



Mikrobiološka analiza površin betona na Gimnaziji Jožeta Plečnika Ljubljana

Raziskovalna naloga s področja biologije

**Mija Kapun
Emilija Rojnik**

Mentorji:
doc. dr. Polona Zalar
doc. dr. Martina Turk
mag. Darja Silan, prof. biologije

Ljubljana, marec 2025

Zahvala

Raziskovalno delo je bilo izdelano za srečanje mladih raziskovalcev ljubljanske regije. Slikovni, teoretični in eksperimentalni del naloge sva v večini opravila samostojno, a raziskovalne naloge bi brez pomoči, napotkov in izkušenj mentorjev težko izdelala zaradi zahtevnosti nekaterih eksperimentalnih tehnik.

Zahvala gre zlasti mentorjem dr. prof. Poloni Zalar, doc. dr. Martini Turk in mag. Darji Silan, saj so nama razložili teoretično ozadje raziskovalnega dela, predstavili protokole za varno delo v laboratoriju ter so bili vedno pripravljene odgovoriti na vsa vprašanja.

Zahvaljujeva se tudi Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete za opravljanje eksperimentalnega dela od decembra 2024 do marca 2025. Zahvala gre tudi zaposlenim na tem Oddelku, predvsem raziskovalki Mojci Matul, Marini Jelenko, dr. Moniki Kos in ga. Barbari Kastelic Bokal za strokovno pomoč pri izvedbi eksperimentov in pri delu z laboratorijsko opremo. Zahvaljujeva se tudi oddelku K3 Inštituta Jožefa Stefana za SEM posnetke okruškov betona ter dr. Andreji Pondelak z Zavoda za gradbeništvo za SEM posnetke kristalov.

Zahvala gre tudi profesorici Lari Vertačnik, za strokovni pregled kemijskega dela naloge ter profesorju slovenščine dr. Nejcju Rožmanu Ivančiču za lektoriranje raziskovalne naloge.

Zahvaljujeva se tudi ravnateljici Gimnaziji Jožeta Plečnika Ljubljana, gospe Lidiji Žigon, za odobritev raziskovanja in za podporo pri obšolskem raziskovalnem delu ter drugim svojim profesorjem.

Zahvala gre tudi najinim sošolcem 3. A in razredničarki Antoniji Špegel Razbornik, prof. matematike, ki so naju spodbujali pri raziskovanju.

Povzetek

V raziskavi smo preučevali prisotnost in potencialni vpliv mikroorganizmov na beton, pri čemer smo se osredotočili na njihovo rast, presnovne lastnosti ter sposobnost raztapljanja in tvorbe mineralov.

Vzorčili smo na različnih mestih betonske ograje na terasi Gimnazije Jožeta Plečnika ter na izbranih vzorčnih mestih odvzeli tudi betonske okruške. Pri opazovanju rasti mikroorganizmov smo ugotovili, da se na bolj vlažnih površinah pojavljata večja mikrobnost in številčnost. Z analizo betonskih okruškov pod vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) smo zaznali biološke ostanke in nanos kalcijevega karbonata (CaCO_3), pri čemer je bil največji nanos zaznan na vzorcu z višjo vlažnostjo, ki je imel tudi največjo rast in biodiverzitetu, kar kaže, da je CaCO_3 posledica aktivnosti mikroorganizmov.

Nadaljnje analize so pokazale, da imajo izolirani mikroorganizmi lahko tako pozitivne kot negativne učinke na beton. Nekateri izolati tvorijo pigmente, ki lahko povzročajo nezaželene estetske spremembe betonskih površin, medtem ko so drugi sposobni raztapljanja CaCO_3 , kar lahko vodi v degradacijo materiala. Identificirali smo tudi mikroorganizme, ki izkazujejo pozitivne lastnosti za beton, kot je sposobnost biomineraliziranja, kar omogoči betonu ti.i samoceljenje. Vsi glivni in dva izbrana bakterijska izolata so ureazno pozitivni, kar pomeni da s procesom ureolize tvorijo minerale. Rezultati predlagajo načine za zaščito betonske dediščine ter podpirajo razvoj ideje biomineralizacije in samoobnovljivih materialov za trajnostno gradbeništvo.

Abstract

In this study we investigated the presence and potential impact of micro-organisms on concrete, focusing on their growth, metabolic properties and the ability to dissolve and form minerals. We sampled different locations of the concrete fence on the terrace of the Jože Plečnik High School and also took concrete samples at selected sample points. When observing the growth of micro-organisms, we found that higher microbial diversity and abundance occur on wetter surfaces. By analysing the concrete samples under a scanning electron microscope (SEM), we detected biological debris and calcium carbonate (CaCO_3) deposition, with the highest deposition detected on the sample with the higher moisture content, which also had the highest growth and biodiversity, indicating that the CaCO_3 is formed due to microorganism activity.

Further analysis showed that isolated micro-organisms can have both positive and negative effects on concrete. Some isolates form pigments that can cause undesirable aesthetic changes to concrete surfaces, while others are capable of dissolving CaCO_3 , which can lead to material degradation. We have also identified micro-organisms that exhibit positive properties for concrete, such as the ability to biomineralise, which allows the concrete to self-harden. All fungi and two selected bacterial isolates are urease-positive, which means that they form minerals by the process of ureolysis. The results of our research also suggest ways to protect the concrete heritage and support the development of the idea of biomineralisation and self-renewable materials for sustainable construction.

Kazalo

1	UVOD.....	1
1.1	Motivacija za raziskavo	1
1.2	Vpliv mikroorganizmov na strukturo kamnitih površin	1
1.3	NAMEN DELA.....	2
2	CILJI IN HIPOTEZE.....	5
3	TEORETIČNI DEL	6
3.1	Beton in mikroorganizmi	6
3.1.1	Splošno o betonu.....	6
3.1.2	Deterioracija betona.....	6
3.1.3	Vpliv mikroorganizmov na biodeterioracijo betona	7
3.1.4	Metode za zaščito in ohranjanje betona	7
3.2	Lastnosti mikroorganizmov, ki vplivajo na beton	8
3.2.1	Pigmentacija.....	8
3.2.2	Tvorba kislin	9
3.2.3	Biomineralizacija	9
4	EKSPERIMENTALNI DEL.....	12
4.1	Material, reagenti in ostale kemikalije.....	12
4.2	Priprava gojišč	13
4.3	Vzorčenje	15
4.4	Izolacija čistih kultur.....	16
4.5	Morfologija gliv	17
4.6	Izolacija DNA in določevanje vrst mikroorganizmov	17
4.7	Testiranje lastnosti mikroorganizmov.....	17
4.7.1	Test sposobnosti tvorbe močnih kislin.....	18
4.7.2	Tvorjenje pigmentov	18
4.7.3	Test sposobnost agregacije CaCO ₃	18
4.7.4	Ureazni test	18

4.7.5 Test sposobnosti biomineralizacije CaCO ₃	18
4.8 Opazovanje površine okruškov betona in biogenih kristalov z vrstičnim elektronskim mikroskopom SEM.....	19
5 REZULTATI	20
5.1 Izolacija mikroorganizmov	20
5.2 Izolirane vrste.....	23
5.2.1 Izbrane izolirane vrste.....	24
5.3 Analiza površine okruškov betona z vrstično elektronsko mikroskopijo in mikroanalizo elementov	26
5.4 Testiranje lastnosti izbranih izoliranih vrst.....	30
5.4.1 Rast mikroorganizmov.....	31
5.4.2 Test spremljanja sprememb pH med rastjo v tekočem gojišču	32
5.4.3 Test tvorjenja šibkih kislin (raztapljanje CaCO ₃).....	32
5.4.4 Tvorjenje pigmentov	33
5.4.5 Testiranje tvorbe mineralov na gojišču PDA z virom kalcija.....	34
5.4.6 Testiranje agregacije na gojišču B4	35
5.4.7 Ureazni test	37
6 RAZPRAVA.....	39
6.1 Rast mikroorganizmov na betonu	39
6.2 Biološki ostanki in kalcijev karbonat na betonskih okruških	39
6.3 Lastnosti mikroorganizmov, ki vplivajo na ohranjanje in videz betona	40
7 ZAKLJUČEK	42
8 LITERATURA	43

Kazalo slik

Slika 1:Mešanje zmesi na magnetnem mešalu (A) in merjenje pH zmesi (B).	14
Slika 2:Avtoklaviranje (A) in ohlajanje v topli kopeli (B).	14
Slika 3:Vlivanje gojišča v Petrijeve posodice (A) ter pripravljena gojišča (B).	14
Slika 4 : vzorčenje.....	16
Slika 5:Mikroskopiranje betonskih okruškov pod SEM mikroskopom.....	19
Slika 12: Gojišča R2A, HA, MEA + Ch, DRBC in BHI vseh vzorčnih mest po 72h.	21
Slika 13: Gojišča R2A, HA, MEA + Ch, DRBC in BHI vseh vzorčnih mest po 144h.	22
Slika 14: Izbrani bakterijski izolati za nadaljnje poskus: <i>Pseudomonas rhodesiae</i> (B-1), <i>Bacillus tequilensis</i> (B-2), <i>Bacillus pseudomycooides</i> (B-3), <i>Chryseobacterium polytrichastri</i> (B-4), <i>Bacillus spp.</i> (<i>proteolyticus/wiedmannii/fungorum/ sanguinis</i>) (B-5).....	25
Slika 15: Izbrani izolati gliv: <i>Cladosporium pseudocladosporioides</i> (G-1), <i>Penicillium harmonense</i> (<i>chrysogenum</i>) (G-2), <i>Beauveria bassiana</i> (G-3), <i>Symmetrospora coprosmae</i> (G-4), <i>Sordaria fimicola</i> (G-5).....	26
Slika 6:Betonski okruški narejeni z vrstičnim elektronskim mikroskopom pri 200x (levo) in 2000x povečavi (desno).	27
Slika 7: Različne strukture na površini betonskih okruškov.....	27
Slika 8: EDS analiza betonskih okruškov na vzorčnem mestu GJP-1.....	28
Slika 9: EDS analiza betonskih okruškov na vzorčnem mestu GJP-2.....	29
Slika 10: EDS analiza betonskih okruškov na kontrolnem mestu GJP-K.	29
Slika 11: Prisotnost CaCO_3 plasti na betonskem okrušku GJP-1.	30
Slika 16: Kontrolna gojišča po inkubaciji za testiranje lastnosti mikroorganizmov.	30
Slika 17: Testiranje glivnih izolatov na sproščanje kislin v gojišču s peptonom, ki je poznan po puferskih lastnostih.	32
Slika 18: Kultura izolata G-2 na agarnem gojišču s CaCO_3 , glukozo in pH indikatorjem bromkrezol vijolično. Barva indikatorja je na območju spremenjene pH vrednosti rumena, pod kolonijami pa gojišče ni več motno zaradi raztapljanja CaCO_3	33
Slika 19: Izolat B-1 pod UV svetlobo.....	33
Slika 20: Preverjanje ali glivni izolati tvorijo pigmente.	34
Slika 23: Primerjava piramidalnih kristalov – izolat G-3 (A) in okroglih kristalov – izolat G-1 (B) .	35
Slika 24: Kristali bakterijskega izolata B-2	35
Slika 25: Kristali glivnega izolata G-3.....	36
Slika 26: Kristal izolata G-5, pri različnih povečavah.....	36

Slika 21: Ureazni testi bakterijskih izolatov (na epruveh) in rast izolatov na gojišču PDA z virom kalcija na agarnih ploščah.....37

Slika 22: Ureazni test glivnih izolatov G-5 (ureazno pozitiven) in G-3 (ureazno negativen).38

Kazalo tabel

Tabela 1: Prikaz števila kolonij in poimenovanih vrst mikroorganizmov iz izvornih gojišč R2A, HA, MEA, DRBC in BHI.....	23
Tabela 2: Prikaz izbranih bakterijskih izolatov za nadaljnje poskuse.	24
Tabela 3: Prikaz izbranih glivnih izolatov za nadaljnje poskuse.	25
Tabela 4: Lastnosti, ki lahko negativno (znižanje pH, luženje mineralov iz kamnin- agregacija CaCO ₃ na B4) in pozitivno (tvorba mineralov na PDA) vplivajo na beton.	31

Kazalo shem

Shema 1:Shematski potek eksperimentalnega dela.	2
Shema 2:Shematski prikaz določanja lastnosti mikroorganizmov s katerimi vplivajo na spremembe betonske podlage.....	3
Shema 3:Potek hidrolize uree.	10
Shema 4: Skice vzorčnih mest na betonski ograji terase na strehi Gimnazije Jožeta Plečnika v Ljubljani.	
A: GJP-1, B: GJP-2, C: GJP-3, D: GJP-K.	15

1 UVOD

1.1 Motivacija za raziskavo

Nadgrajevanje šolskega znanja, pridobljenega med urami biologije, z raziskovanjem v laboratoriju na raziskovalnem inštitutu ali fakulteti, je za srednješolce velik izziv. Želeli sva izboljšati svoje znanje biologije povezano z biodiverzitetjo mikroorganizmov na šolski terasi. Stavbni objekti arhitekta Jožeta Plečnika so Ljubljani dali značilno podobo in predstavljajo pomembno kulturno dediščino. Njegov edinstven slog se odraža tudi na stavbi gimnazije, ki je poimenovana po njem. Zanimalo nas je, kako različni mikrobiološki dejavniki vplivajo na originalni betonski material iz katerega je postavljena ograja na terasi gimnazije.

Srednješolsko znanje biologije sva nadgradili z raziskovanjem v laboratoriju Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, kjer so nama temo biodiverzitetje mikroorganizmov ter njihovega vpliva na različne površine tudi predstavili. Poleg znanja biologije nama je pri raziskovanju prišlo prav tudi dobro poznavanje kemije

1.2 Vpliv mikroorganizmov na strukturo kamnitih površin

Mikroorganizmi so prisotni povsod. Najdemo jih tudi na zunanjih kamnitih predmetih in objektih kulturne dediščine. Razvoj vrst mikroorganizmov na posamezni kamniti površini določajo narava in lastnosti kamnine (mineralna sestava, pH, slanost, vlažnost, tekstura). Odvisen je tudi od okoljskih dejavnikov kot so: temperatura, relativna vlažnost, svetlobni pogoji, stopnje onesnaženosti ozračja, veter in padavine (Nuhoglu, 2006). Do nedavnega so kot primarne naseljevalce kamnitih materialov obravnavali avtotrofne mikroorganizme, saj so zaradi svoje sposobnosti izkoriščanja CO₂ sposobni življenja na anorganskih substratih. Za heterotrofe pa je veljalo, da lahko kolonizirajo kamnite substrate le po naselitvi avtotrofov, saj potrebujejo organski vir ogljika. Vendar novejša raziskava kažejo, da so številni heterotrofni mikroorganizmi prisotni na kamninah tudi brez avtotrofov, saj za svojo rast izkoriščajo organske spojine nastale zaradi nepopolnega zgorevanja fosilnih goriv, ki se sproščajo v zrak in se odlagajo na površine (Nuhoglu, 2006).

Mikroorganizmi, ki se naselijo na kamnite površine kulturne dediščine, lahko neposredno vplivajo na njihovo razgradnjo. Posledično površine izgubijo tako kulturno kot tudi denarno vrednost (Pyzik, 2021).

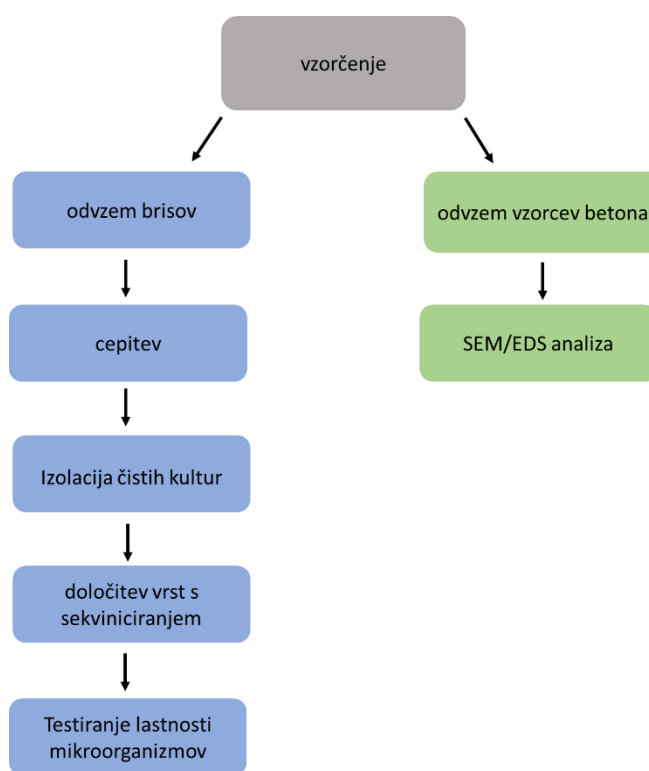
V zaprtih prostorih je kulturno dediščino lažje ohranjati, saj lahko nadzorujemo vlažnost zraka, ki je eden izmed glavnih dejavnikov, ki vplivajo na sposobnost preživetja mikroorganizmov. Zunanje kamnite strukture težje ohranjamo, saj so bolj izpostavljene

procesom propadanja zaradi spreminjajočih se okoljskih razmer in pomanjkanja učinkovitih preventivnih strategij (Pyzik, 2021).

