

BIODIVERZITA KULTIVOVATELNÝCH PROKARYOT Z HRANICKÉ PROPASTI A MOŽNOSTI UPLATNĚNÍ TĚCHTO MIKROORGANISMŮ PŘI UTVÁŘENÍ KARBONÁTOVÝCH SPELEOTÉM

Biodiversity of culturable procaryotes from the Hranice abyss and the role of microorganisms in carbonate speleothemes forming

Milan Geršl^{1,2}, Marcel Kosina³, Ivo Sedláček⁴, Dana Nováková⁴, Fraňo Travěněc²

¹ Česká geologická služba, Leitnerova 22, 658 69 Brno; e-mail: gersl@cgu.cz

² Česká speleologická společnost, ZO 6-23 Aragonit

³ Oddělení mikrobiologie, ÚEB PřF MU, Tvrdeho 14, 602 00 Brno; e-mail: marekos@mail.muni.cz

⁴ Česká sbírka mikroorganismů, ÚEB PřF MU, Tvrdeho 14, 602 00 Brno

(25-14 Valašské Meziříčí)

Key words: Hranice Karst, Hranice Abyss, biofilm, snottites, isolation, species identification

Abstract

Hranice Karst is situated in northeastern part of Moravia, Czech Republic, at the contact between two major geological units of the Bohemian Massif and Western Carpathians. This karst developed in combination of meteoric water and hydrothermal dissolution of deformed and tectonically stacked Devonian and Lower Carboniferous limestones. This karst, therefore, exceeds to considerable depths of several hundreds metres. In the 1977, unusually massive organic coatings high in microbial extracellular polymers, occurring together with biofilm structures, were discovered in the vertical caves of low hydrothermally active „Hranická propast (Hranice Abyss)“, particularly on the cave walls in deep underwater environments. These mucilaginous formations may have been classified among „snottites“, mucous-like coatings and stalactites. The present study provides the first insights into both the microbial diversity and morphological/structural variability of these extremophilic formations.

Úvod

Hranický kras se rozkládá v sv. části kry Maleníku, která je součástí moravskoslezského paleozoika. Kra Maleníku je tvořena spodnokarbonskými sedimenty kulmské facie a ve své severovýchodní části také svrchnodevonskými a spodnokarbonskými vápenci macošského a líšeňského souvrství. Vápence byly podrobně ložiskově i regionálně zkoumány, shrnutí provedl Dvořák (1991). V poslední době je geologie Hranického krasu zkoumána především z pohledu strukturního, stratigraficko-faciálního i paleokrasového (např.: Bábek – Novotný 1999, Havíř et al. 2004, Dvořák 2004, Otava 2004 a Hladil et al. 2006). Hranický kras je krasem s nezastupitelným podílem hydrotermální geneze krasových objektů. Hydrotermálním krasovněním byla vytvořena také Hranická propast, jako nejznámější, dnes přímo emblematický jeskynný útvar tohoto typu zdejšího krasu. Syntézu představující současný stav znalostí krasovnění zde podal Otava (2005). Přes poměrně obsáhlé geologické výzkumy byly dodnes v Hranickém krasu opomíjeny podstatné a zajímavé skutečnosti týkající se mikrobiálních vlivů v horninovém prostředí a krasových dutinách. To se týká především hydrotermálního speleoprostoru. Malá pozornost byla dosud také věnována například minerální bioprecipitaci, biokorozi, anebo přímo vlivu mikrobiálního života na speleogenezi nebo tvorbu jeskynných výplní.

Zatopená část Hranické propasti představuje prostředí s nízkým obsahem organických látek, což

umožňuje osídlení oligotrofními mikroorganismy, které v podobných podmínkách mohou nezdědka dosáhnout dominance. Průměrná teplota vodního prostředí v propasti, která je okolo 16 °C, umožňuje výskyt psychrotrofních až psychrofilních mikroorganismů, ve smyslu jak byly definovány např. Moritou (1975). Z hlediska orientačních metod výzkumu, podle charakteru stěn bakterií anebo prokaryot celkově, ve vodních prostředích obecně převažují gramnegativní tyčky nad grampozitivními (Gramovo barvení). V případě minerálních vod jsou často izolovanými kmeny například zástupci „rodů“ *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Aeromonas*, *Vibrio* nebo skupiny *Flavobacterium-Cytophaga-Flexibacter* (srovnej Lee et al. 2001, Verhille et al. 1999, Quevedo-Sarmiento et al. 1986).

