čediči[4].

Agresivní působení sinic a řas popsali autoři[5], kteří se snažili objasnit drolení mramoru za přítomností sinic produkcí dihydrátu šťavelanu vápenatého. Další autoři[6] analyzovali biomasu endolithických sinic, kde jako typický biomarker nalezli 7-methyl-heptadekan. V současnosti je zřejmé, že řasy jsou schopny syntetizovat relativně velké množství organických látek. Bakterie zúčastněné v konsorciu s fototrofy přetvářejí tyto látky na minerální živiny a růstové faktory, které zpětně stimulují rozvoj řas[7,8].

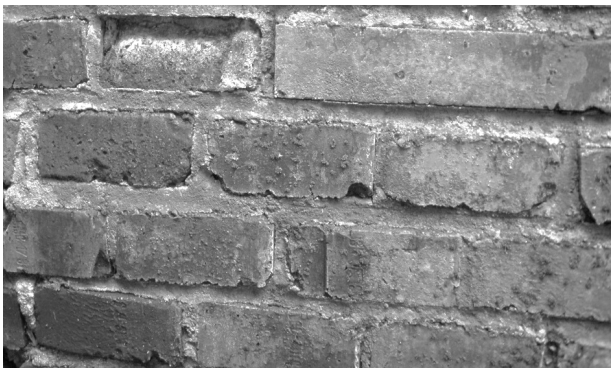
U vybraných fototrofů jsme se proto pokusili izolovat jejich průvodní mikroflóru, identifikovat látky vytvořené v průběhu kultivace na opuce, a analyzovat základní metabolity bakterií při asimilaci produktů řas.

Experimentální část

Materiál a metody

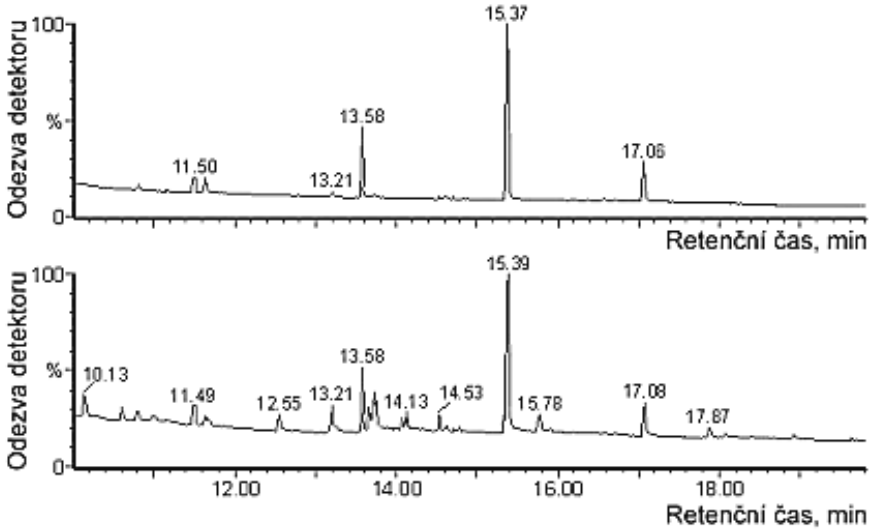
Vzorky sinic a zelených řas byly sejmuty ze stavebních materiálů rýhováním povrchu stavebního kamene sterilním skalpelem. Vzorky z cihel bastionů na Vyšehradě a z kamenného obložení oblouků Karlova mostu (obr. 1 a 2) byly kultivovány v minerální půdě podle Knopa a v Bold-Basal/Bristol mediu. Kultivace probíhala po dobu 20 dnů při teplotě 18–20 °C. Vzorky byly ozařovány 20 hodin denně výbojkou o celkové intenzitě 2,5 kLux.

Izolace fototrofů byla provedena očkováním na minerální půdu podle Knopa ztuženou agarem. Pro získání dostatečného kvanta extracelulárních polymerních substancí (EPS) z jednotlivých druhů řas byly použity sterilní vzorky opuky o rozměrech 70 × 70 × 5 mm. Vzorky stavebního kamene byly uloženy v lůžku z vlhkého sterilního vermikulitu. Na vzorky byly naneseny jednotlivé kmeny řas. Doba kultivace byla 30 dnů, teplota 20 °C, způsob ozařování jako v minulém případě. Identifikace fototrofů byla provedena mikroskopicky (mikroskop BX41), podle klíče[9].