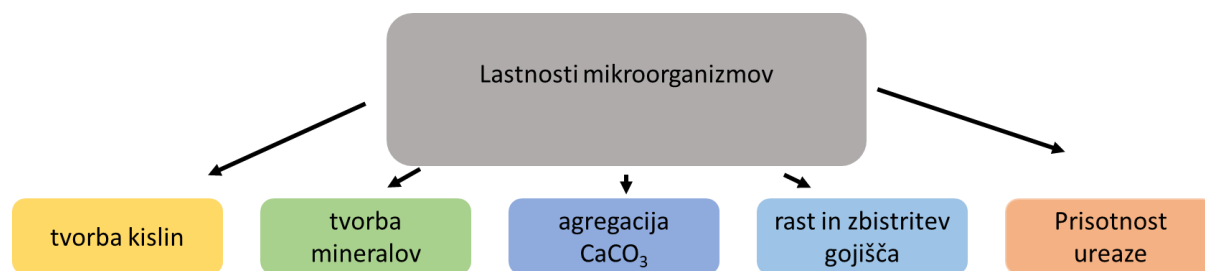
Neželena sprememba lastnosti materiala, ki jo povzroči delovanje bioloških dejavnikov - biodeterioracija (Dungani, 2019) lahko prav tako vodi v degradacijo materiala.

1.3 NAMEN DELA

Namen raziskovalne naloge je ugotoviti, katere vrste mikroorganizmov živijo na betonski ograji terase Gimnazije Jožeta Plečnika Ljubljana ter določiti lastnosti mikroorganizmov s stališča poškodb oz. potencialnih ugodnih lastnosti za beton.



Shema 1: Shematski potek eksperimentalnega dela.



Shema 2: Shematski prikaz določanja lastnosti mikroorganizmov s katerimi vplivajo na spremembe betonske podlage.

Vzorčili smo na različnih betonskih površinah na terasi Gimnazije Jožeta Plečnika. Odvzete brise smo nanесли na različna gojišča ter izolirali mikroorganizme v čistih kulturah. Mikroorganizme smo tudi identificirali.

Okrušene koščke betona pa smo odvzeli le tam, kjer je beton že bil razdrobljen, in najverjetneje predstavljajo sekundarno dodan beton. Površino okruškov betona pa smo analizirali s pomočjo vrstične elektronske mikroskopije (SEM/EDS) (Shema 1).

Preučili smo, ali so med našimi izolati za beton neugodne vrste mikroorganizmov, ki bodisi tvorijo močne kisline in / ali izločajo pigmente. Opazovali smo njihovo rast ter vpliv na zbitritev glukoznega agarnege gojišča s kalcijevim karbonatom (CaCO_3). Zanimalo nas je tudi, če lahko s svojim metabolizmom ugodno vplivajo na beton, in sicer, če lahko s procesom ureolize inducirajo tvorbo mineralov. S pomočjo SEM analize smo želeli ugotoviti obliko nastalih kristalov kot produktov biomineralizacije (Shema 2).

2 CILJI IN HIPOTEZE

Pred začetkom raziskovalnega dela smo si zastavili naslednje cilje:

- preučiti prisotnost mikroorganizmov na vzorcih vidno spremenjenega betona na ograji terase Gimnazije Jožeta Plečnika Ljubljana v primerjavi z navidezno nespremenjenim betonom iste ograde
- z betonske ograde neinvazivno odvzeti vzorce za gojenje mikroorganizmov (brise)
- določiti vrste mikroorganizmov izoliranih v čistih kulturah
- določiti nekatere lastnosti mikroorganizmov, ki bi lahko pospeševale razgradnjo betona in lastnosti, ki bi lahko prispevale k procesu celjenja betona

Na podlagi zastavljenih ciljev predpostavljamo naslednje hipoteze:

1. Površina betonskih okruškov bo hrapava, pri čemer bodo na njej prisotni biološki ostanki ter nanosi kalcijevega karbonata, ki so posledica metabolnega delovanja mikroorganizmov ter okoljskih dejavnikov.
2. Mikrobna raznolikost in številčnost bosta večji na bolj vlažnih predelih betona v primerjavi s suhimi.
3. Določene vrste mikroorganizmov bodo pogosteje prisotne na betonu zaradi svoje prilagodljivosti na okolje.
4. Predvidevamo, da bomo našli za beton nevarne kot tudi koristne mikroorganizme.

3 TEORETIČNI DEL

3.1 Beton in mikroorganizmi

3.1.1 Splošno o betonu

Beton je najpogosteje uporabljen material v gradbeništvu, ker je poceni, dostopen in enostaven za uporabo. Po sestavi je heterogena mešanica, sestavljena iz agregata (peska različnih velikosti), veziva (cementa), vode in dodatkov, ki izboljšujejo lastnosti betona. Komponente se med seboj povežejo preko kompleksnih kemijskih reakcij.

3.1.2 Deterioracija betona

Poškodbe betona-deterioracija se kažejo na različne načine, najpogosteje pa z nastankom razpok. Razlog za nastanek razpok je najpogosteje degradacija materiala ali izpostavljenost nekaterim agresivnim pogojem. Razpoke zmanjšujejo trajnost betonskih struktur, ogrozijo tesnost materiala in vplivajo na estetiko. Prav tako pore, ki nastanejo ob strjevanju betona, lahko predstavljajo težave, če se povežejo med seboj in omogočijo pretok tekočin po notranjosti betona. Razgradljivost betona je v veliki meri posledica povečane koncentracije karbonatov, anorganskih žveplovih spojin ter drugih kemično agresivnih reagentov abiotskega ali biotskega izvora. Interakcije naštetega s sestavinami betona igrajo ključno vlogo pri sprožitvi in poteku korozijskih procesov.

Poškodbe betona so pogosto posledica nepravilne sestave betonske mešanice in neustreznega vzdrževanja. Med najpogostejšimi fizikalnimi dejavniki, ki vplivajo na degradacijo betona, sta zmrzal in visoke temperature. Ob visokih temperaturah voda izhlapeva iz cementne paste in povzroča nastanek por, ki omogočajo vstop vode in agresivnih reagentov, kar poveča poroznost betona in njegovo degradacijo. Številne kemijske snovi, kot so kisline, baze, soli, plini, olja, maščobe, sladkorji in druge agresivne spojine, povzročajo kemijsko korozijo betona. Nekatere med naštetimi - kisline (organske in anorganske), soli (predvsem sulfati), vodikov sulfid, amonijak in ogljikov dioksid lahko izvirajo iz agregatov, zraka, dimnih plinov, vode in industrijskih onesnaževal. Kisline povečujejo vlažnost in znižujejo pH betona (pod 5), kar zmanjšuje njegovo tlačno in upogibno trdnost.

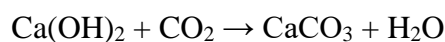
3.1.3 Vpliv mikroorganizmov na biodeterioracijo betona

Biodeterioracija betona je fizikalni ali kemijski proces, pri katerem mikroorganizmi, kot so bakterije, alge, lišaji, glive kvasovke in druge glive, vplivajo na strukturno in kemično celovitost betona. Ta proces lahko povzroči poslabšanje strukturne in funkcionalne lastnosti betona ter spremeni videz betona (Jiang, 2022). Mikroorganizmi so lahko prisotni na površini, v razpokah in razpokanih mestih ali znotraj materiala. Na degradacijo betona predvsem vplivajo presnovne aktivnosti mikroorganizmov, kot so npr.: izločanje encimov, aminokislin ali presnovnih stranskih produktov, kot so kisline.

Večina gliv raste v obliki nitastih hif, ki imajo sposobnost podaljševanja in prodiranja v goste materiale, vključno z betonom. Najbolj znane vrste gliv, ki prispevajo k biološki razgradnji betona, so *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger* in *Cladosporium sphaerospermum*. Te glive so okoljsko prilagodljive in sposobne preživetja v ekstremnih pogojih, zato so tudi sposobne preživeti v in na betonu. Celična avtoliza omogoča ohranjanje virov za preživetje in rast v okoljih z nizko vsebnostjo hranil, medtem ko micelij olajšuje transport hranil, vode in kisika znotraj glivnih kolonij. Beton je zaradi poroznosti dovzeten za glivno rast, saj pore omogočajo vstop hif, vode in hranil, kar spodbuja širjenje gliv in s tem razgradnjo betona.

3.1.4 Metode za zaščito in ohranjanje betona

Metode za zaščito betona so različne, najpogosteje se priporočajo številni zaščitni premazi. Danes pa obstajajo tudi samopopravljivi betoni. Pri t.i. celjenju uporabijo komponente, ki se nahajajo v samem materialu. Eden izmed procesov samoceljenja materialov je proces mineralizacije, pri katerem se tvori kalcijev karbonat, ki zapolnjuje razpoke z rasto kristalov. Med hidratacijo cementa se tvori kalcijev hidroksid (Ca(OH)_2), ki je eden od stranskih produktov kemijske reakcije med cementom in vodo. Kalcijev hidroksid je relativno topen v vodi, zato se lahko sprosti v okolje in reagira z ogljikovim dioksidom (CO_2) iz atmosfere. Reakcija, ki se pri tem zgodi, je znana kot karbonitizacija in poteka po naslednji enačbi:



Enačba 1

Nastali kalcijev karbonat (CaCO_3) je slabo topen in povzroča zbijanje cementne paste ter povečanje tlačne trdnosti betona (sposobnost betona, da prenese sile, ki delujejo nanj v smeri njegovega stiskanja (tlačjenja), ne da bi pri tem prišlo do njegovega loma). Kljub nizki ceni je popravilo ali zamenjava poškodovanega betona tehnično zahtevna in draga, pri tem pa nastane tudi okolju škodljiv odpadek (Buh, 2019).

Biom mineralizacija pa je ideja, ki temelji na tem, da bi beton vseboval mikroorganizme sposobne proizvajati apnenec ali kalcit, produkt pa se bi nalagal v razpoke betona in s tem omogočil betonu, da bi bila struktura odporna na vodo in bolj trajnostna. Najbolj znane bakterije, ki jih uporabljajo pri samovgradnji v beton so: *Bacillus pasterurii*, *Bacillus sphaericus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cohnii*, *Bacillus pseudofirmus*, *Bacillus halodurans* in *Bacillus massiliensis*. Navedene bakterije so bacili, gram pozitivne in aerobne bakterije (Buh, 2019). Najbolj znana vrsta nitastih gliv, ki pripomore k samoceljenju betona je *Trichoderma reesei* (Jiang, 2022).

3.2 Lastnosti mikroorganizmov, ki vplivajo na beton

3.2.1 Pigmentacija

Pigment lahko opredelimo kot kemično spojino, ki lahko absorbira del fotonov, ki padejo nanjo, preostanek prepusti, ti fotoni pa nato padejo v območje zaznavanja človeških oči (Jaradat, 2011). Mikroorganizmi običajno ustvarjajo naravne pigmente kot so karotenoidi, flavini, fenazini, violaceini, melanini idr. Ti pigmenti so bistveni za izvorno sposobnost prilagoditve težkim okoljskim razmeram in opravljanja posebnih celičnih funkcij (na primer fotosinteze pri fotosintetskih mikroorganizmih) (Orlandi, 2022). Mikroorganizme ščitijo pred UV poškodbami, pigmenti kot pa so karotenoidi in fenazini, in tudi pred oksidativnimi poškodbami. Pigmenti, kot je piocianin (iz *Pseudomonas aeruginosa*), spodbujajo nastajanje biofilma in povečujejo odpornost bakterij na antibiotike. Fotosintetske bakterije uporabljajo fotosintetske pigmente, med katere spadajo tudi klorofili in fikobilini, za pridobivanje energije iz svetlobe (Hermansson, 1987).

3.2.2 Tvorba kislin

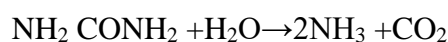
Bakterije, ki proizvajajo kisline, so zaradi lokalizirane proizvodnje korozivnih kislih metabolitov eden glavnih vzrokov za korozijo. Vrste in količine proizvedenih kislin so odvisne od vrste mikroorganizmov in razpoložljivih substratnih molekul (Hussein, 2023). Anorganske kisline, ki jih proizvajajo mikrobi, so dušikova kislina (HNO_3), žveplena kislina (H_2SO_3), žveplova kislina (H_2SO_4) in ogljikova kislina (H_2CO_3) (Wandelt, 2018).

Tudi filamentozne (nitaste) glive so znane po svoji sposobnosti tvorbe organskih kislin. Z zniževanjem pH okolja povečajo svojo konkurenčno prednost (Pullan, 2014). Mikroorganizmi izločajo organske kisline, ki reagirajo s kalcijevimi spojinami v betonu, kar vodi do nastanka topnih ali netopnih kalcijevih soli (npr. kalcijev citrat) in posledične oslabitve materiala. Amonifikacijske bakterije razgrajujejo sečnino v amonijak, sulfat reducirajoče bakterije pa proizvajajo vodikov sulfid (H_2S), ki lahko povzroči korozijo betonskih kanalizacijskih cevi. Številne glive sintetizirajo oksalno kislino, ki tvori kalcijev oksalat, vezan na različne mikrobiološke strukture v tleh.

3.2.3 Biomineralizacija

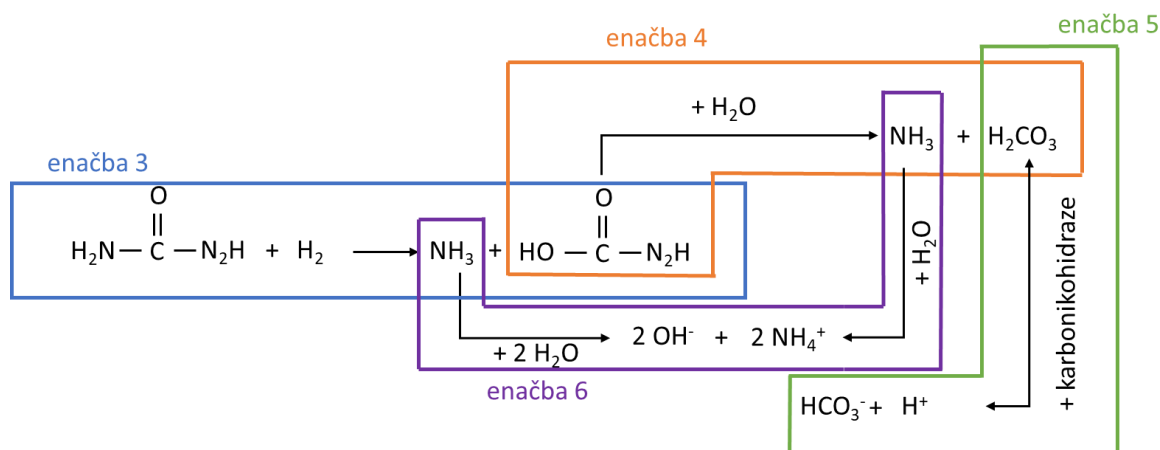
Biomineralizacija je proces odlaganja mineralov v celicah živih organizmov ali zunaj njih (Boskey, 2003). Lahko je biološko kontrolirana (BCM), biološko inducirana (BIM) ali pa biološko posredovana (BMM). Minerali, ki so produkt BIM so proizvedeni kot stranski produkt interakcij med stranskimi metabolnimi produkti mikroorganizmov in ioni, ki so prisotni v okolju. Pri BMM je produkcija mineralov rezultat interakcije med organskim matriksom in organsko / anorgansko spojino, brez potrebe po zunajcelični ali znotrajcelični biološki aktivnosti (Castro-Alonso s sod., 2019).