Historie výzkumu, popis nálezu specifických speleotém

V zatopených prostorách Hranické propasti jsou tedy již od roku 1977 periodicky pozorovány a dokumentovány specifické speleotémy. Poprvé byly popsány jedním z autorů této práce – F. Travěněcem (1977), který si při svém ponoru v Hranické propasti povšiml dosud nepozorovaných útvarů. Okolnosti nálezu jsou uvedeny v přepisu ze záznamu z potápěčského deníku: „**Dne 28. prosince 1977 jsem si při potápění v Hranické Propasti, Hranický kras, okres Přerov, v tzv. Jižní trhlíně, v části Heligón, všiml pod**

vodou podivných stalaktitických útvarů, silně připomínajících tvarem a konzistencí dětskou „nudli“ u nosu. Jelikož je žádný z kolegů potápěčů neznal a dosud si jich nikdo nevšiml, nazval jsem je pracovně „soplíky“. Usoudil jsem, že se jedná o kolonie specializovaných bakterií.“

Morfologická charakteristika rosolovitých, slizovitých speleotémových útvarů

1. Soplíky válcovité (zkráceně SV)

Tyto útvary mají podobu štíhlého válce o průměru cca 3–4 mm. Jejich délka dosahuje 30–120 mm. Horní, přibližně kruhová podstava je přirostlá na skalní strop či převislou stěnu a útvar visí svisle ve volném zatopeném prostoru.

1.1 Soplíky válcovité hladké (SVH)

Soplíky válcovité hladké mají tělo bez výběžků a větvení. Jsou mléčně průsvitné.

1.1.1 Soplíky válcovité hladké – krátké (SVHk)

Jedná se o rosolovité útvary válcovitého tvaru podobné drobným stalaktitům, hladké, průsvitné, délky 30–40 mm, průměr 3–4 mm. Poprvé pozorovány v tzv. *Jižní trhlina* ve vodorovné puklině *Jižní trhlina*, část *Heligón* v hloubce cca -35 m 28. 12. 1977 (ponor č. 68).

1.1.2 Soplíky válcovité hladké – dlouhé (SVHd)

Jedná se o rosolovité útvary válcovitého tvaru podobné drobným stalaktitům, hladké, mléčně zakalené, délky 150–200 mm, průměr 1,5–2 mm. Poprvé pozorovány ve *Vývěru teplé vody v Rotundam* (hloubka -30 m) dne 30. 5. 1993 (ponor č. 519.).

1.2 Soplíky válcovité chlupaté (SVC)

Válcovité chlupaté útvary mající tělo pokryté výběžky a s větvením. Připomínají mořské řasy. Délka těla je 30–80 mm, průměr těla bez výběžků je cca 3–4 mm, s výběžky dosahuje průměru cca 10 mm. Poprvé byly pozorovány v *Kanále ke gejsírákům v Rotundam* dne 31. 10. 1993 (ponor č. 531).

1.3 Soplíky válcovité kamenné (SVK)

Na svislých stěnách svislé žlábkové škrapy hloubky a šířky asi tak 12–20 mm. Škrapy byly porostlé těmito hnědočernými řasami [SVC]. Poprvé zjištěny na stěnách v *Kanále ke gejsírákům v Rotundam* dne 31. 10. 1993 (ponor č. 531).

2. Soplíky plošné (SP)

Pozorovány jako slizovité plátky velikosti až 20×20 mm, síly cca 0,5 mm. Poprvé pozorovány 2. 7. 1995 (ponor č. 579).

2.1 Soplíky plošné bílé (SPB)

V místech s čistou vodou se objevují soplíky plošné bílé SPB. Zřejmě se v nich nevyskytuje limonit.

2.2 Soplíky plošné hnědé (SPH)

V místech s kalsnou vodou (stále jde o kyselku!) v prostoru za *Zubatíci* (Rotundam v hloubkách od *Zubatice* do -30 m) a *Obratel* se objevují soplíky plošné hnědé SPH. Pravděpodobně se v nich vyskytuje limonit.

ROZDĚLENÍ SOPLÍKŮ PODLE MORFOLOGIE		
1. soplíky válcovité SV	1.1. hladké SVH	1.1.1. krátké SVHk
		1.1.2. dlouhé SVHd
	1.2. chlupaté SVC	
	1.3. kamenné SVK	
2. soplíky plošné SP	2.1. bílé SPB	
	2.2. hnědé SPH	

Tab. 1: Morfologické rozdělení soplíků.

Tab. 1: Subdivision of the snottites formations according to morphology.