Obr. 1. **Řasy na povrchu cihel bastionu na Vyšehradě**

Obr. 2. **Společenstvo řas na obloucích Karlova mostu**



Obr. 3. **Příklad identifikace EPS na plynovém chromatografu GC-MS Perkin Elmer AutoSystemXL-Turbomass.** Osa x – retenční čas, osa y – odezva detektoru. RT (min) pro jednotlivé aminokyseliny: 10,3 TMS alanin, 12,6 TMS valin, 13,7 TMS Leucin, 14,3 TMS prolin, 15,3 TMS serin, 15,8 TMS threonin, 17,8 TMS C6 dikarboxylová kyselina

Identifikace produktů řas byla uskutečněna ve vodné suspenzi, která vznikla po smytí opuky destilovanou vodou. Suspenze byla odstředěna (6000 ot/min; 6 min) a supernatant převeden do skleněných vialek. Pod IR lampou a v proudu dusíku byly roztoky odpařeny do sucha. EPS produkované řasami byly nejdříve podrobeny kyselé hydrolýze a následně derivatizaci BSTFA (bis (trimethylsilyl)trifluoracetamid).

Derivatizované složky odparků byly analyzovány na plynovém chromatografu GC-MS Perkin Elmer AutoSystemXL-Turbomass. Data z GC-MS byla shromažďována a zpracována s použitím software TurboMass a NIST knihovny MS spekter. Chromatografické podmínky: kolona PE5MS, 20 m, i. d. 0,18 mm; tloušťka filmu 0,18 μm; teplotní program: 60 °C 5 min, vzestup 8 °C/min do 280 °C za cca 30 min, prodleva 280 °C 20 min; nosný plyn helium (obr. 3).

Izolace průvodních bakterií byla provedena očkováním suspenze jednotlivých řas na masopeptonovém agaru (MPA) a uložením ve tmě v termostatu při teplotě 24 °C po dobu 10 dnů. Vlastní identifikace vybraných kmenů bakterií proběhla za použití diagnostických destiček Mikro-La-Test a Nefermtest Oxi, výrobce Pliva-Lachema a.s. Brno, souhlas s tabelovanými daty byl větší než 95 %.

Rychlost růstu bakterií v minerálním médiu s jednotlivými aminokyselinami identifikovanými na plynovém chromatografu byla stanovena na spektrometru MR OPSYS (Dynex). Pro tyto účely bylo použito jednoduché minerální medium[10]. Počáteční koncentrace inokula bakterií byla cca $1 \cdot 10^4$, teplota kultivace 24 ± 2 °C.

Orientační identifikace produktů asimilace jednotlivých aminokyselin bakteriemi byla provedena tenkovrstvou chromatografií. Metabolity bakterií byly identifikovány v soustavě pyridin-petroleter (1:2) a v soustavě ethanol-voda-25% amoniak (25:3:4), vyvíjení vzestupně, detekce bromkresolovou zelení.

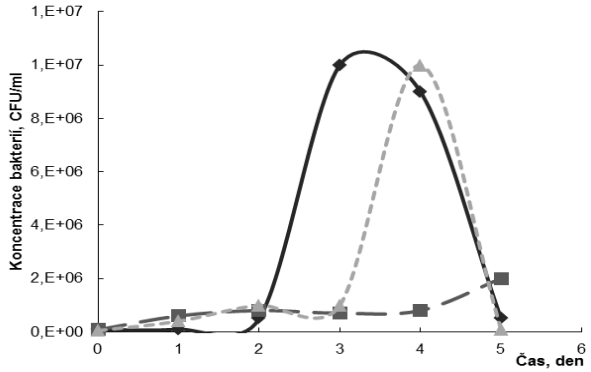
Výsledky a diskuse

Řasy izolované z povrchu bastionů na Vyšehradě a z kamenného obložení Karlova mostu jsme identifikovali jako *Aphanothece saxicola*, *Chroococcus turgidus* a *Chlorobotrys sp*.

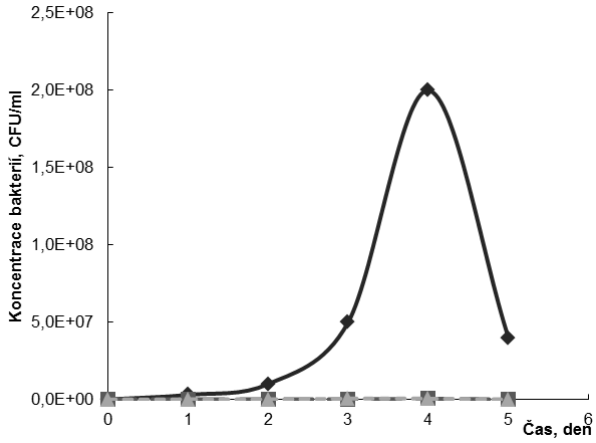
Jejími pravděpodobnými symbionty byly bakterie *Burgholderia cepacia*, *Sphingomonas paucimobilis* a *Sphingobacterium multivorum*.