Biomineralizacija ponavadi pomeni mikrobno inducirano precipitacijo kalcijevega karbonata (MICP), ki je produkt metabolnih reakcij mikroorganizmov. Te metabolne reakcije vključujejo: hidrolizo uree, denitrifikacijo in anaerobno dihanje z sulfatom kot končnim akceptorjem elektronov (Castro-Alonso s sod., 2019). Najbolj pogost način MICP je hidroliza uree. Hidroliza uree (NH_2CONH_2) s pomočjo vode in encima ureaze vodi v nastanek amonijaka (NH_3) in ogljikove kisline (H_2CO_3).



Enačba 2

Ureaza je encim, ki ga imajo določene bakterije, omogoča pa precipitacijo CaCO_3 . Precipitacija CaCO_3 preko hidrolize uree poteka po spodaj prikazanih enačbah prikazanih na shemi 3:



Shema 3:Potek hidrolize uree.

Pri hidrolizi uree poteka vrsta zapletenih reakcij, ki jih vodita encima ureaza in karboanhidraza. Ureaza hidrolizira en mol uree v en mol amonijaka in karbamata (enačba 3), karbamat pa se brez zunanjega vpliva ali dodatne energije hidrolizira v en mol amonijaka in ogljikove kisline ob prisotnosti vode (enačba 4). Ogljikova kislina se pretvori v bikarbonat (enačba 5) s pomočjo karbonikohidraze (encimom, ki katalizira reakcijo hidrolize ogljikovega dioksida (CO_2) v ogljikovo kislino (H_2CO_3) in obratno), dva mola amonijevega iona (NH_4^+) in hidroksida pa nastaneta zaradi hidrolize amonijaka (enačba 6). Posledično se pH okoli celice poveča in povzroči obarjanje kalcijevega karbonata v prisotnosti topnega Ca^{2+} . Proces omogoča zaščito bakterijske celice v neugodnih razmerah. Za izločanje karbonatnih ionov je potrebna nizka koncentracija protonov in visoka koncentracija Ca^{2+} v mikrookolju, medtem ko prenasičenost karbonata povzroči obarjanje kalcijevega karbonata na površini celice (Castro-Alonso s sod., 2019).

Nastanejo biomineralni polimorfni kristali z različnimi tipi kristalizacije, npr. kalcit, aragonit in vaterit, oblikujejo pa se lahko tudi romboedrične, ortorombične in heksagonalne kristale (Sarayu s sod., 2014). Sondi in Salopek-Sondi (2015) sta ugotovila, da so se v prisotnosti ureaze pri vrstah rodu *Bacillus* namesto kalcita obarjali sferični in enakomerni delci vaterita, medtem ko je prisotnost ureaze vrst rodu *Canavalia* povzročila obarjanje samo kalcita. Pokazalo se je, da so delci vaterita sestavljeni iz kristalitev nano velikosti, kar dokazuje pomen procesov združevanja v nano velikosti za nastanek koloidnih karbonatov. Zmanjšanje

koncentracije ureaze pri vrstah rodu *Bacillus* v reakcijski raztopini povzroči nastanek kristalov kalcita s kompleksnejšo površinsko morfologijo od tistih, ki jih dobimo z ureazo mikroorganizmov iz rodu *Canavalia* (Sondi, Salopek Sondi, 2015).

4 EKSPERIMENTALNI DEL

4.1 Material, reagenti in ostale kemikalije

Pri delu v laboratoriju smo upoštevali navodila za varno delo s kemikalijami in mikroorganizmi. Uporabljali smo zaščitno varovalno delovno opremo in upoštevali priporočila iz varnostnih listov posameznih kemikalij. Odpadne kemikalije smo združevali v odpadno posodo, v kateri so ustrezno hranjene za nadaljnjo predelavo.

Materiali:

- vatenke za odvzem brisov FLOQ SWABS
- sterilne plastične Petrijeve posodice
- parafilm
- krovna in objektna stekla
- plastične cepilne zanke za enkratno uporabo

Reagenti in kemikalije:

- etanol, čistost: 99,9 %, proizvajalec: Carlo Erba, Formula C₂H₅OH, CAS št.: 64-17-5.
- H₂O, deionizirana, filter: Milli-Q.
- fiziološka raztopina, proizvajalec: B. Braun
- raztopina kristal vijolično
- Lugolova raztopina
- raztopina safarin
- sladni ekstrakt
- pepton
- casein pepton
- proeozni pepton
- škrob
- NaCl, proizvajalec: Sigma Aldrich
- CaCO₃, proizvajalec: Sigma Aldrich
- Na₂HPO₄, proizvajalec: Sigma Aldrich
- glukoza, proizvajalec: Sigma Aldrich
- škrob, proizvajalec: Sigma Aldrich
- agar

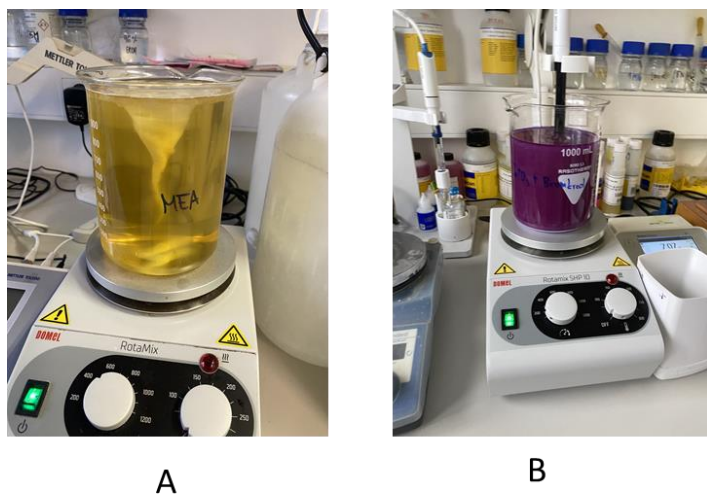
- bromkrezol vijolično
- kvasni ekstrakt
- KH_2PO_4 , proizvajalec: Sigma Aldrich
- $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, proizvajalec: Sigma Aldrich
- dikloran
- bengal rožnato
- kloramfenikol
- bromtiol modro
- urea, proizvajalec: Sigma Aldrich

Aparature:

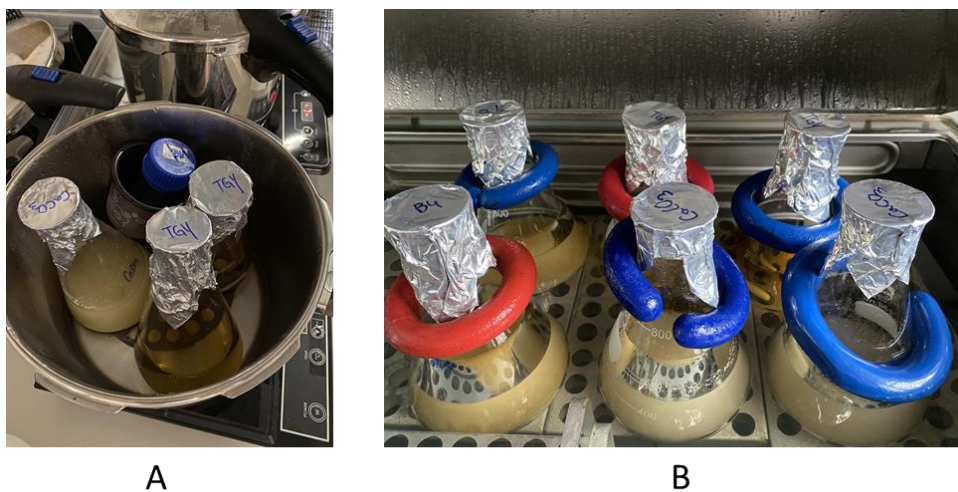
- avtoklav
- svetlobni mikroskop Olympus BX 51
- stereomikroskop Olympus ZX
- invertni mikroskop EVOS 5000
- namizna centrifuga Eppendorf
- termoblok Eppendorf
- SEM mikroskopa Thermo Fisher Quanta 650 ESEM in JEOL JMS-IT500

4.2 Priprava gojišč

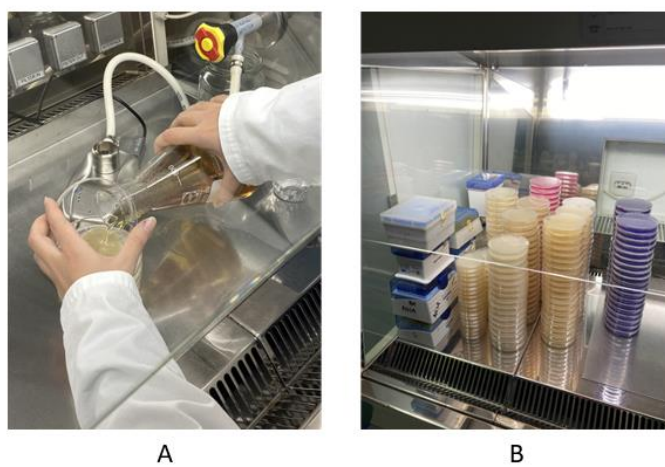
Pripravili smo več vrst standardiziranih gojišč: MEA, DRBC, R2A, BHI, CaCO_3 glukozni agar, CaCO_3 glukozni agar z dodatkom pH indikatorja bromkrezol vijolično, modificirani B4, OA in PDA z dodatkom kalcija. Natehtane suhe sestavine gojišč smo stresli v erlenmajerico in jih zalili z 800 ml destilirane vode. Nato smo zmes mešali na magnetnem mešalu, dokler ni postala homogena (slika 1, A). Izmerili smo pH in ga po potrebi prilagodili z dodatkom KOH ali HCl (slika 1, B), nato pa dodali še preostalih 200 mL vode. Sledilo je 20-minutno avtoklaviranje pri 121 °C (slika 2, A), nato postopno ohlajanje v topli kopeli pri 55°C (slika 2, B) in na koncu razlivanje gojišč na plošče (slika 3, A).



Slika 1: Mešanje zmesi na magnetnem mešalu (A) in merjenje pH zmesi (B).



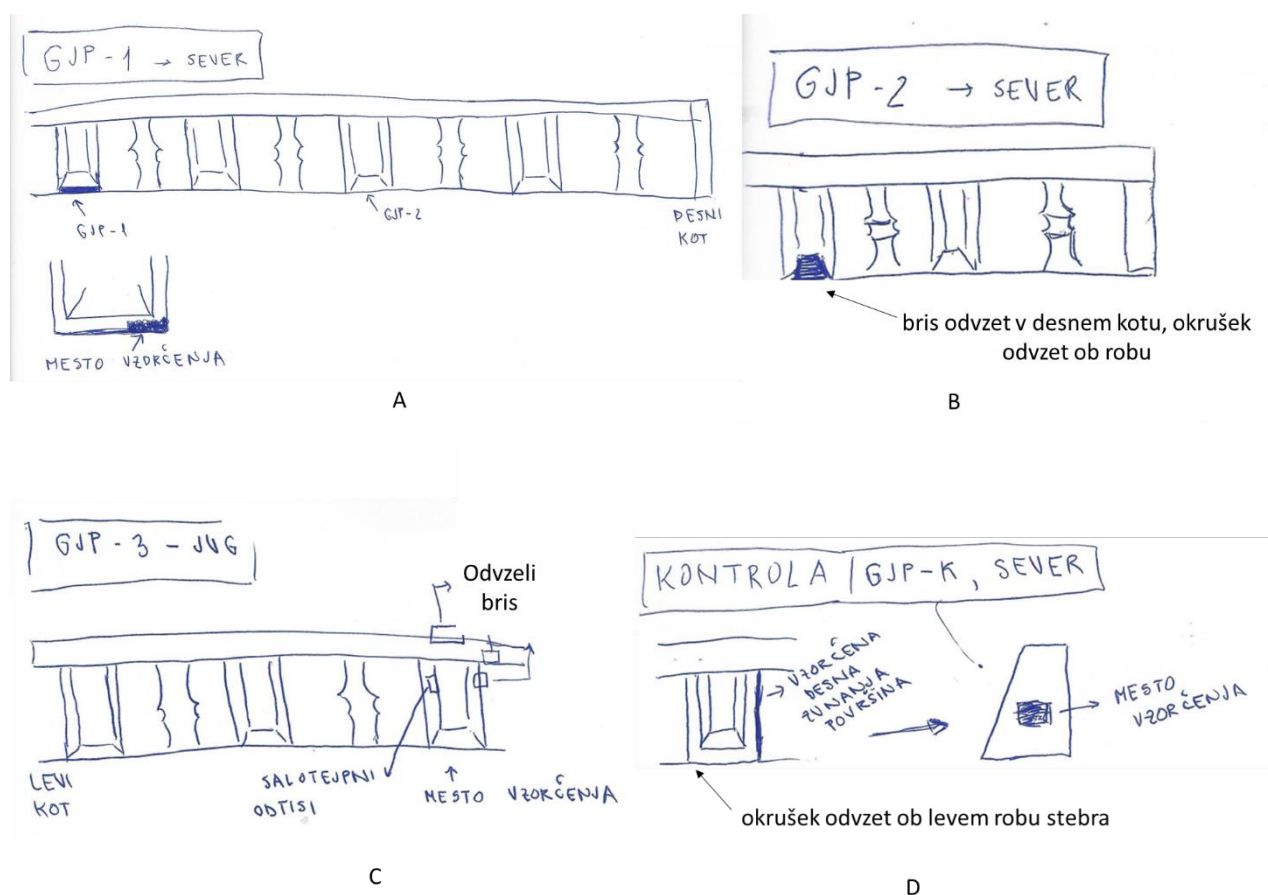
Slika 2: Avtoklaviranje (A) in ohlajanje v topli kopeli (B).



Slika 3: Vlivanje gojišča v Petrijeve posodice (A) ter pripravljena gojišča (B).

4.3 Vzorčenje

Vzorčenje smo izvedli na terasi Gimnazije Jožeta Plečnika, dne 13.12.2024. Zunaj je bilo oblačno, temperatura je bila 3° C. Na terasi smo si izbrali 4 vzročna mesta: 1. vzorčno mesto (GJP-1), 8. steber na S strani terase, kamor se je voda iz žleba zlivala na začetnem delu terase (shema 4, A). Na območju je bilo veliko vode, opazna je bila tudi obsežna rast alg. 2. vzorčno mesto (GJP-2) je bil 4. steber ob strani terase (shema 4, B), kjer ni bilo prisotno veliko vode. 3. vzorčno mesto (GJP-3) je bil steber na južni strani terase, ki je bil prekrit s ptičjimi iztrebki (shema 4, C). Kontrolno mesto (GJP-K) smo določili na stebru blizu drugega stebra, kjer ni bilo vidnih posebnosti ali nepravilnosti (shema 4, D). Postopek vzorčenja je bil enak na vseh vzorčnih mestih.



Shema 4: Skice vzorčnih mest na betonski ograji terase na strehi Gimnazije Jožeta Plečnika v Ljubljani. A: GJP-1, B: GJP-2, C: GJP-3, D: GJP-K.

Brise smo odvzeli z vzorčno paličico z najlonskimi ščetinami znamke FLOQ SWABS. Vsako palčko smo shranili v pripadajoči pokrov in bris kasneje prenesli na gojišča, in sicer v naslednjem vrstnem redu: R2A, HA, MEA + Ch, DRBC in BHI.

Postopek nanosa je bil povsod enak: z bris palčko smo vzorce nanegli z vijugastim gibom na površino vsakega gojišča. Petrijevke smo ovili s parafilmom in jih shranili v inkubacijsko komoro pri 20 °C, ter jih vsaj enkrat tedensko pregledovali v časovnem okviru štirih tednov.

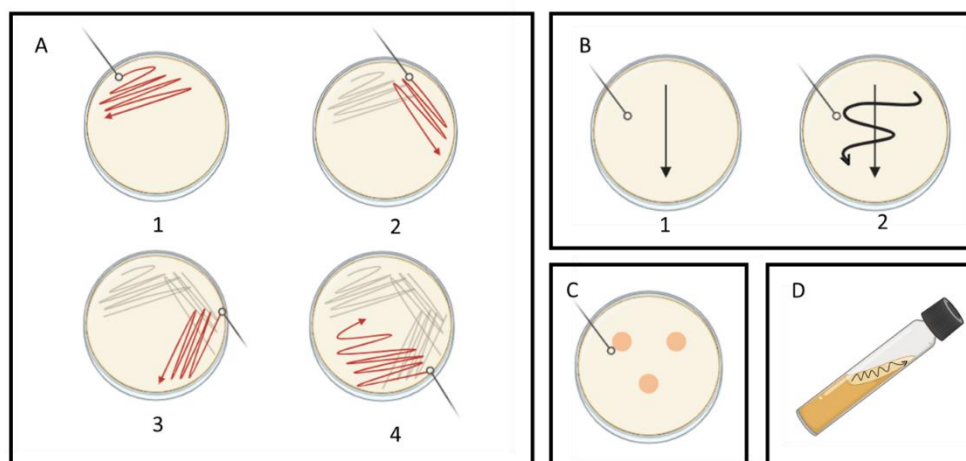


Slika 4 : vzorčenje.