Terminologie

Původní český termín „soplíky“ odpovídající podobě popisovaných speleotém byl použit F. Trávěncem (1977). Při rešeršním zkoumání podobných útvarů bylo zjištěno, že se takto běžně označují speleotémy podobného vzhledu i mezinárodně. V anglosaské vědecké literatuře je pro tyto speleotémy používán termín „snottites“ (např. Northup 2001, Hauhen a Culver 1998), což plně odpovídá námi používanému a již lokálně zcela vžitému českému ekvivalentu. Nejedná se tedy o žádný terminologický exces, i když příslušné organické mikrobiálně produkované útvary lze, samozřejmě, též opisně charakterizovat jako rosolovité, slizovité masy složené z organických, mikrobiálních vněbuněčných polymerů, živých i mrtvých mikroorganismů samotných a případně i minerálních, anorganických gelů, amorfních sraženin a krystalků.

Prostředí výskytu specifických speleotém

Soplíky se vyskytují v takových hloubkách, kde se při běžném poklesu hladiny vod v Hranické propasti nevynořují na sucho. Maximální dosud pozorovaná hloubka soplíků je -66 m (úsek *New York* – ponor č. 579 ze dne 2. 7. 1995). Je velmi pravděpodobné, že se vyskytují i ve větších hloubkách, ale dosud jim při ponorech se vzduchem nebyla potápěči, zejména pro problémy s dusíkovým opojením, věnována dostatečná pozornost. Při zatím asi deseti sestupech s heliem vykonaných na lokalitě Hranická Propast od 2. 5. 1981 (Trávěnc 1981) měli potápěči tolik problémů s vlastním zvládnutím ponoru, že neměli možnost věnovat se jakýmkoliv pozorováním těchto útvarů.

Tyto specifické speleotémy, soplíky, se vyskytují v místech dosahu denního světla (v *Ježířku*) i ve vzdálených jeskynních prostorách, v místech trvalé tmy.

Jelikož se jedná o první výsledky pilotních prací na těchto specifických speleotémách Hranické propasti, nebyla v této fázi výzkumu věnována detailní pozornost vlastnostem vod a hornin, které jsou v přímém kontaktu se studovanými objekty. Toho si jsou autoři vědomi a odpovídající systém vzorkování a analýz doplňující nynější sporou informací v tomto směru je naplánován pro navazující etapy prací. Současně, tedy poněkud obecné představy o složení mísených minerálních vod cirkulujících v Hranické propasti jsou zatím založeny na pilotních analýzách z let 1997–1998 (tab. 2).

		13. 10. 1997	15. 6. 1998	13. 7. 1998
E. C.	μS.cm ⁻¹	xx	1865	1620
Celk. acidita	mmol. l ⁻¹	3,90	34,00	30,00
Celk. alkalita	mmol.l ⁻¹	xx	xx	xx
Ca ²⁺	mg.l ⁻¹	159,5	338,5	205,8
Zn	μg.l ⁻¹	82,7	44,4	35,1
K ⁺	mg.l ⁻¹	10,0	7,6	7,3
Mg ²⁺	mg.l ⁻¹	57,1	39,9	48,4
Na+	mg.l ⁻¹	100,7	69,4	63,4
NH ⁴⁺	mg.l ⁻¹	0,00	0,01	0,04
NO ₂ ⁻	mg.l ⁻¹	0,00	<0,01	<0,01
NO ₃ ⁻	mg.l ⁻¹	<2,0	<2,0	<2,0
Cl ⁻	mg.l ⁻¹	38,8	35,6	35,1
SO ₄ ²⁻	mg.l ⁻¹	45	58	65
PO ₄ ³⁻	mg.l ⁻¹	0,02	0,06	0,07
Al	μg.l ⁻¹	596,7	379,8	482,5
Cd	μg.l ⁻¹	<0,75	<0,75	<0,75
Cr	μg.l ⁻¹	<2,60	<2,60	<2,60
Fe	μg.l ⁻¹	81,1	334,6	134,6
Mn	μg.l ⁻¹	12,4	153,2	157,9
Pb	μg.l ⁻¹	<4,90	<4,90	<4,90
Mezofilní bakt.	KTJ.1ml ⁻¹		78	865
Psychofilní bakt.	KTJ.1ml ⁻¹		256	1240
Myxobakterie	KTJ.1ml ⁻¹		0	0
Kvasná zkouška	+/--(p)10 ml		1	1
Teplot. test	+/--(p)10 ml		1	1
Coliformní bakt.	KTJ.10ml ⁻¹		345	77
Termotl. col. bakt.	KTJ.10ml ⁻¹		47	10
Fekální streptok.	KTJ.10ml ⁻¹		350	7

Vzorky byly odebírány z hladiny Jezírka Hranické propasti, odběr do polyetylenových a skleněných sterilních lahví prováděl M. Šteffan a M. Geršl. Analýzu provedly laboratoře Agentury ochrany přírody a krajiny ČR, laboratoře Brno.