TMS (trimethylsilyl) deriváty aminokyselin vznikajících hydrolýzou rozpuštěných peptidů byly následující: alanin, glycin, valin, leucin, prolin, serin a threonin. Navíc u některých vzorků z odparků derivatizovaných BSTFA byly zjištěny píky, které bylo možné přiřadit k TMS derivátu C6 dikarboxylové kyseliny, k derivátům sacharidů a jim podobným sloučeninám. To dobře souhlasí s nálezem Wanga a spol.[11], který detegoval tytéž sloučeniny a navíc také polyalkoholy a toxiny.

Přístupnost aminokyselin v médiu se pro bakterie lišila podle počáteční koncentrace aminokyselin a koncentrace inokula. Pokud počáteční koncentrace aminokyselin v roztoku činila méně než 1 mg/5 ml média a koncentrace inokula byla přibližně $1 \cdot 10^4$, potom pouze *Burkholderia cepacia* byla schopna větší část aminokyselin produkovaných řasami asimilovat a využívat pro stavbu buňky. Je tedy pravděpodobné, že právě tento kmen je schopen rozvoje na fasádách stavebních objektů.



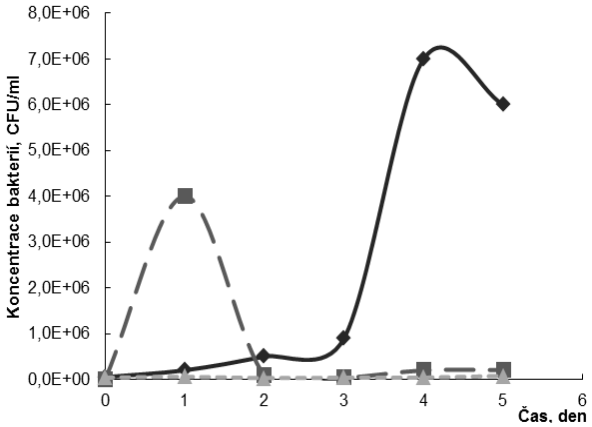
Obr. 4. **Růst bakterií v minerálním médiu podle Ilyaletdinova[10] s alaninem.** Spektrometr OPSYS (Dynex). ◆ BC – *Burgolderia cepacia*, ■ SP – *Sphingomonas paucimobilis* a ▲ SM – *Sphingobacterium multivorum*



Obr. 5. **Růst bakterií v minerálním médiu podle Ilyaletdinova[10] s glycinem.** Spektrometr OPSYS (Dynex). ◆ BC – *Burgolderia cepacia*, ■ SP – *Sphingomonas paucimobilis* a ▲ SM – *Sphingobacterium multivorum*

Kmen *Sphingomonas paucimobilis* byl schopen slabě asimilovat pouze alanin a valin, další aminokyseliny nevyužíval. *Sphingobacterium multivorum* asimiloval pouze alanin. Oba kmeny zřejmě nejsou typičtí symbionti, ale spíše členy specifického společenství na povrchu Karlova mostu a bastionu na Vyšehradě (obr. 4 až 6).

Při orientačních analýzách metabolitů bakterie *Burkholderia cepacia*, která rostla na jednotlivých aminokyselinách, jsme nalezli především kyselinu octovou, dále kyselinu propionovou, ve stopách i kyselinu glutarovou. To naznačuje, že došlo k neúplnému zkvašování jednotlivých aminokyselin a k tvorbě typických koncových produktů[12].



Obr. 6. **Růst bakterií v minerálním médiu podle Ilyaletdinova[10] s leucinem.** Spektrometr OPSYS (Dynex). ◆ BC – *Burgolderia cepacia*, ■ SP – *Sphingomonas paucimobilis* a ▲ SM – *Sphingobacterium multivorum*

U dalších dvou bakterií byla produkce kyselin nedetegovatelná, a proto zde bylo od analýzy metabolitů upuštěno.