4.4 Izolacija čistih kultur

Osnovne izolacijske plošče smo pregledali pod stereomikroskopom in nastale kolonije mikroorganizmov oštevilčili. Za izolacijo čistih kultur smo gojišča najprej označili z oznako vzorca, številko izbrane kolonije ter datumom. Za izolacijo bakterij in kvasovk smo uporabili metodo redčenja do posameznih kolonij (shema 5, A), medtem ko smo glive sprva cepili v črti po sredini plošče (shema 5, B), za teste pa smo pripravili suspenzijo spor v raztopini za pripravo suspenzije spor (SSS) in jih nacepili na gojišča 3-točkovno (shema 5, C).

Po 72 urah je zrastle veliko različnih bakterijskih kolonij, medtem ko je bilo glivnih kolonij precej manj, saj je optimalen čas za rast gliv običajno 14 dni. Glede na to, da imajo glive sposobnost rasti preko bakterijskih kolonij, smo po 72 urah izolirali bakterijske kolonije.



Shema 5: Prikaz nacepljanja mikroorganizmov na gojišča. Metodi redčenja do posameznih kolonij za nacepljanje bakterij (A); Prikaz Izolacija gliv v črti po sredini agarne gojišča (B); Tri-točkovno cepljenje gliv (C); Cepljenje bakterij za teste ugotavljanja lastnosti (D). Skica je narejena s pomočjo spletne strani Biorender.

4.5 Morfologija gliv

Glive smo 3-točkovno nacepili na gojišča MEA, OA in PDA ter po 14-ih dneh izmerili premere njihovih kolonij (Shema 5, C). Za opazovanje strukture in barve kolonij pod mikroskopom smo preparate obarvali s 40% raztopino barvila anilin modro v mlečni kislini.

4.6 Izolacija DNA in določevanje vrst mikroorganizmov

Iz čistih kolonij mikroorganizmov so na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov izolirali njihovo DNA z uporabo kompletov reagentov Monarch in PrepMan Ultra. V nadaljevanju so z verižno reakcijo s polimerazo (reakcija PCR) pomnožili markerje za identifikacijo bakterij in gliv. Za bakterije so pomnožili 16S rRNA, za glive pa ITS rRNA. Zaporedja nukleotidov so določili v podjetju Microsynth (Avstrija). Nadalje smo preverili elektroferograme pridobljenih nukleotidnih zaporedij in jih prevedli v fasta obliko. Nukleotidna zaporedja smo primerjali z referenčnimi zaporedji v podatkovni bazi NCBI (GenBank) in na podlagi procenta podobnosti mikroorganizme identificirali.

4.7 Testiranje lastnosti mikroorganizmov

Testirali smo lastnosti mikroorganizmov, ki bi lahko vplivale negativno na beton, to so: sposobnost tvorbe močnih kislin (tekoče gojišče »pH« in trdno gojišče CaCO_3 z glukozo z in brez dodanega pH indikatorja) in tvorbe pigmentov (gojišče B4). Na slednjem smo testirali sposobnost agregacije CaCO_3 (gojišče B4). Kot pozitivne lastnosti smo preverjali prisotnost encima ureaze (ureazno gojišče) ter uporabo ureaze za biomineralizacijo (gojišče PDA z virom kalcija Ca^{2+}).

4.7.1 Test sposobnosti tvorbe močnih kislin

Sposobnost tvorjenja kislin smo najprej preverili z uporabo gojišča »pH«. Gojišče ima pufirske lastnosti zaradi dodanega peptona. PH gojišča ob pripravi je bil 8,0. Po inkubaciji po 4 in 7-ih dneh smo s pH lističi izmerili pH tekočih gojišč v Falkonovih centrifugirkah.

Sposobnost tvorbe šibkih kislin lahko vidimo na trdnem gojišču s CaCO_3 . Gojišče je motno zaradi dodatka CaCO_3 , medtem ko se ob tvorbi kislin postane prosojno, saj kisline raztopijo CaCO_3 . V enako gojišče smo dodali tudi pH indikatorsko barvilo bromkrezol vijolično, ki je gojišče ob izvorni pH vrednosti obarvalo vijolično. Ob sproščanju kislin pa gojišče porumeni.

4.7.2 Tvorjenje pigmentov

Tvorbo pigmentov smo spremljali na vseh agarnih gojiščih, še posebej pa na B4 gojišču. Ugotavljali smo barvo kolonij ter barvo gojišča v njihovi okolici.

4.7.3 Test sposobnost agregacije CaCO_3

Sposobnost agregacije CaCO_3 smo spremljali na gojišču B4. Pripravili smo si preparat celic / micelija v vodi in ga mikroskopirali. Preverili smo tudi v kakšni obliki je CaCO_3 v nenacepljenem in inkubiranem gojišču.

4.7.4 Ureazni test

Ureazni test je potekal na poševnih gojiščih z ureo in pH indikatorjem. Poševnike smo inkubirali 24-48 ur pri 25 °C in spremljali spremembo barve gojišča iz oranžne v vijolično.

4.7.5 Test sposobnosti biomineralizacije CaCO_3

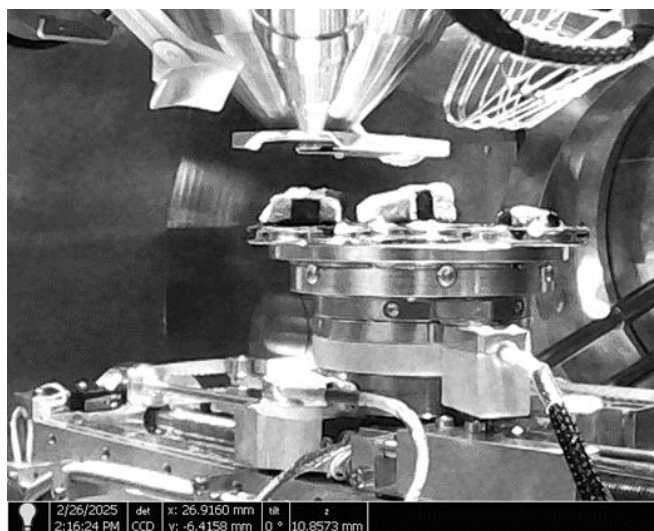
Sposobnost biomineralizacije smo preverjali na agarnih ploščah PDA. Sprva smo prisotnost kristalov opazovali makroskopsko, nato pod stereomikroskopom in nazadnje z mikroskopijo micelija (celic) in okolice micelija.

Pri glivah in bakterijah, kjer smo kristale opazili, smo jih izolirali oz. pripravili za mikroskopijo pod elektronskim mikroskopom. Izolacija je potekala po protokolu za izolacijo biogenih kristalov iz trdnega gojišča (dr. Monika Kos, Oddelek za biologijo).

4.8 Opazovanje površine okruškov betona in biogenih kristalov z vrstičnim elektronskim mikroskopom SEM

Okruške betona so nam analizirali na Inštitutu Jožefa Stefana (Slika 4). Posnetki so bili narejeni z elektronskim mikroskopom Thermo Fisher Quanta 650 ESEM. Izvedli smo tudi EDS analizo s programsko opremo za EDS, Oxford Instruments, AZtec Live, Ultim Max SDD 40 mm². Kristale smo analizirali na Zavodu za gradbeništvo.

Kristale smo za analizo najprej naprašili z 10 nm zlata z oprashaalnikom QUORUM Q 150T ES PLUS in jih s tem naredili prevodne. Nato smo naredili posnetke z elektronskim mikroskopom JEOL JMS-IT500.



Slika 5: Mikroskopiranje betonskih okruškov pod SEM mikroskopom.

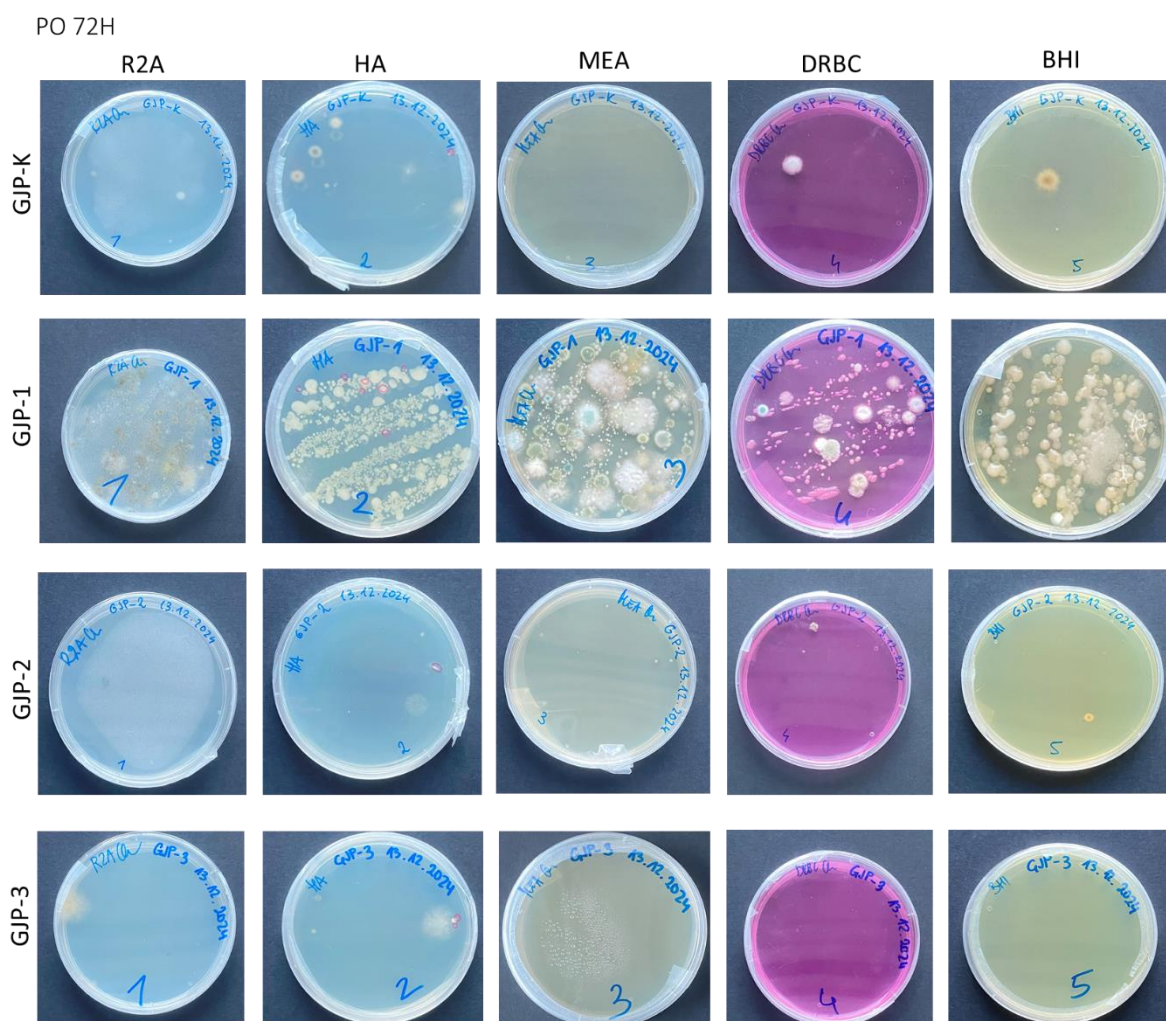
5 REZULTATI

5.1 Izolacija mikroorganizmov

Kot že navedeno v poglavju Materiali in metode, smo za vsako vzorčno mesto pripravili 5 različnih gojišč: R2A, HA, MEA+Ch, DRBC in BHI. Rast na gojiščih smo opazovali po več časovnih obdobjih, do 4 tedne.

Po 72 urah (Slika 11), so na gojiščih zrasle večinoma kolonije bakterij, saj bakterije rastejo hitreje kot glive. Gojišča kontrolnega mesta GJP-K po 72 urah niso izkazovala veliko rasti. Na gojišču R2A je bila rast minimalna, s prostim očesom je bilo vidno le par kolonij bakterij, gliv ni bilo veliko. Na gojišču HA, ki je bogatejša s hranili kot R2A, je bilo rasti več kot na R2A, a še vedno ne veliko. Na gojišču MEA+Ch rasti še ni bilo, saj je gojišče namenjeno rasti gliv, glive pa imajo daljšo inkubacijsko dobo. Na gojišču DRBC je bila vidna le ena kolonija, enako pri BHI, vendar z drugačno morfologijo. Gojišča prvega vzorčnega mesta (GJP-1) so izmed vseh vzorčnih mest izkazovala največ rasti. Na gojiščih R2A in MEA+Ch so zrastle bakterije in glive, na gojiščih HA in BHI pa večinoma bakterije. Rast na gojišču DRBC je bila slabša v primerjavi z ostalimi, najverjetneje zato ker vsebuje antibiotik kloramfenikol, protimikrobno barvilo bengal rožnato in blag fungicid dikloran, ki omejuje rast hitro rastočih gliv. Na gojiščih, kjer smo gojili mikroorganizme z brisa drugega vzorčnega mesta (GJP-2), smo po 72-ih urah opazili primerljivo rast gojiščem z vzorci kontrolnega mesta. Gojišče R2A ni izkazovalo rasti, na gojišču HA je zrastle ena kolonija bakterij in ena filamentozna gliva. Na gojišču MEA+Ch je zrastle par bakterijskih kolonij, na gojiščih DRBC in BHI pa na vsakem gojišču po ena gliva. Tudi gojišča nacepljena z vzorcem tretjega vzorčnega mesta (GJP-3) niso izkazovala ustreznih

pogojev za rast mikroorganizmov, saj je le na gojiščih R2A in HA zrastle po ena filamentozna gliva.



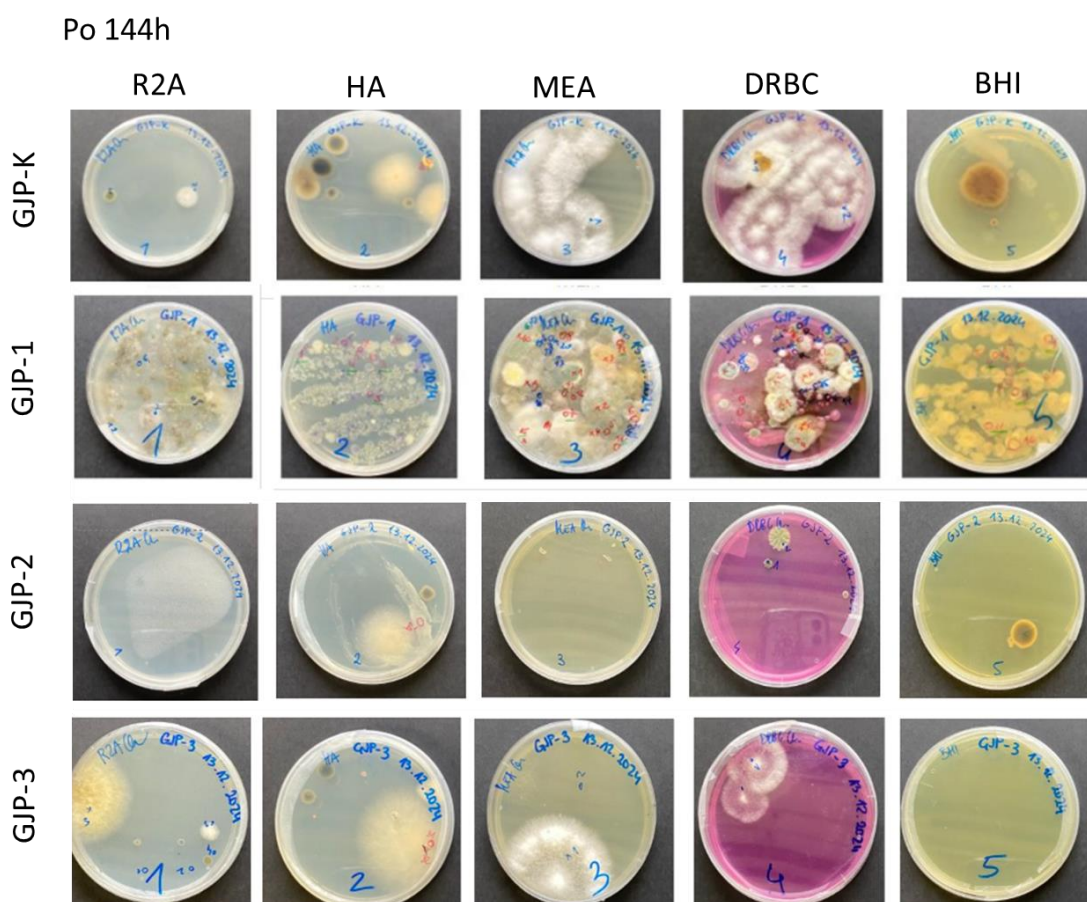
Slika 6: Gojišča R2A, HA, MEA + Ch, DRBC in BHI vseh vzorčnih mest po 72h.