Tab. 2: Příklady analýz minerálních vod z Jezírka v Hranické propasti.

Tab. 2: Examples of the analysis of the mineral water of the „Jezírko“ lake in the Hranická abyss.

Mikrobiální analýza prostředí a speleotém zaměřená na biodiverzitu kultivovatelných prokaryot Hranické propasti

Odběr a transport vzorků

Vzorky pocházejí z 5 míst v zatopené části a z 1 místa v suchých prostorách Hranické propasti (obr. 2). Jednalo se o 4 odběry vzorků vody a biofilmu z povlaků a doplňující odběr z guána (XII/2005 a III, VI a IX/2006).

Vzorky vody byly odebrány konkrétně z lokality *Jezírko*, ve vzdálenosti 0,5 m a 2,5 m od přístupové plo-

šiny. Další vzorky vody pocházely z hladin jeskynních jezer v prostorách *Nebe I* a *U gejzíráků* (cca 5 m pod hladinou). Vzorky povlaků byly vzorkovány ze severní stěny *Jezírka* cca 5 m pod hladinou a z místa *U gejzíráků* (cca 5 m pod hladinou). V *Rotundě suché* byl odebrán doplňující vzorek guána.

Vzorky vody a povlaků byly odebírány do sterilních vzorkovnic o objemu 70 ml. Odběry respektovaly zásady sterilní práce. Vzorkovnice se vzorky z hlubin byly po vymoření na břehu otevřeny a byl z nich opatrně odlit objem vody potřebný k dosažení sloupce vzduchu ve vzorkovnici (alespoň 2 cm). Vzorky byly poté zabaleny do alobalu, aby tak byly chráněny před světlem, následně byly uloženy do chladničky s mrazíci vložkami tak, aby se nedotýkaly přímo vložek, což by mohlo vést k stresování mikroorganismů náhlou změnou teploty. Do laboratoře ke zpracování byly vzorky přeneseny do 48 hod.

Zpracování a kultivace vzorků

Vzorky vody byly ředěny fyziologickým roztokem a z každého ředění byl proveden přímý výsev na Petriho misky s kultivačním médiem. Jako kultivační médium bylo zvoleno médium vhodné pro oligotrofní mikroorganismy: Trypton-sojový agar a NWRI-agar.

Vzorky z povlaků byly rozdělány na drobnější kusy (cca 1 cm²) a plaveny v řadě sedmi Petriho misek s destilovanou vodou. Povlaky byly takto zbaveny případných ulpěných mikroorganismů z okolní vody z prostředí odběru, které by mohly ovlivnit výpověď o složení povlaků. Získaný materiál byl následně mechanicky homogenizován a dávky homogenizátu byly ředěny ve fyziologickém roztoku. Z jednotlivých ředění byl proveden výsev na misky s kultivačním médiem (stejně jako u vzorků vody).

Misky s médii byly kultivovány aerobně při teplotě 15 °C po dobu 7–14 dnů, kdy došlo k vytvoření rozlišitelných kolonií. Z kolonií byla získána čistá kultura, která umožnila morfologický popis testem Gramovým barvením (v kombinaci s KOH testem). Izolované kmény byly uchovány metodou kryoprezervace na skleněných korálkách při teplotě -70 °C (Jones a kol. 1991). Kmény byly dále podrobeny základním biochemickým a fyziologickým testům. U vybraných skupin byla provedena analýza celkových buněčných proteinů metodou SDS-PAGE (Pot – Kersters 1994) a ribotypizace (Popovic et al. 1993). Z povlaků byl zhotoven preparát pro mikroskopii a bujónová kultura. Z dvoudenní bujónové kultury byl taktéž zhotoven mikroskopický preparát. Oba preparáty byly barveny dle Grama a pozorovány ve světelném mikroskopu.