Získané výsledky částečně souhlasily i s dřívějšími analýzami povrchu kamenů Karlova mostu v Praze. Zde jsme nalezli[13] velké množství derivátů kyseliny octové, především octan vápenatý, železnatý a octan amonný. Je zřejmé, že uvedené látky vznikaly interakcí stavebního kamene, řas a bakterií, které byly hojně přítomny na povrchu kamenné obšívky Karlova mostu. Protože kyselina glutarová, glyoxalová, oxaloctová a další jsou schopny chelatizace kationů Ca, Al, Si, Fe a Mn, se kterými vytváří komplexy, dochází tak k mobilizaci minerálů, což vede k zpráškování a degradaci povrchu stavebního kamene[14]. O rychlosti destrukce rozhoduje především druh kyseliny produkované mikroorganismy. Ta stoupá v řadě kyselina citronová, salicylová, asparagová a octová. Produktem bakteriální destrukce minerálů jsou koagulované gely alofánové povahy, složené z hydratovaných oxidů křemíku a hliníku se sorbovanými ionty K^+, Mn^{2+} a Ca^{2+}. Mobilizace minerálů organickými kyselinami je daleko rychlejší než kyselinami anorganickými[15].

Závěr

Byl prokázán vliv symbionta *Burgolderia cepacia*, který tvoří spolu s řasou *Aphanothece saxicola* organické kyseliny. Ty mohou zásadním způsobem urychlit zpráškování a degradaci povrchu silikátových materiálů. Práce tak podpořila názor o transformaci aminokyselin bakteriemi přítomných na povrchu fasád a o dominantním vlivu bakterií, nikoliv řas na degradaci stavebního kamene.

Příspěvek vznikl za podpory grantu NAKI DF 12P010VVO37.

LITERATURA

1. Herrera L. K., Videla H. A.: Int. Biodeterior. Biodegrad. *54*, 125 (2004).
2. Ortega-Calvo J. J., Arino X., Hernandez-Marine M., Saiz-Jimenez C.: Sci. Total Environ. *167*, 329 (1995).
3. Gaylarde P. M., Gaylarde C. C.: Int. Biodeterior. Biodegrad. *46*, 93 (2000).
4. Rulik M., Holá V., Růžička F., Votava M.: *Mikrobiální biofilmy*, Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Olomouc 2011.
5. Del Monte M., Sabbioni C.: Environ. Sci. Technol. *17*, 518 (1983).
6. Saiz-Jimenes C., Hermosin B., Ortega-Calvo J., Gómez-Alarcon G.: J. Anal. Appl. Pyrolysis *20*, 239 (1991).
7. Laiz L., Romanovska-Deskins A., Saiz-Jimenez C.: Int. Biodeterior. Biodegrad. *85*, 1100 (2011).
8. Vishal G., Sachitra K. R., Sood A., Chaudhary V., Prasana R.: Algal Res. *2*, 79 (2013).
9. Hinďák F., Cyrus Z., Marvan P., Javornický P., Komárek J., Ettl H., Rosa J. K., Sládečková A., Popovský J., Punčochářová M., Lhotský O.: *Sladkovodné riasy*, SPN, Bratislava 1978.
10. Ilyaletdinov A. V., Aliev R. M., Djusupova D. B.: Microbiologia *52*, 609 (1983).
11. Wang X., Li Z., Su, J., Tasan Y., Ning X., Hong H., Zheng T.: Biol. Control *52*, 123 (2010).
12. Rodwell W. V.: *Katabolismus uhlíkového řetězce aminokyselin*. Nakladatelství a vydavatelství H & H, Praha 1998.
13. Witzany J., Mencl V., Wasserbauer R., Gregerová M., Pospíšil P., Čejka T., Zigler R., Burgetová E.: Stavební Obzor *14*, 65 (2005).
14. Warscheid Th., Brahms J.: Int. Biodeterior. Biodegrad. *46*, 343 (2000).
15. Wasserbauer R.: *Biologické znehodnocení staveb*. ABF, a.s., Nakladatelství ARCH, Praha 2000.

R. Wasserbauer, Z. Rácová, and I. Loušová *(Microbiological and Chemical Laboratory, Department of Building Structures, Faculty of Civil Engineering, Czech Technical University, Prague):* **The Effect of Algal and Bacterial Colonies on the Formaton of Corrosion-active Compounds Degrading Silicate Building Materials**

The present study confirmed the effect of the *Burgolderia cepacia* symbiont, which, together with the *Aphanothece saxicola* algae, produces organic acids. These may significantly speed up the powder formation and surface degradation of silicate building materials. The study has supported the expert opinion on the transformation of amino acids by the bacteria present on the surface of facades.