Po 6-ih dneh (Slika 12), je bila rast na gojiščih precejšna. Poleg bakterij je zrastle tudi zelo veliko različnih kolonij gliv.

Gojišča kontrolnega mesta (GJP-K) so v primerjavi z drugimi vzorčnimi mesti izkazovala malo rasti. Gojišče R2A je izmed gojišč GJP-K izkazovalo najmanj rasti. Zrastli sta dve morfološko različni glivi. Na gojišču HA so zrastle trije tipi gliv in ena gladka, sluzasta, rumeno pigmentirana bakterija. Gojišče MEA+Ch je bilo preraščeno z belo filamentozno glivo, gojišče DRBC pa z glivo, ki je bila morfološko podobna glivi iz gojišča MEA+Ch. Na gojišču DRBC je zrastle tudi rumenkasto oranžna gliva, ki je rastle v globino. Na gojišču BHI je zrastle en tip glive ter več kolonij bakterij z enako morfološko obliko.

Gojišča prvega vzorčnega mesta (GJP-1) so izkazovala največ rasti izmed vseh vzorčnih mest. Na gojišču R2A so zrastle glive in bakterije, na gojišču HA pa so zrastle večinoma bakterije. Na gojišču sta razvidna dva različna tipa kolonij bakterij. Na gojišču MEA+Ch je bila rast najbolj bujna, na plošči je bilo več kot 20 različnih tipov gliv. Na gojišču DRBC je rast tudi zelo bujna, vendar malo manj kot na MEA. Poleg raznih gliv so zrastle tudi sluzaste bakterije, ki so najverjetneje odporne na gojišču dodan antibiotik kloramfenikol. Na gojišču BHI so zrastle izključno bakterije, pri čemer je opaziti približno pet različnih tipov. Večina bakterij na plošči BHI je bilo sluzastih. Gojišča drugega vzorčnega mesta (GJP-2) niso izkazovala velike rasti. Na gojišču R2A rasti ni bilo. Na gojišču HA sta zrastle dve koloniji gliv ter ena bakterijska kolonija. Na MEA sta zrastle dve bakterijski koloniji, gladkega tipa. Na DRBC gojišču je zrastle en tip gliv, enak kot na BHI.

Gojišča tretjega vzorčnega mesta (GJP-3) so izkazovala približno toliko rasti kot gojišča GJP-2. Na gojišču R2A so zrastle trije različni tipi, dva različna tipa gliv in tri bakterijske kolonije. Na gojišču MEA+Ch je rastle le ena bela filamentozna gliva. Na gojišču BHI rasti ni bilo.



Slika 7: Gojišča R2A, HA, MEA + Ch, DRBC in BHI vseh vzorčnih mest po 144h.

5.2 Izolirane vrste

Tabela št. 1 prikazuje števila izoliranih vrst z gojišč R2A, HA, MEA+Ch, DRBC in BHI, kjer so stolpci tabele razdeljeni po vzorčnih mestih (GJP-K, GJP-1, GJP-2, GJP-3), vrstice pa so razdeljene po vrsti gojišča ter tipu mikroorganizmov, ki smo jih proučevali. Tabela vsebuje podatke v obliki x/y, kjer x predstavlja skupno število zrastleh kolonij na določenem gojišču, y pa predstavlja število izoliranih in identificiranih različnih vrst.

Gojišča-organizmi	Vzorčna mesta (št. kolonij/št. poimenovanih vrst)			
	GJP-1	GJP-2	GJP-3	GJP-K
R2A-glive	9/5	6/1	6/1	2/2
R2A--bakterije	4/4	4/0	3/0	0/0
HA-glive	0/0	3/2	3/2	3/3
HA-bakterije	7/6	1/1	3/3	1/1
MEA+ Ch - glive	23/14	0/0	2/1	1/1
MEA +Ch--bakterije	15/0	2/2	1/0	0/0
DRBC-glive	18/12	2/2	0/0	2/2
DRBC-bakterije	0/0	0/0	0/0	0/0
BHI-glive	0/0	1/1	0/0	2/2
BHI-glive	0/0	1/1	0/0	2/2
Št. gliv na VSEH gojiščih	50/31	12/6	11/4	10/10
Št. bakterij na VSEH gojiščih	37/21	7/3	7/3	1/1
VSE glive in bakterije na VSEH gojiščih	87/52	19/9	18/7	11/11

Tabela 1: Prikaz števila kolonij in poimenovanih vrst mikroorganizmov iz izvornih gojišč R2A, HA, MEA, DRBC in BHI.

Iz vzorčnega mesta GJP-1 smo izolirali in identificirali skupno 52 izolatov, med katerimi smo identificirali 21 bakterijskih in 31 glivnih izolatov. Na vzorčnem mestu GJP-2 smo identificirali 9 izolatov, od tega 6 glivnih in 3 bakterijske. Vzorečenje na GJP-3 je privedlo do identifikacije 7 izolatov, med katerimi so 4 glivni in 3 bakterijski. Z vzorčnega mesta GJP-K smo izolirali in identificirali 11 izolatov, od katerih je 10 glivnih in 1 bakterijski.

Največ izolatov smo pridobili na GJP-1, ker je to vzorčno mesto imelo višjo vlažnost v primerjavi z drugimi vzorčnimi mesti, saj se je voda nanj stekala iz žleba. Vlažnost je ključni dejavnik za rast mikroorganizmov, saj zagotavlja eno od osnovnih potreb mikroorganizmov, potrebo po vodi. Mikroorganizmi, zlasti bakterije in glive, se pogosto razmnožujejo v vlažnem okolju, kjer so na voljo potrebni viri vode za njihove biološke procese. Višja vlažnost na GJP-1 je zato omogočila večjo raznolikost in gostoto mikroorganizmov, kar je privedlo do večjega števila izolatov v primerjavi z drugimi, bolj suhimi vzorčnimi mesti.

5.2.1 Izbrane izolirane vrste

Izbrali smo po 5 izolatov gliv in bakterij, ki so prikazani v spodnji tabeli. Prvi stolpec prikazuje oznako bakterij (B) v nadaljnjih poskusih, drugi izolacijsko številko izolata, tretji pa identifikacijo izolatov (Tabela 2).

B	Izolacijska oznaka	Identifikacija	EXB
B-1	GJP-1_BHI_8	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	6434
B-2	GJP-1_BHI_10A	<i>Bacillus tequilensis</i>	6436
B-3	GJP-1_BHI_11	<i>Bacillus pseudomycooides</i>	6438
B-4	GJP-1_HA_2A	<i>Chryseobacterium polytrichastri</i>	6440
B-5	GJP-1_HA_7	<i>Bacillus</i> spp. (<i>proteolyticus/wiedmannii/fungorum/sanguinis</i>)	6445

Tabela 2: Prikaz izbranih bakterijskih izolatov za nadaljnje poskuse.

Spodaj je prikazana tabela izbranih izolatov gliv. Prvi stolpec prikazuje izolacijsko številko, drugi pa identifikacijo (Tabela 3).

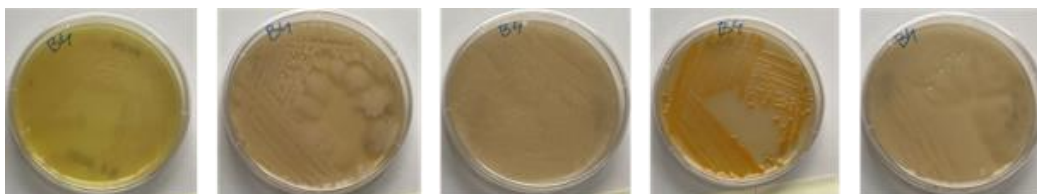
G-1	GJP_1_MEA_4	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	18765
G-2	GJP_1_DRBC_5	<i>Penicillium harmonense</i> (<i>chrysogenum</i>)	18780
G-3	GJP_1_DRBC_8	<i>Beauveria bassiana</i>	18783
G-4	GJP_1_DRBC_18	<i>Symmetrospora coprosmae</i>	18789
G-5	GJP_1_R2A_1	<i>Sordaria fimicola</i>	18790

Tabela 3: Prikaz izbranih glivnih izolatov za nadaljnje poskuse.

Od tukaj dalje bomo za poimenovanje izolatov bakterij uporabljali B- oznake, za poimenovanje gliv pa G- oznake, kot navedeno v tabelah 2 in 3.

5.2.1.1 Predstavitev izbranih bakterijskih izolatov

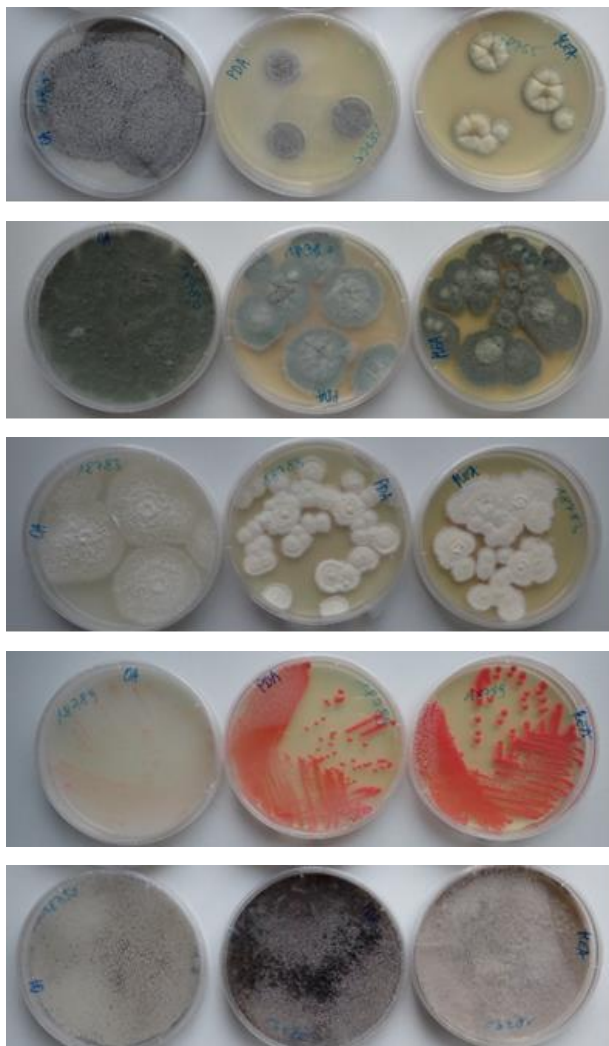
Pet bakterijskih izolatov smo izbrali predvsem na podlagi podobnosti v rasti njihovih kolonij (B-2, B-3 in B-5), druge pa zaradi obarvanosti (B-1 in B-4) (Slika 13).



Slika 8: Izbrani bakterijski izolati za nadaljnje poskuse: *Pseudomonas rhodesiae* (B-1), *Bacillus tequilensis* (B-2), *Bacillus pseudomycooides* (B-3), *Chryseobacterium polytrichastri* (B-4), *Bacillus* spp. (*proteolyticus/wiedmannii/fungorum/sanguinis*) (B-5).

5.2.1.2 Predstavitev izbranih glivnih izolatov

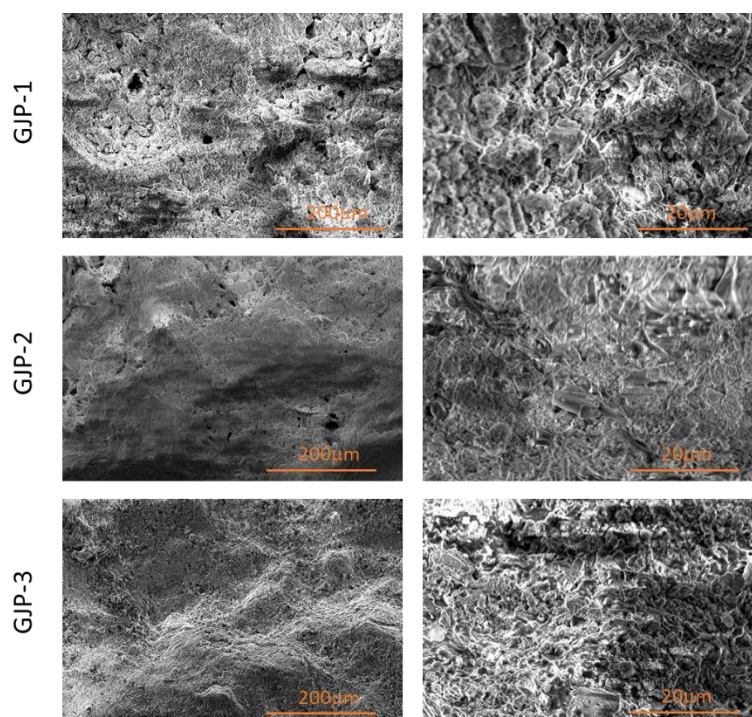
Med glivami smo pet izolatov izbrali, slika 14, na podlagi temne pigmentacije rodu *Cladosporium* (G-1), rdeče pigmentacije kvasovke rodu *Symmetrospora* G-4, nepigmentacije glive rodu *Beauveria* (G-2), splošne sposobnosti gliv rodu *Penicillium* po sposobnosti tvorbe kislin (izolat G-2), glivo rodu *Sordaria* pa smo izbrali zaradi tvorbe spolnih plodišč (G-5).



Slika 9: Izbrani izolati gliv: *Cladosporium pseudocladosporioides* (G-1), *Penicillium harmonense* (*chrysogenum*) (G-2), *Beauveria bassiana* (G-3), *Symmetrospora coprosmae* (G-4), *Sordaria fimicola* (G-5).

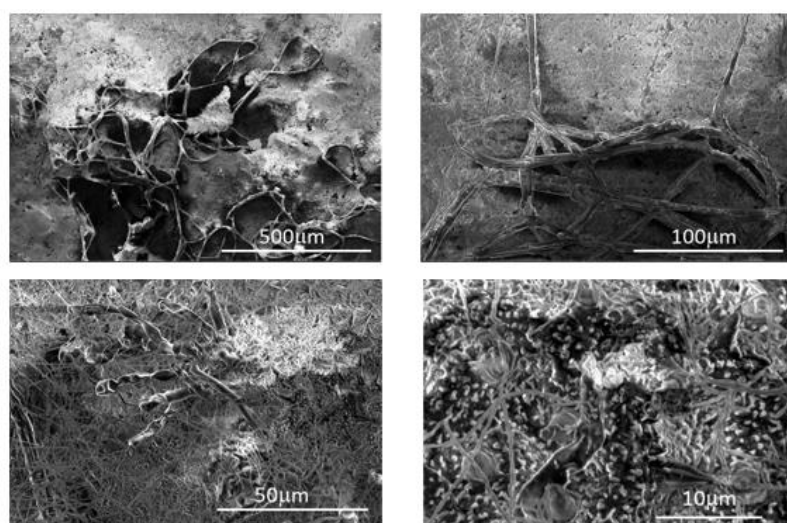
5.3 Analiza površine okruškov betona z vrstično elektronsko mikroskopijo in mikroanalizo elementov

Površina betonskih okruškov je že s prostim očesom in na dotik delovala hrapavo, kar potrjujejo tudi SEM posnetki. Ti so bili posneti pri 200× povečavi (Slika 5, levi stolpec) ter pri 2000× povečavi (Slika 5, desni stolpec). Pri 200× povečavi vzorca GJP-1 in GJP-2 kažeta izrazitejšo hrapavost, medtem ko ima vzorec GJP-K bolj valovito površino. Pri 2000× povečavi je še bolj razločno vidno, da imajo vsi vzorci izrazito mikro- in nanostrukturo, kar kaže na kompleksno topografijo betonske površine.



Slika 10: Betonski okruški narejeni z vrstičnim elektronskim mikroskopom pri 200x (levo) in 2000x povečavi (desno).