Receptura kultivačních médií a použitých roztoků

Trypton-sojový agar: Oxoid CM0131	
Sojový pepton	5 g.l ⁻¹
Chlorid sodný (NaCl)	5 g.l ⁻¹
Agar	15 g.l ⁻¹
pH	7,3
NWRI-agar: (Häusler 1995)	
Pepton	3,0 g

Kasein (rozpuštěný)	0,5	g
Hydrogenfosforečnan draselný	0,2	g
Síran hořečnatý, heptahydrát	0,05	g
Chlorid železitý, hexahydrát	0,001	g
Agar	15,0	g
Destilovaná voda (doplnit do)	1000	ml
pH	7,2	

Bujón = m PYC ENRICHMENT BROTH; DIFCO:

Bacto-Nutrient Broth	8	g.l ⁻¹
Bacto-Proteose Pepton	2	g.l ⁻¹
Bacto-Proteose Pepton No. 3	20	g.l ⁻¹
Bacton-Casitone	2	g.l ⁻¹
Bacto-Yeast Extract	6	g.l ⁻¹
pH	7	

Fyziologický roztok:

Chlorid sodný	9	g
Destilovaná voda (doplnit do)	1000	ml

Výsledky mikrobiální analýzy

Počet izolátů, jejich zdroj a zařazení do základních skupin je shrnuto v tab. č. 3. Z celkového počtu psychrotrofních izolátů z vody bylo 18 kmenů psychrofilních (29,5 %). V případě izolátů z povlaků bylo 5 kmenů psychrofilních (28 %). Překvapivým zjištěním bylo dominantní postavení gram pozitivních bakterií v souboru izolovaných kmenů, které téměř dvojnásobně převyšovaly gram negativní izoláty.

V preparátu zhotoveném přímo z povlaků byl nalezen menší počet rozsivek (diatom) a torza vláknitých řas. V preparátu z bujónové kultury byl pozorován velký počet gram negativních kokotýček a tyček rozrůstajících se z nehomogenizovaných částí povlaků (obr. 1). Z gram pozitivních buněk byly hojné tyčky uspořádané do vláken a sporující buňky s oválnými spory, které povětšinou buňky nezduřovaly.

Skupina	Původ izolátů	Počet izolátů	Fenon*
Gram negativní nefermentující tyčky	Voda	20	A
	Povlak	4	B
Gram negativní fermentující tyčky	Voda	3	C
	Povlak	0	D
Gram pozitivní nesporeující tyčky	Voda	19	E
	Povlak	10	F
Gram pozitivní sporující tyčky	Voda/guano	3/1	G
	Povlak	2	H
Gram pozitivní koky, kokotýčky až rozpadající se tyčky	Voda	16	I
	Povlak	2	J

*Identifikace na základě morfologie, biochemických a fyziologických testů, testů na citlivosti k antibiotikům a analýzy celkových buněčných proteinů.

Tab. 3: Přehled izolovaných skupin mikroorganismů.
Tab. 3: Overview of isolated groups of the microorganism.

Fenon A) 8 kmenů fluorescentní *Pseudomonas* spp. – pravděpodobně: *Pseudomonas fluorescens* (6 kmenů), *Pseudomonas veronii* (1 kmen) a *Pseudomonas gessardi* (1 kmen). Dále 1 kmen blíže neurčená *Pseudomonas* sp. a 1 kmen *Pseudomonas pseudoalcaligenes*; 10 kmenů neidentifikováno ani na úrovni rodu.

Fenon B) *Pseudomonas stutzerii/fluorescens* komplex, *Pseudomonas fluorescens* a dva neidentifikované kmeny.

Fenon C) 2 kmeny *Aeromonas hydrophila* do poddruhu neurčené. Dále jeden kmen blíže neurčené gram negativní fermentující oxidáza pozitivní tyčky.

Fenon D) Z této skupiny nebyly izolovány žádné kmeny.

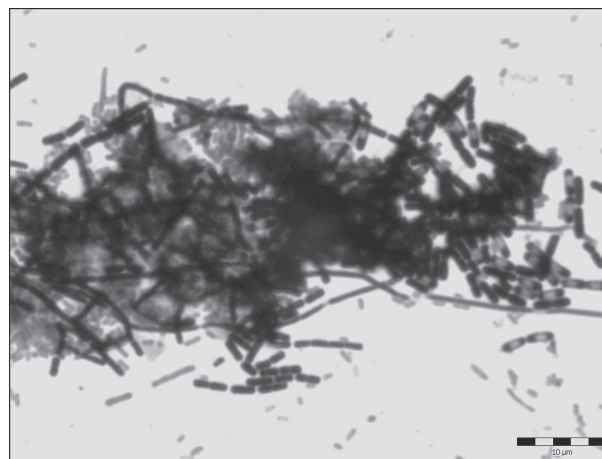
Fenony E, F) Skupina zahrnuje fenotypově neidentifikovatelné kmeny gram pozitivních tyček (k diferenciaci nutná chemotaxonomie).

Fenon G) Vzorky z vody: 2 kmeny *Aneurinibacillus* sp., 1 kmen *Bacillus psychrophilus*; 1 kmen *Bacillus fusiformis* z guána.

Fenon H) 2 kmeny *Bacillus* sp., druhově neurčené.

Fenon I) 4 kmeny *Micrococcus* sp. blíže neurčené, 3 kmeny *Staphylococcus* sp. blíže neurčené. 8 kmenů neidentifikovaných morfologicky řazené mezi koky, kokotýčky až rozpadající se vlákna (k diferenciaci nutná chemotaxonomie).

Fenon J) 2 kmeny *Micrococcus* sp. druhově neurčené.



Obr. 1: Gram negativní a gram pozitivní kokotýčky až tyčky rozrůstající se z nehomogenizovaných částí biofilmu (preparát z bujónové kultury; mikroskop Olympus BX50). Foto: M. Kosina.

Fig. 1: Gram-negative and gram-positive short rods and rod-shaped bacteria growing from unhomogenised parts of the biofilm (broth culture medium; microscope Olympus BX50). Photo: M. Kosina.

Závěr

Z mikroskopických preparátů a kultivačních metod lze konstatovat, že povlaky obsahují skutečně živou složku, překvapivě poměrně hojný komplex jednobuněčných i mnohobuněčných řas, rozsivek, jakož i kultivovatelné a pravděpodobně i nekultivovatelné prokaryotní organismy. V případech, kdy je tento komplex strukturovaný, se tedy jedná o biofilm, i když objekty s převahou vněbuněčných polymerů vylučovaných mikroorganismy a zachycenými částicemi jsou také velmi pravděpodobné.

Očekávaný výskyt striktně psychrofilních prokaryot v prostorách Hranické propasti byl potvrzen, i když například

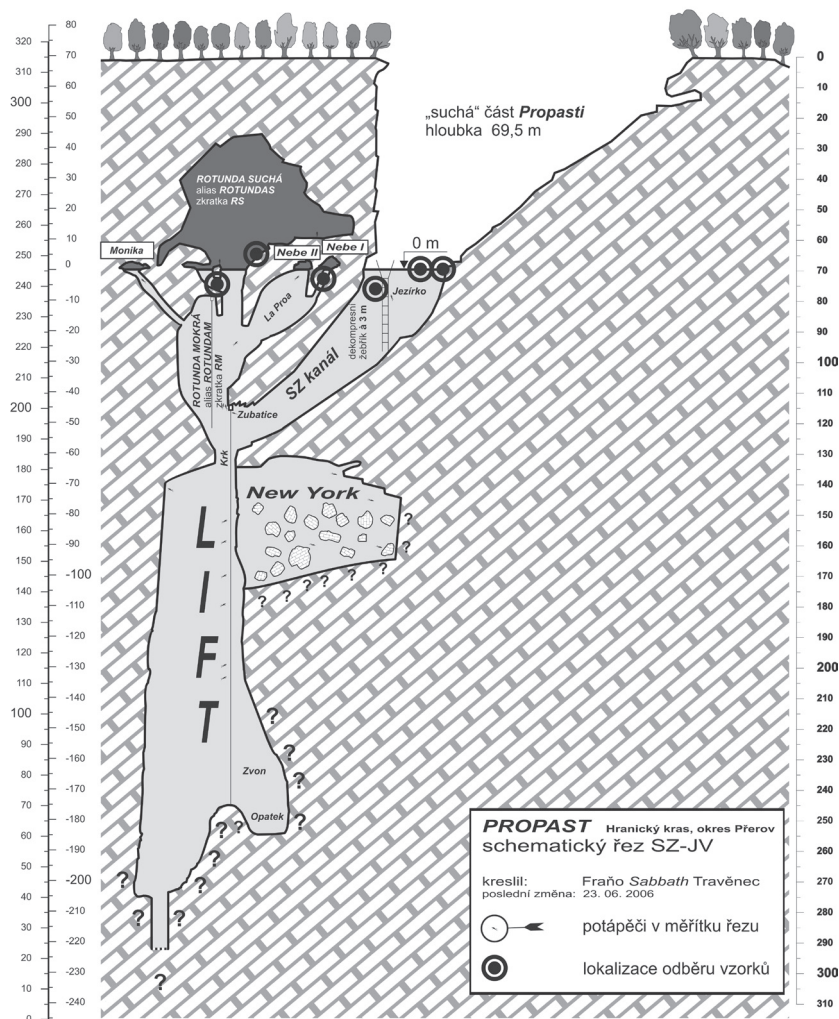
předběžně morfoloicky indikovaný výskyt aktinomycet a dalších skupin autotrofních a heterotrofních mikroorganismů ve vzorcích nebyl cestou izolace a kultivace kmenů potvrzen. Procentuální zastoupení izolovaných psychrofilních prokaryot ve vodě a v povlacích bylo téměř shodné, netvořily však většinu zkoumané mikrobioty, na rozdíl od psychrotrofních izolátů s širším teplotním růstovým rozmezím.