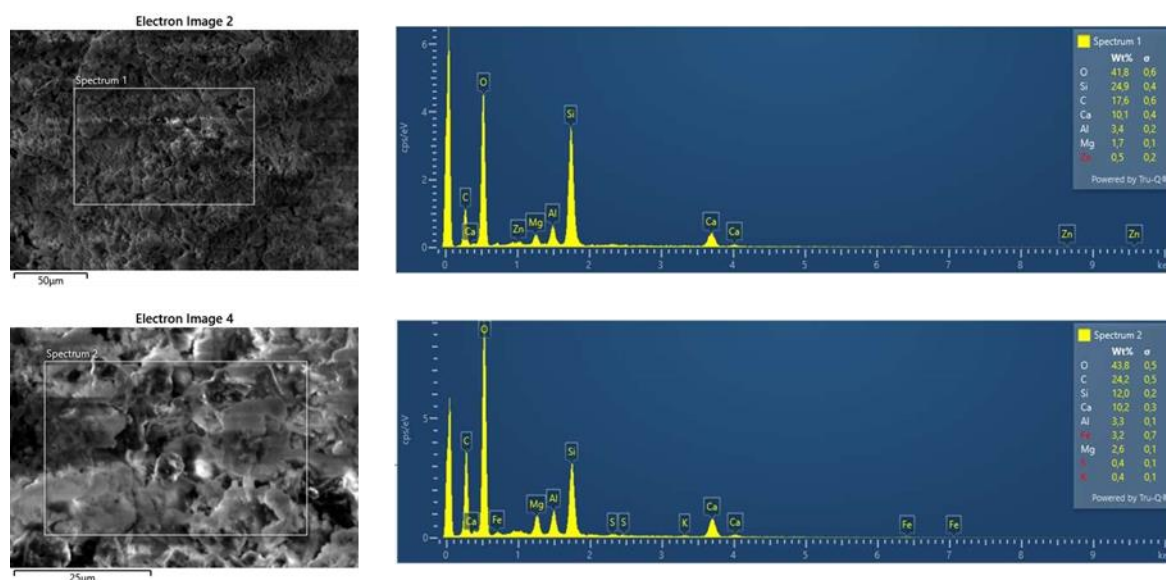
Na površini okruška GJP-2 so prisotne različne strukture, ki bi lahko predstavljale biološke ostanke. Na sliki 6, zgornja dva posnetka prikazujeta strukture vijugastih oblik, ki bi bile lahko različna vlakna ali glivne hife. Na spodnjih dveh posnetkih slike 6 ponovno opazimo vijugaste strukture ter kroglice z bodicami. Vijugaste strukture bi lahko predstavljale prav tako vlakna ali glivne hife, kroglice z bodicami pa bi lahko bile delci cvetnega prahu. Da bi lahko z gotovostjo potrdili, ali gre res za biološke ostanke in katere, bi bilo potrebno opraviti dodatne analize.



Slika 11: Različne strukture na površini betonskih okruškov.

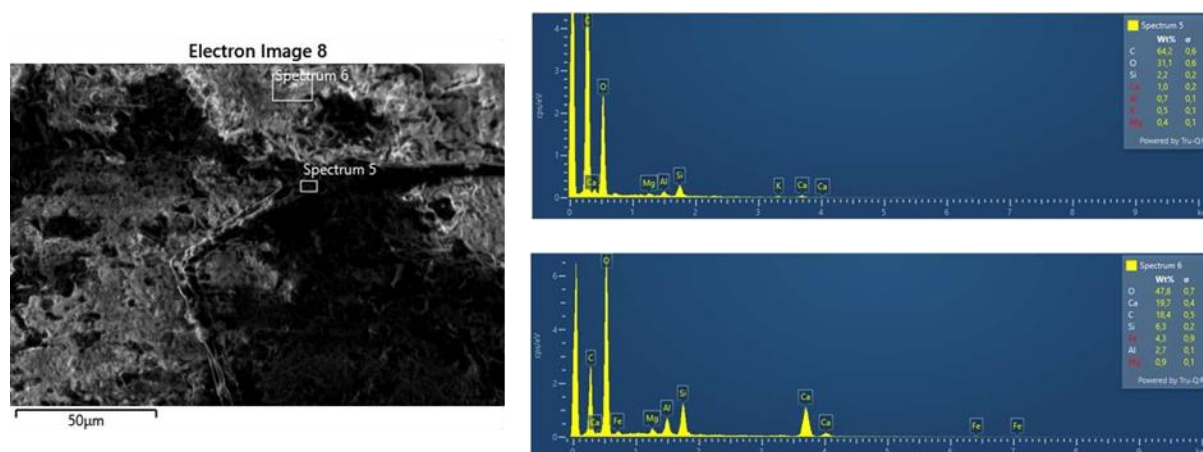
Naredili smo tudi EDS analizo betonskih okroškov. Graf EDS analize ima na X osi označene energijske vrednosti v keV (kiloelektronvoltih). Na Y pa je število zaznanih rentgenskih fotonov pri določeni energiji. Vsak prikazan element ima značilne emisijske črte (npr. $K\alpha$, $K\beta$, $L\alpha$, $M\alpha$), ki so vidne kot vrhovi (peaks) na spektru. Višji vrh pomeni večjo koncentracijo določenega elementa v analiziranem območju.

Na vzorčnem mestu GJP-1 smo zaznali višjo prisotnost kisika in silicija. V drugem spektru smo opazili povečano koncentracijo ogljika. Oba spektra pokazeta tudi prisotnost kalcija, magnezija in aluminija. Na prvem spektru smo zaznali tudi cink. Na drugem spektru pa so bili prisotni žveplo, kalij in železo (Slika 7).



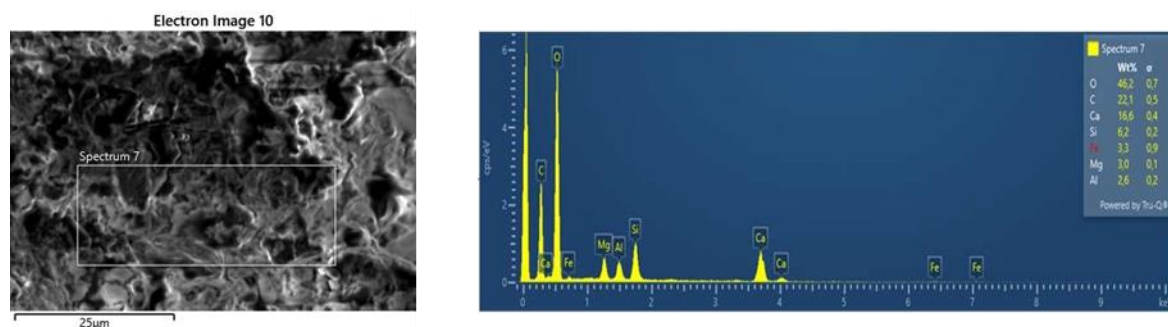
Slika 12: EDS analiza betonskih okroškov na vzorčnem mestu GJP-1.

Na vzorčnem mestu GJP- 2 so se pojavili podobni elementi, kot pri vzorčnem mestu GJP-1. V večji količini se pojavljata ogljik in kisik, v manjši pa kalcij, silicij, magnezij in aluminij. Na spektru 2 zaznamo tudi manjšo prisotnost železa (Slika 8).



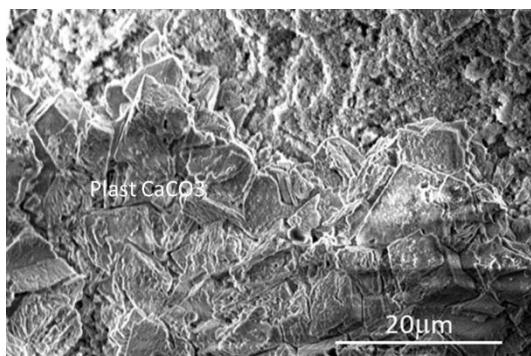
Slika 13: EDS analiza betonskih okruškov na vzorčnem mestu GJP-2.

Na vzorčnem mestu GJP-K se ponovno pojavijo ogljik, kisik, silicij, kalcij, magnezij, aluminij in železo (Slika 9).



Slika 14: EDS analiza betonskih okruškov na kontrolnem mestu GJP-K.

Prisotnost ogljika lahko izhaja iz mikroorganizmov in biofilmov, ki vsebujejo organske spojine. Možen vir ogljika so tudi onesnaženja, kot so olja, prah in drugi delci iz okolja, ki vsebujejo ogljikove spojine. Kisik pa je lahko prisoten tudi zaradi hidratiranih spojin v betonu, kot je kalcijev silikat hidrat (C-S-H), ki vključuje kisik kot del svoje strukture. Eden izmed razlogov je lahko tudi biomineralizacija, pri kateri mikroorganizmi prispevajo k tvorbi kalcijevega karbonata (CaCO_3) ali pa karbonatizacija, kjer CO_2 iz zraka reagira s kalcijevim hidroksidom ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) v betonu, kar lahko prav tako vodi v nastanek CaCO_3 . Ta dva procesa lahko tudi potrdira prisotnost kalcija. Na sliki 10 vidimo prisotnost kristalnih struktur. Kristalne strukture bi lahko predstavljale CaCO_3 plast, saj iz EDS razberemo tako prisotnost kalcija, kot ogljika in kisika.



Slika 15: Prisotnost CaCO₃ plasti na betonskem okrušku GJP-1.

Prisotnost žvepla bi lahko bila posledica delovanja žveplovih bakterij v anaerobnih procesih ali pa je betonski okrušek bil izpostavljen žveplovim spojinam iz okolja, kot so onesnaževala v zraku, industrijski izpusti ali padavine, ki vsebujejo žveplove spojine (npr. žveplovo kislino ali sulfide). Kalij lahko izhaja iz biogeničnih procesov, v katerih mikroorganizmi razgrajujejo organske snovi in sproščajo minerale. Aluminijski, magnezij, kalij, silicij so na EDS analizi prisotni, saj te elemente najdemo v sami sestavi betona. Silicij je lahko prisoten tudi zaradi onesnaženja. Železo se je lahko pojavilo kot nečistoča ali kot sestavni del mineralov, kot je rjavi železov oksid (Fe₂O₃), ki cementu daje barvo. Cink običajno ni sestavni del betona, lahko pa izvira iz cinkovih prevlek v okolici ali iz onesnaženja.

5.4 Testiranje lastnosti izbranih izoliranih vrst

Kontrolna gojišča so po inkubaciji ostala čista. Na sliki 16 je razvidno, da na gojiščih ni mikroorganizmov, kar pomeni, da postopek priprave gojišč, sterilizacije in rokovanja z vzorci ni povzročil kontaminacije. To potrjuje, da so vsi opaženi mikroorganizmi na eksperimentalnih gojiščih dejansko izhajali iz vzorcev in niso posledica nenadzorovanega vnosa iz okolja na gojišča.



Slika 16: Kontrolna gojišča po inkubaciji za testiranje lastnosti mikroorganizmov.

Sev	Vpliv na pH	B4			CaCO ₃ in glukoza				PDA z virom Ca ²⁺	
		rast	agregacija CaCO ₃	pigmentacija	rast	zbistritev	rast v globino	Sprememba pH	rast	nastali kristali
Bakterije										
B-1	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
B-2	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
B-3	-	+	-	-	-	-	-	-	-	?
B-4	-	+	?	+	-	-	-	-	+	-
B-5	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Glive										
G-1	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+
G-2	-	+	?	+	-/+	+	-	+	+	?
G-3	-	+	+	-	-/+	-	-	-	+	+
G-4	-	+	-	+	-/+	-	-	-	+	+
G-5	-	+	?	-	-	-	-	-	+	+

Tabela 4: Lastnosti, ki lahko negativno (znižanje pH, luženje mineralov iz kamnin- agregacija CaCO₃ na B4) in pozitivno (tvorba mineralov na PDA) vplivajo na beton.

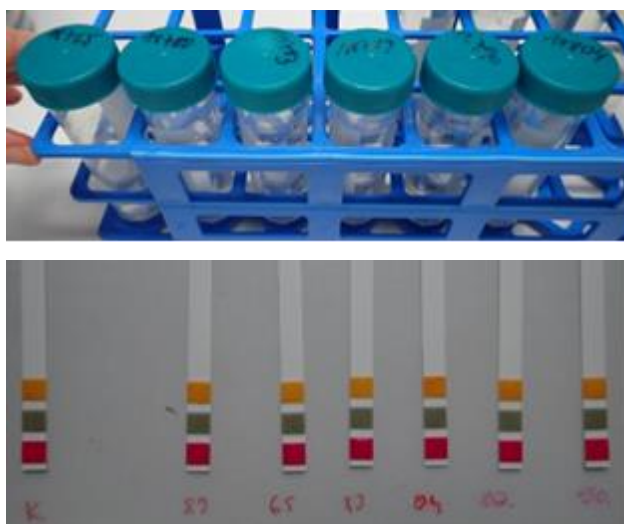
V tabeli znak + pomeni, da so izolati to lastnost izkazovali znak – pa, da niso. Znak ? pomeni, da so bile plošče kontaminirane in bi poskus bilo potrebno ponoviti.

5.4.1 Rast mikroorganizmov

Vsi izolati so rastle v tekočem gojišču in na gojišču B4. Na gojišču PDA z virom kalcija so bakterije in glive izkazovale malo slabšo rast v primerjavi z rastjo na gojišču B4, medtem ko je bila rast na gojišču s CaCO₃ in glukozo zelo slaba. Predvsem bakterijski izolati so na tem gojišču slabo rastle, saj gojišču primanjkuje vir dušika ter esencialnih snovi, ki jih bakterije potrebujejo. Rast bakterijskih izolatov na gojišču s CaCO₃ in glukozo je bila omejena na površino gojišča, noben izolat ni kazal rasti v globino, kar nakazuje na njihove prilagoditve na površinsko rast. Dobro rast glivnih izolatov, na tem gojišču, smo zasledili le pri izolatu G-1, ki je rastle tudi v globino, medtem ko so drugi izolati rastle počasi in le na površini (G-2, G-3 in G-4), ali pa sploh ne (G-5).

5.4.2 Test spremljanja sprememb pH med rastjo v tekočem gojišču

PH tekočih gojišč smo preverili s pH lističi s širšim razponom, primernim za testiranje prisotnosti kislin, od pH 2,0 do 7,0. V vseh tekočih gojiščih glivnih in bakterijskih izolatov smo s pH lističi izmerili pH 6,5, kot tudi v kontrolnem gojišču brez inokuliranega mikroorganizma (Slika 16). Kar dokazuje, da izbrani izolati ne tvorijo močnih kislin.



Slika 17: Testiranje glivnih izolatov na sproščanje kislin v gojišču s peptonom, ki je poznan po pufrskih lastnostih.

5.4.3 Test tvorjenja šibkih kislin (raztapljanje CaCO_3)

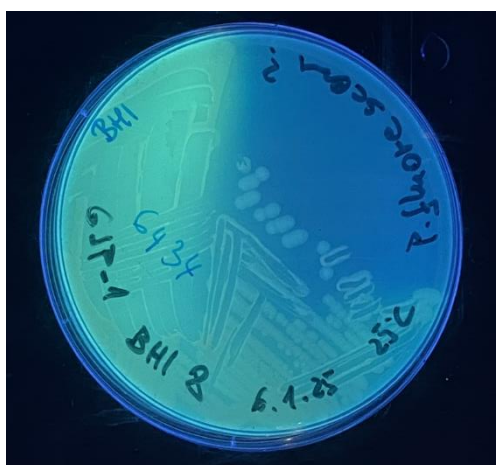
Na gojišču s CaCO_3 in dodano glukozo smo preverjali, ali izolati proizvajajo šibke kisline, ki bi lahko povzročile raztapljanje CaCO_3 . Na nobenem bakterijskem vzorcu nismo opazili cone zbistritve okoli kolonij, kar pomeni, da noben izmed izoliranih sevov ne tvori šibkih kislin in ne raztaplja kalcijevega karbonata (CaCO_3). To nakazuje, da testirani mikroorganizmi ne proizvajajo kislin ali drugih spojin, ki bi lahko učinkovito razgradile CaCO_3 , kar bi bilo sicer značilno za nekatere bakterije, vključene v procese razgradnje betona. V primerjavi z bakterijskimi izolati je izolat G-2 pokazal sposobnost raztapljanja CaCO_3 , kar je bilo razvidno iz cone zbistritve na sredini gojišča. To pomeni, da je izolat sposoben proizvajati kisline ki razgrajujejo kalcijev karbonat, kar bi lahko prispevalo k procesu biomineralizacije ali raztapljanja mineralnih komponent v betonu (Slika 17).