Z kultivatelných mikroorganismů zde převažovali zástupci rodu *Pseudomonas*, kteří se ve vodách i biofilmech vyskytují často a to i jeskynních a podobných extrémních prostředích. Řada z nich byla izolována přímo z minerálních vod (Baídaa 2001, Verhille a kol. 1999, Švec a kol. 2004). Další skupinou, která se ojediněle vyskytovala jak ve vodě, tak v biofilmech, byli zástupci rodu *Bacillus*, jejichž endospory jsou vysoce odolné vůči extrémním, jak chemickým, tak i fyzikálním vlivům prostředí. Vzhledem k širokému růstovému teplotnímu rozmezí izolovaných sporulujících kultur, které obsahuje i teplotní rozmezí vyplývající z měření v Propasti, lze očekávat, že se kmeny obsažené v tomto mikrobiálním společenstvu mohou aktivněji zařadit i do širších ekologických vztahů. Rod *Pseudomonas*, který je rozšířen naprosto ubikvitárně a je velmi biochemicky aktivní, schopný růstu jak v aerobním, tak i v mírně anaerobním prostředí, mající též široké růstové teplotní rozmezí, se může dosti výrazně podílet na mikrobiálním složení studovaných povlaků. Nadpoloviční část izolátů reprezentovaly překvapivě grampozitivní tyčky, ovšem jejich rodová či druhová identifikace byla často neúspěšná.

Izolace a kultivace uvedených zástupců jednotlivých skupin bakterií problémová nebyla, avšak jejich identifikace ve většině případů nebyla na základě základních rutinních testů možná. Pro konečnou identifikaci je nutné nejen provést základní testy zkoumající morfoloické, biochemické a fyziologické vlastnosti, ale také použít přístup polyfázové taxonomie, která využívá mnoho složitých a mnohdy běžně nedostupných metod. Průsečíkem výsledků každé z těchto metod je pak konečná identifikace vykultivovaného bakteriálního kmene.

Literatura

Bábek, O. – Novotný, R. (1999): The Hněvotín Limestone neostratotype locality revisited: A conodont biostratigraphy and carbonate microfacies approach, Moravia, Czech Republic. – Acta Univ. Pal. Olom. Fac. Rer. Natural., Geologica, 36, 63-68. Olomouc.



Obr. 2: Schématický řez Hranickou propastí s vyznačením odběrových lokalit.
 Fig. 2: Simplified map of the Hranice Abyss with location of the studies objects.

Přestože při pozorování na lokalitě i v detailně odebraných vzorcích byly nalezeny inkrustace popisovaných mikrobiálních útvarů aragonitem nebo kalcitem a byla zjištěna i některá stadia skutečné litifikace, tyto otázky byly zatím odloženy, neboť na počátku řešení problému bylo nutné nejprve zodpovědět (tj., alespoň částečně, v té míře, jak to podle kultivací a použitých metod je možné) otázky ohledně mikrobiální biodiverzity a jejího vztahu k prostředí výskytu popisovaných spelitémových útvarů.

Poděkování

Děkujeme doc. DrSc. J. Hladilovi (AV ČR) za cenné rady a podnětné připomínky při řešení tohoto problému.

Práce byla částečně podpořena projekty „MSM0021622416“ a „Základní geol. mapování 1:25 000 vybraných oblastí ČR oblast DÚ 07 Maleník-Poodří“.

- Dvořák, J. (1991): Geology of the carbonate evolution of the Devonian and the Lower Carboniferous near Grygov, Přerov, Sobišky and Hranice (Northern Moravia). – *Scripta Geology*, 21, 37-62. Brno.
- Dvořák, V. (2004): The orientation structural analysis of the Hranice karst limestones. – *Geol. Výzk. Mor. Slez. v r. 2003*, 11, 42-45. Brno
- Haugen, K. – Culver, D. C. (1998): Snapshots of subterranean biodiversity. 1888, 1960 and 1997. – *Natn. Speleolog. Soc. Conv.*, Sewanee, TN, USA, August 3-7, Biology Section Papers, August 4-5, http://www.utexas.edu/tmm/sponsored_sites/biospeleology/nss98abstracts.htm
- Häusler J. (1995). Mikrobiologické kultivační metody kontroly jakosti vod – receptář. – Ministerstvo zemědělství České republiky, 13 str., Praha.
- Havíř, J. – Bábek, O. – Otava, J. (2004) : Vztah struktur, stratigrafie a krasovění ve Zbrašovských aragonitových jeskyních. – *Geol. Výzk. Mor. Slez. v r. 2003*, 46-50. Brno.
- Hladil, J. – Geršl, M. – Strnad, L. – Frána, J. – Langrová, A. – Spišiak, J. (2006): Stratigraphic variation of complex impurities in platform limestones and possible significance of atmospheric dust: a study with emphasis on gamma-ray spectrometry and magnetic susceptibility outcrop logging (Eifelian-Frasnian, Moravia, Czech Republic). – *Int. J. Earth Sci.*, 95, 587-607. Springer, New York.
- Jones, D. – Pell, P. A. – Sneath, P. H. A. (1991). Maintenance of bacteria on glass beads at -60 °C to -76 °C. – In: Kirsop, B. E. – Doyle, A. (Eds.): *Maintenance of Microorganisms and Culture Cells. A Manual of Laboratory Methods*. Academic Press. London.
- Lee, J. S. – Shin, Y. K. – Yoon, J. H. – Takeuchi, M. – Pyun, Y. R. – Park, Y. H. (2001): *Sphingomonas aquatilis* sp. nov., *Sphingomonas koreensis* sp. nov. and *Sphingomonas taejonensis* sp. nov., yellow-pigmented bacteria isolated from natural mineral. *Int. J. Syst. Evol. Microbiology*, 51, 1491-1498. Reading, UK.
- Morita, R. Y. (1975)“ Psychrophilic Bacteria. – *Bacteriol. Rev.*, 39, 2, 144-167.
- Baída, N. – Yazourh, A. – Singer, E. – Izard, D. (2001). *Pseudomonas brenneri* sp. nov., a new species isolated from natural mineral waters. *Res. Microbiol.* 152, 493-502
- Northup, D. E. (2001): *Geomicrobiology of Caves: A Review*. – *Geomicrobiology J.*, 18, 199-222. Taylor & Francis, Philadelphia, PA, USA.
- Otava, J. (2005): Polycyclic origin of fossil karst at Hranice Palaeozoic, Czech Republic. – 14th Int. Congr. Speleol., Abstract Book: 121-122, Athens, Greece.
- Otava, J., (Ed.) (2004): Vysvětlivky a základní geologická mapa České republiky 1:25 000 list 25-123 Hranice. – MS, Archiv Česká geologická služba. Praha-Brno.
- Popovic, T. – Bopp, C. A. – Olsvik, Ø. – Kiehlbauch, J. A. (1993): Ribotyping in molecular epidemiology. – In: Persing, D. H. – Smith, T. F. – Tenover, F. C. – White T. J. (Eds.): *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. 573-583. ASM Press, Washington, USA.
- Pot, B. – Vandamme, P. – Kersters, K. (1994): Analysis of electrophoretic whole-organism protein fingerprints. In: Goodfellow, M., O'Donnell, A.G. (Eds.): *Modern microbiological methods. Chemical methods in Prokaryotic systematics*. John Wiley and Sons, 493-521. Chichester, UK.
- Travěnek, F. (1977): Sabbath diving logbook. – MS, Archiv F. Travěnek, Olomouc.
- Travěnek, F. (1982): 110 m s héliovzduchovou směsí v Hranické Propasti. – *Stalagmit*, 4, 1-2, 6-7. Čes. speleolog. spol. Praha. Travěnek, F. (2001): Soplíky v Hranické Propasti. Předběžná zpráva. – MS, Archiv ZO ČSS 6-23 Aragonit, Hranice, 6 str. Olomouc.
- Verhille, S. – Baida, N. – Dabboussi, F. – Izard, D. – Leclerc, H. (1999): Taxonomic study of bacteria isolated from natural mineral waters: proposal of *Pseudomonas jessenii* sp. nov. and *Pseudomonas mandelii* sp. – *Syst. Appl. Microbiol.*, 22(1), 45-58. G. Fischer Verlag, Stuttgart.
- Quevedo-Sarmiento, J. – Ramos-Cormenzana, A. – Gonzalez-Lopez, J. (1986): Isolation and characterization of aerobic heterotrophic bacteria from natural spring waters in the Lanjaron area (Spain). – *J. Appl. Bacteriol.* 61, 4, 365-372. Blackwell Publishing, Oxford.
- Svec, P. – Stegnerova, H. – Durnova, E. – Sedlacek, I. (2004): Characterization of esculin-positive *Pseudomonas fluorescens* strains isolated from an underground brook. *Folia Microbiol.*, 49(6), 725-730. Praha.