Slika 18: Kultura izolata G-2 na agarnem gojišču s CaCO_3 , glukozo in pH indikatorjem bromkrezol vijolično. Barva indikatorja je na območju spremenjene pH vrednosti rumena, pod kolonijami pa gojišče ni več motno zaradi raztapljanja CaCO_3 .

5.4.4 Tvorjenje pigmentov

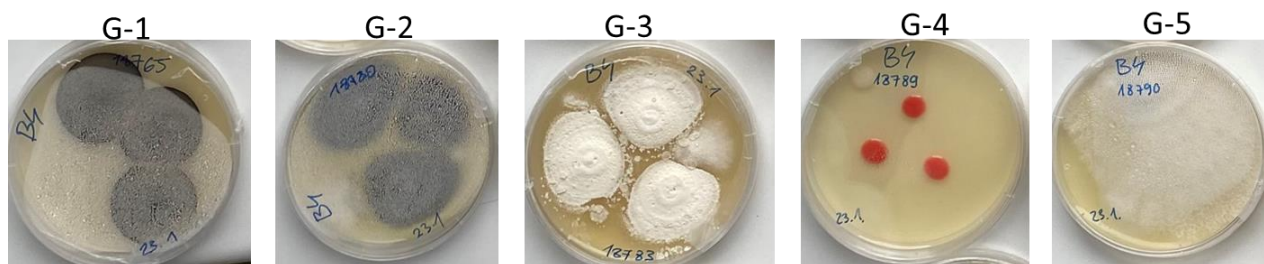
Pri bakterijskih izolatih B-1 in B-4 smo opazili, da njune kolonije tvorijo pigmente. Izolat B-1 izraža intenzivno rumeno fluorescenco (pigment pioverdin), njegove kolonije in tudi okolica kolonij (celotno gojišče) je obarvano fluorescentno rumeno in fluorescira pod UV svetlobo (Slika 18).



Slika 19: Izolat B-1 pod UV svetlobo.

Medtem ko izolat B-4 tvori izrazito oranžne kolonije, je za rod *Chryseobacterium* značilen fleksirubin. Pigmenti imajo pomembno zaščitno funkcijo, saj bakterije ščitijo pred škodljivim UV-sevanjem, prav tako pa npr. pioverdin deluje tudi kot siderofor, pomemben za privzem železa(III) in je zato učinkovit transporter železa(III) (Mayer, 2000). Obe lastnosti sta pomembni za preživetje mikroorganizmov na površini betona, kjer so izpostavljeni visokim ravnem sončnega sevanja, ki bi lahko povzročilo oksidativni stres in poškodbe celičnih struktur. Prav tako pa je železo pomemben mikroelement, ki ga v okolju primanjkuje v obliki, ki ga lahko bakterije privzemajo.

Tudi pri glivnih izolatih opažamo tvorbo pigmentov pri treh izmed petih testiranih sevov. Izolata filamentoznih gliv G-1 in G-2 imata temno zelene kolonije, medtem ko je kvasovka G-4 rdeče pigmentirana. Temno zeleno barvilo je melanin, medtem ko so rdeče kvasovke poznane po tvorbi karotenoidov. Oba tipa pigmentov imata zaščitno funkcijo pred UV-sevanjem (Slika 19).

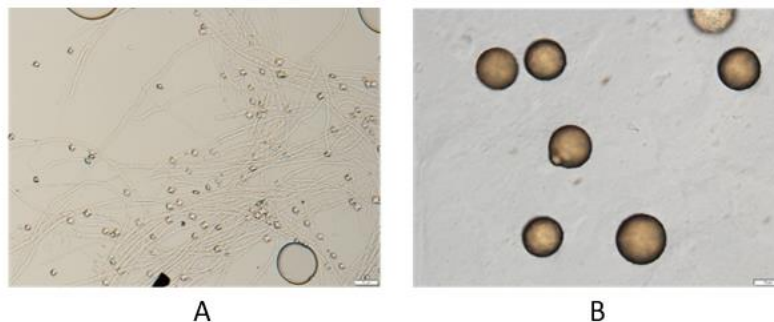


Slika 20:: Preverjanje ali glivni izolati tvorijo pigmente.

5.4.5 Testiranje tvorbe mineralov na gojišču PDA z virom kalcija

S pomočjo stereomikroskopa in svetlobnega mikroskopa smo pri izolatih preverjali prisotnost kristalov. Tvorbo mineralov smo opazili pri bakterijskem izolatu B-1, ki so nastali v večji količini na enem predelu in spadajo med kockaste kristale, ki se združujejo v skupke velikosti približno 50 μm , posamezni kristali pa dosežejo velikost do 5 μm . Pri bakterijskem izolatu B-2 smo opazili tvorbo kristalov nepravilne oblike, kristali so se pojavili med kolonijami in bili večji od 50 μm . Bakterijski izolat B-3 je bil kontaminiran, zato ni mogoče zanesljivo oceniti njegove sposobnosti tvorjenja mineralov. Izolata B-4 in B-5 nista tvorila mineralov.

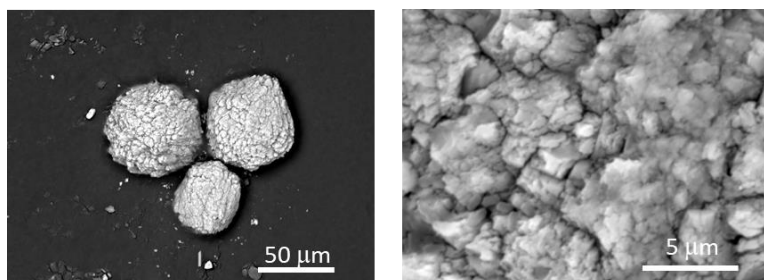
Vsi glivni izolati so tvorili minerale. Izolat G-2 je kristale tvoril med hifami ter v manjši količini tudi po celi površini gojišča. Vendar je bilo gojišče kontaminirano, zato ni nujno, da je prav ta izolat tvoril kristale.



Slika 21: Primerjava piramidalnih kristalov – izolat G-3 (A) in okroglih kristalov – izolat G-1 (B)

5.4.6 Testiranje agregacije na gojišču B4

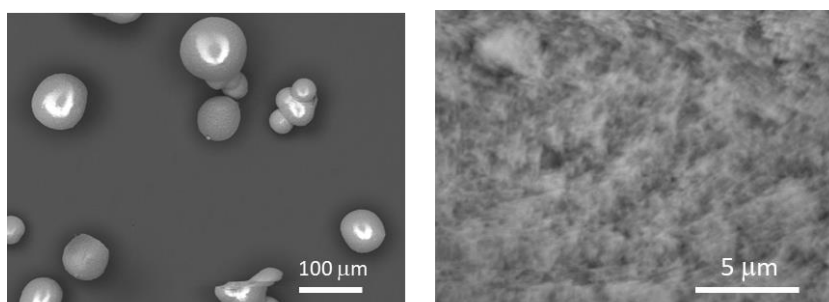
Agregacijo CaCO_3 smo opazili pri izolatih B-1, B-2, G-3 in G-5. Plošča izolata G-5 je okužena, zato ne moremo zagotavljati, da agregira CaCO_3 . Kristale, ki so bili prisotni ob robu gojišča, smo izolirali po ustaljenem protokolu ter jih analizirali s SEM-posnetki.



Slika 22: Kristali bakterijskega izolata B-2

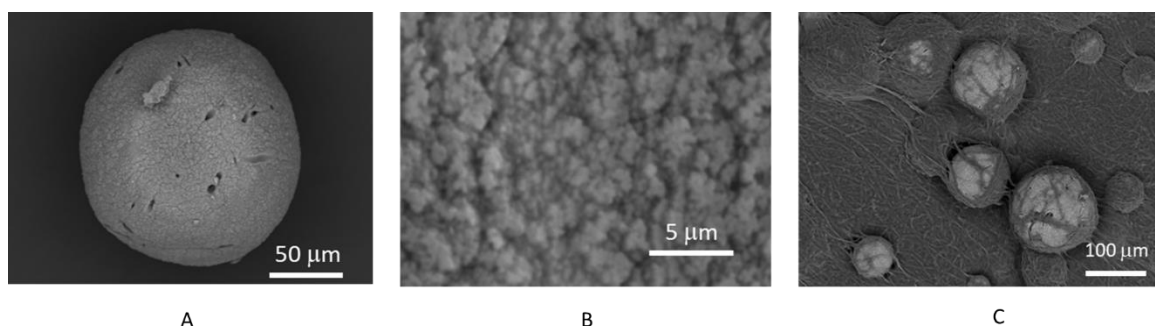
Slika 24 (leva), posneta pri 500x povečavi, prikazuje, da imajo kristali okroglo obliko. Na sliki 24 (desna), posneta pri 5000x povečavi, je razvidno, da površina kristalov ni gladka, temveč mikro - in nanostrukturalna. Izmerjena velikost kristalov se giblje okoli 50 µm. Na podlagi teh

značilnosti je najverjetneje, da gre za vaterit (CaCO_3) ali amorfni kalcijev karbonat, ki sta pogosti obliki biomineralov.



Slika 23: Kristali glivnega izolata G-3

Na sliki 25 (levo) je prikazan posnetek kristalov izolata G-3, narejen pri 200x povečavi. Iz slike je razvidno, da imajo kristali okroglo obliko in velikost med 50 μm in 100 μm . Na desni strani slike 25 je prikazan pogled na površino kristalov, posnet pri 5000x povečavi, iz katerega je razvidno, da je ta pretežno gladka, vendar še vedno vsebuje drobne mikrometrске in nanometrске strukture. Glede na opisano morfologijo kristalov, kot so okrogla oblika, velikost in mikro- ter nanostrukturne površinske značilnosti, bi lahko šlo za vaterit ali kalcit, polimorfni obliki CaCO_3 .

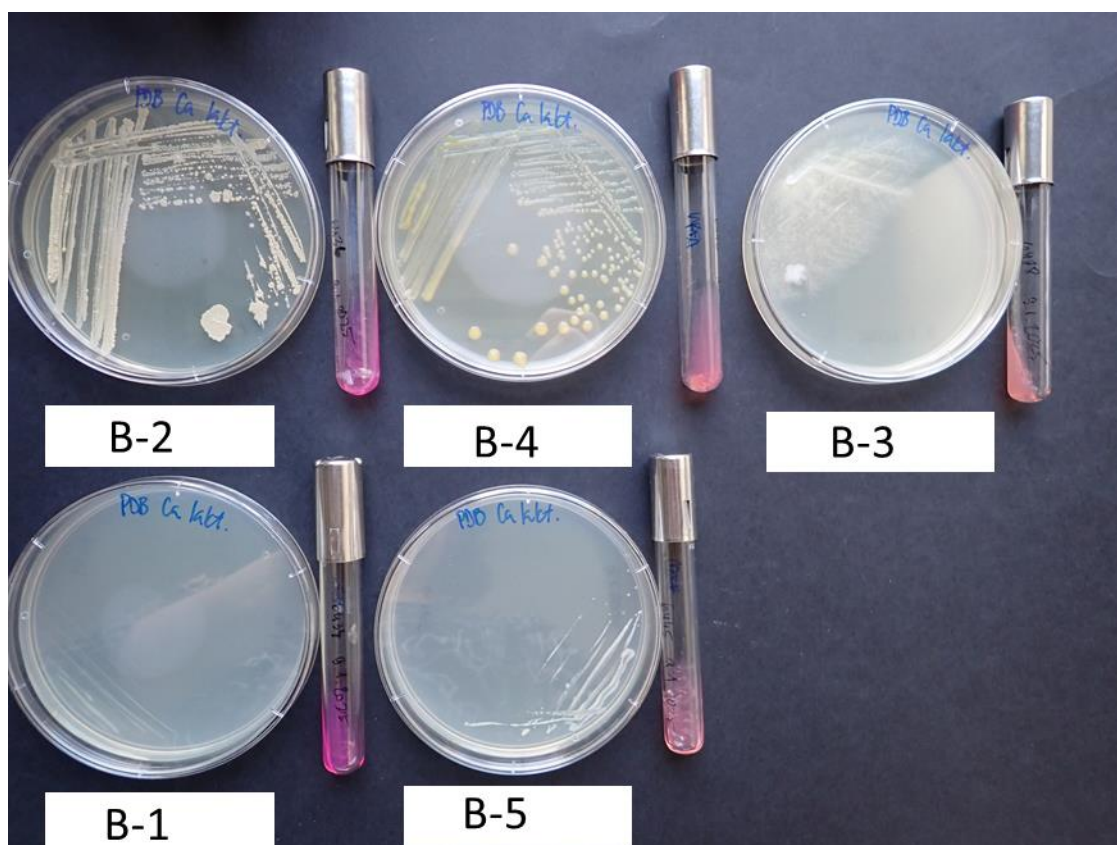


Slika 24: Kristal izolata G-5, pri različnih povečavah.

Slika 26 (A) prikazuje izoliran kristal izolata G-5 pri 500x povečavi. Kristal ima okroglo obliko in velikost približno 100 μm . Na sliki 26 (B), posnete pri 5000x povečavi, je prikazana površina kristala, iz katere je razvidno, da ima mikro- in nanostrukture. Slika 26 (C) prikazuje kristale med glivnimi hifami. Na podlagi opisa morfologije kristalov (okrogla oblika, mikro- in nanostrukture) je najverjetneje, da gre za kalcit (CaCO_3), ki pogosto nastaja v okoljih, bogatih s kalcijem. Kalcit ima značilno okroglo obliko in lahko razvije mikro- in nanostrukturne površine, kar je v skladu z opisanimi lastnostmi kristalov.

5.4.7 Ureazni test

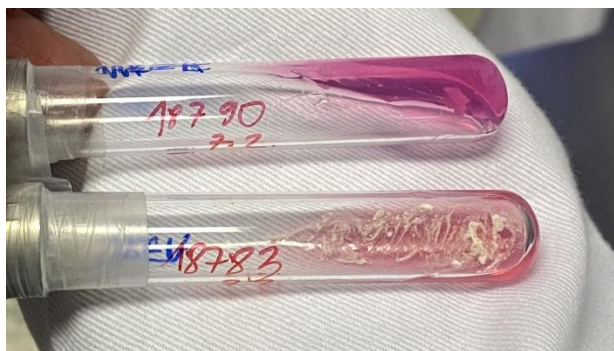
Ureazno pozitivna bakterijska izolata sta bila B-1 in B-2, saj sta se poševni gojišči obarvali rožnato, kar je dokaz, da razgrajujeta ureo z encimom ureazo. Poševna gojišča bakterijski izolatov B-3, B-4 in B-5 se niso obarvala rožnato, temveč so gojišča ostala oranžna, kar pomeni, da uree ne razgrajujejo (Slika 20).



Slika 25: Ureazni testi bakterijskih izolatov (na epruvetah) in rast izolatov na gojišču PDA z virom kalcija na agarnih ploščah.

Vsi glivni izbrani izolati so bili ureazno pozitivni. Na sliki 21 se vidi razliko med ureaznim pozitivnim poševnim gojiščem in ureazno negativnim poševnim gojiščem. Z daljšo inkubacijo

smo tudi pri glivi G-3, ki je sprva kazala negativen rezultat, ugotovili spremembo barve gojišča in prisotnost encima. ž



Slika 26: Ureazni test glivnih izolatov G-5 (ureazno pozitiven) in G-3 (ureazno negativen).

6 RAZPRAVA

6.1 Rast mikroorganizmov na betonu

Po 6-dnevni inkubaciji so gojišča vzorca GJP-1 pokazala večjo mikrobno rast v primerjavi z gojišči z drugih vzorčnih mest. Iz teh gojišč smo izolirali tudi več različnih vrst mikroorganizmov, kar dokazuje višjo biodiverzitetu na tem območju. Večja diverzitetu in intenzivnejša rast kažeta na ugodnejše pogoje za preživetje mikroorganizmov, kar je verjetno posledica večje vlažnosti na lokaciji GJP-1 v primerjavi z drugimi vzorčnimi mesti.

S tem potrdimo hipotezo, da bosta mikrobna raznolikost in številčnost večji na bolj vlažnih predelih betona v primerjavi s suhimi.

Rezultati identifikacije mikroorganizmov kažejo, da so bili na betonskih površinah prisotni organizmi, katerih vrste so bile v literaturi že določene, kar je skladno z našo hipotezo. Med izoliranimi mikroorganizmi smo identificirali vrste, prilagojene ekstremnim razmeram, kot sta *Psychrobacter frigidicola* in *Flavobacterium frigidimaris*, ki uspevata pri nizkih temperaturah. Poleg tega smo odkrili več predstavnikov rodu *Bacillus* (*B. tequilensis*, *B. pseudomycooides*, *B. proteolyticus*), znanih po odpornosti na sušo in visoke vrednosti pH, kar jim omogoča preživetje v bazičnem okolju betona. Prav tako smo identificirali bakteriji *Staphylococcus equorum* in *Micrococcus yunnanensis*, ki sta odporni na sušne in slane pogoje, kar dodatno podpira domnevo, da se določeni mikroorganizmi na betonu pogosteje pojavljajo zaradi prilagodljivosti na specifične okolijske razmere.

Naši rezultati delno potrjujejo hipotezo, da beton naseljujejo mikroorganizmi, prilagojeni ekstremnim pogojem, vendar bi za njeno dokončno potrditev potrebovali primerjalno analizo z mikrobiomi drugih površin.

6.2 Biološki ostanki in kalcijev karbonat na betonskih okruških

Z uporabo vrstične elektronske mikroskopije (SEM) smo analizirali površino betonskih okruškov in ugotovili, da je njihova tekstura hrapava. Na površini so bili prisotni biološki ostanki, katerih natančna sestava zahteva dodatne analize za določitev njihove narave in izvora. Prav tako smo zaznali nanose kalcijevega karbonata (CaCO_3), pri čemer je bila njegova količina najvišja na vzorcu GJP-1. Ta vzorec je hkrati izkazoval največjo biodiverzitetu in

najvišjo koncentracijo mikroorganizmov, kar bi lahko nakazovalo, da je prisotnost CaCO_3 posledica delovanja mikroorganizmov.

S tem potrdimo hipotezo, da bodo na površini betonskih okruškov prisotni biološki ostanki ter nanosi kalcijevega karbonata, ki so lahko posledica metabolnega delovanja mikroorganizmov kot tudi in delovanja okolja.

6.3 Lastnosti mikroorganizmov, ki vplivajo na ohranjanje in videz betona

Rezultati opravljenih testov lastnosti mikroorganizmov so pokazali, da imajo lahko izolirani mikroorganizmi tako pozitivne kot negativne učinke na beton.

PH tekočih gojišč z izolati izkazuje enako vrednost kot kontrolno pH gojišče, kar pomeni, da noben izolat ne tvori močnih kislin. Prav tako na gojišču z dodanim CaCO_3 in glukozo, pri bakterijskih izolatih nismo opazili cone zbistritve, kar nakazuje, da ti izolati ne raztapljajo CaCO_3 , posledično tudi ne tvorijo šibkih kislin. Nasprotno pa je glivni izolat G-2 rodu *Penicillium* tvori šibke kisline. Razen glivnega izolata G-2, noben izolat ne tvori kislin, posledično ne pripomore k deterioraciji betona.

Na gojišču B4 smo preverjali sposobnost mikroorganizmov za tvorbo pigmentov. Ugotovili smo, da dva izmed petih izbranih bakterijskih izolatov ter trije od petih glivnih izolatov tvorijo pigmente. Bakterijski izolat B-1 izraža intenzivno rumeno fluorescenco zaradi pigmenta pioverdina. Bakterijski izolat B-4 vsebuje pigment fleksirubim, zato izkazuje intenzivne oranžne kolonije. Glivni izolat G-4 vsebuje pigmente, imenovane karotenoidove, posledično so se njegove kolonije obarvale rožnato. Glivna izolata G-2 in G-5 tvorita temnejše, sivo-zelene pigmente, zaradi prisotnosti pigmenta melanina. Pigmenti mikroorganizmom nudijo možnost za preživetje pri ekstremnejših pogojih, kot je na betonu, vendar prisotnost teh pigmentov povzroči pojav barvnih lis na betonu, kar vpliva na njegov estetski videz.

Sposobnost biomineralizacije izkazuje izolata B-1 in B-2, ter vsi glivni izolati. Te pripomorejo k samoceljenju betona, saj se ti minerali nalagajo v razpoke betona in s tem omogočijo betonu, da bi bila struktura odporna na vodo in bolj trajnostna. Agregacijo CaCO_3 smo opazili pri izolatih B-1, B-2, G-3 in G-5. Plošča izolata G-5 je okužena, zato ne moremo zagotavljati, da agragira CaCO_3 .

Bakterijska izolata B-1 in B-2 ter vsi glivni izolati so ureazno pozitivni, kar pomeni, da vsebujejo encim ureazo. To pomeni, da lahko ti izolati s procesom ureolize inducirajo tvorbo mineralov.

S tem potrjujemo hipotezo, da bomo našli za beton nevarne in tudi koristne mikroorganizme.

7 ZAKLJUČEK

Raziskava je pokazala, da mikroorganizmi igrajo pomembno vlogo pri obstoju betonske ograje terase Gimnazije Jožeta Plečnika. Rast ter biodiverziteta mikroorganizmov na betonu sta bili večji na vlažnejših območjih, kar nakazuje, da vlaga pomembno vpliva na mikrobnost aktivnost. Na betonskih okruških smo opazili prisotnost bioloških ostankov kot so hife ter nanose CaCO_3 . Največ nanosov CaCO_3 je bilo prisotnih na bolj vlažnem vzorčnem mestu, kar pomeni, da je prisotnost CaCO_3 tudi posledica metabolnega delovanja mikroorganizmov, ki so tam prisotni. Med izoliranimi mikroorganizmi smo identificirali tako vrste, ki imajo potencialno škodljive učinke na beton (npr. tvorba šibkih kislin in pigmentov, agregacija CaCO_3 ...), kot tudi tiste, ki prispevajo k samoobnavljanju betona (npr. sposobnost biomineraliziranja). Ti rezultati lahko prispevajo k razvoju smernic za zaščito in obnovo betonskih struktur, kar je še posebej pomembno za ohranjanje Plečnikove in druge betonske kulturne dediščine. Hkrati podpirajo tudi koncept biomineralizacije in razvoja samoobnovljivih betonskih materialov, kar odpira nove možnosti za trajnostne pristope v gradbeništvu.

Za nadaljnje raziskave bi bilo smiselno preučiti dejavnike, ki vplivajo na tvorbo CaCO_3 , kot so sestava hranilnih medijev, temperatura in vlažnost, da bi izboljšali učinkovitost biomineralizacije v betonu. Prav tako bi bilo koristno oceniti dolgoročne učinke mikrobne biomineralizacije na mehanske lastnosti in obstojnost betona v različnih okolijskih razmerah. Poleg tega bi bilo pomembno raziskati, ali lahko mikroorganizmi učinkovito zapolnijo razpoke in tako s tem podaljšajo življenjsko dobo betonskih konstrukcij. Nenazadnje bi bilo vredno razviti in preizkusiti metode za uporabo biomineralizacije pri sanaciji zgodovinskih betonskih objektov, vključno s Plečnikovo arhitekturo.

8 LITERATURA

Agarwal, H., Bajpai, S., Mishra, A., Kohli, I., Varma, A., Fouillaud, M., Dufossé, L., & Joshi, N. C. (2023). Bacterial pigments and their multifaceted roles in contemporary biotechnology and pharmacological applications. *Microorganisms*, *11*(3), Article 614. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030614>

Albertano, P., & Urzi, C. (1999). Structural interactions among epilithic cyanobacteria and heterotrophic microorganisms in Roman hypogea. *Microbial Ecology*, *38*(3), 244–252. <https://doi.org/10.1007/s002489900170>

Bone, J. R., Stafford, R., Hall, A. E., & Herbert, R. J. H. (2022). Biodeterioration and bioprotection of concrete assets in the coastal environment. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *175*, Article 105507. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2022.105507>

Boskey, A. L. (2003). Biomineralization: An overview. *Connective Tissue Research*, *44*(1), 5–9. <https://doi.org/10.1080/03008200390152007>

Buh, T. (2019). *Samopopravljivi betoni* [Diplomsko delo]. Repozitorij Univerze v Ljubljani. <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?lang=slv&id=109457>

Castro-Alonso, M. J., Montañez-Hernandez, L. E., Sanchez-Muñoz, M. A., Macias Franco, M. R., Narayanasamy, R., & Balagurusamy, N. (2019). Microbially induced calcium carbonate precipitation (MICP) and its potential in bioconcrete: Microbiological and molecular concepts. *Frontiers in Materials*, *6*, Article 126. <https://doi.org/10.3389/fmats.2019.00126>

Cwalina, B. (2008). Biodeterioration of concrete. *Architecture Civil Engineering Environment*, *1*(4), 133–140. <http://acee-journal.pl/cmd.php?cmd=download&id=dbitem:article:id=58&field=fullpdf>

Dungani, R., Aditiawati, P., Islam, M. N., Aprilia, N. A. S., Hartati, S., Sulaeman, A., Sumardi, I., Karliati, T., Yuniarti, K., & Sutrisno. (2019). Evaluation of the effects of decay and weathering in cellulose-reinforced fiber composites. In M. Jawaid, M. Thariq, & N. Saba (Eds.), *Durability and life prediction in biocomposites, fibre-reinforced composites and hybrid composites* (pp. 173–210). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102290-0.00009-X>

Gadd, G. M., Bahri-Esfahani, J., Li, Q., Rhee, Y. J., Wei, Z., Fomina, M., & Liang, X. (2014). Oxalate production by fungi: Significance in geomycology, biodeterioration and bioremediation. *Fungal Biology Reviews*, *28*(2–3), 36–55. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2014.05.001>

Hermansson, M., Jones, G. W., & Kjelleberg, S. (1987). Frequency of antibiotic and heavy metal resistance, pigmentation, and plasmids in bacteria of the marine air-water interface. *Applied and Environmental Microbiology*, *53*(10), 2338–2342. <https://doi.org/10.1128/aem.53.10.2338-2342.1987>

Hussein, A. (2023). *Essentials of flow assurance solids in oil and gas operations: Understanding fundamentals, characterization, prediction, environmental safety, and management*. Gulf Professional Publishing.

Jaradat, A., Al-Akhras, M. A. H., Makhadmeh, G., Aljarrah, K., Al-Omari, A., Ababneh, Z., Masadeh, M. M., Al-Khateeb, H. M., Albiss, B. A., & Alshorman, M. (2011). Artificial semi-rigid tissue sensitized with natural pigments: Effect of photon radiations. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, *3*(2), 266–276. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.80781>

KAPUN, Mija. ROJNIK, Emilija. Mikrobiološka analiza površin betona na Gimnaziji Jožeta Plečnika Ljubljana. Raziskovalna naloga. Ljubljana, Gimnazija Jožeta Plečnika Ljubljana, 2025

Jiang, L., Pettitt, T. R., Buenfeld, N., & Smith, S. R. (2022). A critical review of the physiological, ecological, physical and chemical factors influencing the microbial degradation of concrete by fungi. *Building and Environment*, 214, Article 108925. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2022.108925>

Liu, X., Qian, Y., Wang, Y., Wu, F., Wang, W., & Gu, J.-D. (2022). Innovative approaches for the processes involved in microbial biodeterioration of cultural heritage materials. *Current Opinion in Biotechnology*, 75, Article 102716. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102716>

Lovše, U. (2023). *Optimizacija izolacije bakterijske genomske DNA za sekvenciranje s tehnologijo nanopore in analiza zaporedij izbranih sevov* [Magistrsko delo]. Repozitorij Univerze v Ljubljani. <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?lang=slv&id=144389>

Marvasi, M., Gallagher, K., Casillas-Martínez, L., Pagan, W., Rodríguez-Santiago, R., Vega, G., & Visscher, P. (2012). Importance of B4 medium in determining organomineralization potential of bacterial environmental isolates. *Geomicrobiology Journal*, 29, 10–16. <https://doi.org/10.1080/01490451.2011.636145>

Mesec, U. (2014). *Iskanje novih potencialnih zaviralcev N-acetilglukozamin enolpiruvil transferaze z rešetanjem knjižnice spojin Fakultete za farmacijo* [Bachelor's thesis, University of Ljubljana]. Repozitorij Univerze v Ljubljani. http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/diplome/2014/Mesec_Uros_dipl_nal_2014.pdf

Nuhoglu, Y., Oguz, E., Uslu, H., Ozbek, A., Ipekoglu, B., Ocak, I., & Hasenekoglu, I. (2006). The accelerating effects of the microorganisms on biodeterioration of stone monuments under air pollution and continental-cold climatic conditions in Erzurum, Turkey. *Science of The Total Environment*, 364(1–3), 272–283. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.06.034>

Novak Babič, M., & Gunde-Cimerman, N. (2021). Water-transmitted fungi are involved in degradation of concrete drinking water storage tanks. *Microorganisms*, 9(1), Article 160. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010160>

Orlandi, V. T., Martegani, E., Giaroni, C., Baj, A., & Bolognese, F. (2022). Bacterial pigments: A colorful palette reservoir for biotechnological applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(3), 981–1001. <https://doi.org/10.1002/bab.2170>

Pullan, S. T., Daly, P., Delmas, S., Ibbett, R., Kokolski, M., Neiteler, A., van Munster, J. M., Wilson, R., Blythe, M. J., Gaddipati, S., Tucker, G. A., & Archer, D. B. (2014). RNA-sequencing reveals the complexities of the transcriptional response to lignocellulosic biofuel substrates in *Aspergillus niger*. *Fungal Biology and Biotechnology*, 1(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40694-014-0003-x>

Pyzik, A., Ciuchcinski, K., Dziurzynski, M., & Dziewit, L. (2021). The bad and the good—Microorganisms in cultural heritage environments—An update on biodeterioration and biotreatment approaches. *Materials*, 14(1), Article 177. <https://doi.org/10.3390/ma14010177>

Rather, M. A., Gupta, K., & Mandal, M. (2021). Microbial biofilm: Formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(4), 1701–1718. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00624-x>

Suchy, H. (2022). Testiranje glivnih izolatov na sposobnost biomineralizacije [Individualni raziskovalni projekt, Univerza v Ljubljani]

KAPUN, Mija. ROJNIK, Emilija. Mikrobiološka analiza površin betona na Gimnaziji Jožeta Plečnika Ljubljana. Raziskovalna naloga. Ljubljana, Gimnazija Jožeta Plečnika Ljubljana, 2025

Sarayu, K., Iyer, N. R., & Murthy, A. R. (2014). Exploration on the biotechnological aspect of the ureolytic bacteria for the production of the cementitious materials--a review. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(5), 2308–2323. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0686-0>

Savković, Ž., Stupar, M., Unković, N., & et al. (2019). In vitro biodegradation potential of airborne *Aspergilli* and *Penicillia*. *Scientific Reports*, 9(1), Article 1068. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37745-6>

Sondi, I., & Salopek-Sondi, B. (2005). Influence of the primary structure of enzymes on the formation of CaCO₂ polymorphs: a comparison of plant (*Canavalia ensiformis*) and bacterial (*Bacillus pasteurii*) ureases. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 21 19, 8876-82 .

Tiwari, A. (2022, April 11). Re: Do all bacteria form biofilm? Is there any non biofilm forming bacteria and Is there any other microbes like viruses form biofilm? [Komentar na spletnem forumu]. ResearchGate. https://www.researchgate.net/post/Do_all_bacteria_form_biofilm_Is_there_any_non_biofilm_forming_bacteria_and_Is_there_any_other_microbes_like_viruses_form_biofilm/635cccc4e7eb91fe7b04dd6f/citation/download

Trovão, J., Tiago, I., Catarino, L., Gil, F., & Portugal, A. (2020). In vitro analyses of fungi and dolomitic limestone interactions: Bioreceptivity and biodeterioration assessment. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 155, Article 105107. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.105107>

Urbančič, I. (2024). *Obvladovanje biofilmov MRSA s kisljinami naravnega izvora* [Master's thesis, University of Ljubljana]. Repozitorij Univerze v Ljubljani. <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?lang=eng&id=164931>

Wandelt, K. (Ed.). (2018). *Encyclopedia of interfacial chemistry: Surface science and electrochemistry*. Elsevier.

Wilkin, D. (2025). The polymerase chain reaction – advanced. In *CK-12 Advanced Biology*. CK-12 Foundation. <https://flexbooks.ck12.org/cbook/ck-12-advanced-biology/section/9.3/primary/lesson/the-polymerase-chain-reaction-advanced-bio-adv/>

KAPUN, Mija. ROJNIK, Emilija. Mikrobiološka analiza površin betona na Gimnaziji Jožeta Plečnika Ljubljana. Raziskovalna naloga. Ljubljana, Gimnazija Jožeta Plečnika Ljubljana, 2025

