

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra ekologie a životního prostředí



**Analýza mikrobiální abundance a biomasy ve vertikálním profilu různých
sedimentů Severního moře**

Bc. Anna Molíková

Diplomová práce

předložená

na Katedře ekologie a životního prostředí

Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

jako součást požadavků

na získání titulu Mgr. v oboru

Ekologie a ochrana životního prostředí

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Martin Rulík, Ph.D.

Olomouc 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Doc. RNDr. Martina Rulíka, Ph.D. a jen s použitím citovaných literárních pramenů.

V Olomouci dne 6. května 2017

Podpis:

Molíková A. (2017): Analýza mikrobiální abundance a biomasy ve vertikálním profilu různých sedimentů Severního moře. Diplomová práce, Katedra ekologie a životního prostředí, Přírodovědecké fakulta, Univerzita Palackého Olomouc, 28 str., v češtině.

Abstrakt

Cílem práce je porovnat vertikální distribuci mikroorganismů u tří typů sedimentů. Posoudit, zda existuje rozdíl mezi mikrobiální abundancí a množstvím biomasy v hloubkovém profilu a mezi různými typy sediment. Dále byla provedena analýza druhové bohatosti v doméně *Eubacteria*.

Vzorky písku, bahna a ústřicových lavic byly odebrány z intertidálních sedimentů ostrova Sylt, který je součástí Wattového moře. Odběr probíhal od ledna do února roku 2015 a zpracování vzorků od října 2015 do prosince roku 2016.

Sledovány byly tyto parametry: i) celková mikrobiální abundance ve vertikálním profilu a mezi stanovišti, ii) mikrobiální biomasa ve vertikálním profilu a mezi stanovišti, iii) druhová bohatost domény *Eubacteria* ve vertikálním profilu a mezi stanovišti.

Všechny zkoumané sedimenty vykazují trendy celkové mikrobiální abundance a biomasy ve vertikálním profilu s výjimkou písku. Nejvhodnější sediment pro růst mikroorganismů jsou ústřicové lavice, které poskytují nejlepší kombinaci potřebných faktorů.

Klíčová slova: intertidální sedimenty, wattové moře, ústřicové lavice, mikrobiální abundance, mikrobiální biomasa, diverzita v doméně *Eubacteria*, vertikální profil sedimentu

Molíková A. (2017): Analysis of microbial abundance and biomass distribution in vertical profile of various sediments of North Sea. Master's thesis, Department of Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Science, Palacky University in Olomouc, pp. 28.

Abstract

The aim of this work is to compare vertical microorganism distribution in three types of sediment. To describe if there is any difference between microbial abundance and the volume of biomass in the depth profile and between various types of sediment. Furthermore, the analysis of species variety of *Eubacteria* domain was performed.

Samples of sand, mud and oyster beds were taken from intertidal sediments of Sylt island which is part of the Wadden Sea. The sampling was done from January to February 2015 and sample analysis from October 2015 to December 2016.

These parameters were screened: i) total microbial abundance in vertical profile and between habitats, ii) microbial biomass in vertical profile and between habitats, iii) species variability in *Eubacteria* domain in vertical profile and between habitats.

All studied sediments showing trends of total microbial abundance and biomass in vertical profile except sand. The most suitable sediment for microbial growth are oyster beds which shows best factor combination.

Key words: intertidal sediment, Wadden Sea, oyster's bed, microbial abundance, microbial biomass, species richness in *Eubacteria* domain, vertical sediment profile

Poděkování

Nejprve bych ráda poděkovala vedoucímu této práce Doc. RNDr. Martinu Rulíkovi, Ph.D. Bez jeho vzorků a poskytnutých základů dané tematiky a trpělivosti, by tato práce nemohla vzniknout. Také chci vyjádřit velký dík členům bývalé Laboratoře mikrobiální ekologie vod. Právě oni mě naučili veškeré použité laboratorní techniky a poradili v každé situaci. Chci poděkovat i Kateřině Pančochové, za možnost použít její výsledky bakalářské práce pro obohacení mé diplomové práce. Děkuji mé rodině a nejbližším, kteří mi umožnili studovat a vždy mi byli oporou. V poslední řadě chci poděkovat všem členům Katedry ekologie a životního prostředí, kteří vytváří příjemné pracovní prostředí a neopakovatelnou atmosféru, na kterou budu vždy vzpomínat.

Obsah

1. Úvod	1
2. Cíle práce	2
3. Lokalita a metody	3
3.1. Ostrov Sylt	3
3.2. Odběr vzorků	3
3.3. Granulometrický rozbor	3
3.4. Stanovení sušiny	4
3.5. Stanovení neutrálních sacharidů	4
3.6. Stanovení mikrobiální abundance a biomasy	4
3.6.1. Hustotní centrifugace a sonikace	4
3.6.2. Barvení DAPI	5
3.6.3. Fluorescenční mikroskopie a vyhodnocení v programu NIS Elements	5
3.7. Zjištění druhové diverzity domény <i>Eubacteria</i> ve vertikálním profilu	5
3.7.1. Izolace nukleových kyselin a polymerázová řetězová reakce	5
3.7.2. Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)	7
4. Výsledky	9
4.1. Granulometrické měření	9
4.2. Mikrobiální abundance ve vertikálním profilu pro různé typy sedimentů	9
4.3. Mikrobiální biomasa ve vertikálním profilu pro různé typy sedimentu	10
4.4. Objem průměrné mikrobiální buňky v hloubkovém profilu pro různé typy sedimentu	11
4.5. Druhová diverzita domény <i>Eubacteria</i>	12
4.6. Vztahy mezi parametry ve vertikálním profilu	13
5. Diskuze	19
5.1. Mikrobiální abundance ve vertikálním profilu	19
5.2. Mikrobiální biomasa ve vertikálním profilu	20
5.3. Druhová bohatost domény <i>Eubacteria</i>	21
6. Souhrn	22
7. Literatura	23
8. Příloha	26

1. Úvod

Intertidální pobřeží Severního moře je dynamický systém ovlivněný především slapovými jevy, tedy gravitační silou Země, Měsíce a Slunce. Tyto periodicky zaplavované písčito-bahnité plochy nazýváme wattové moře (Wattenmeer, Wadden Sea). Tvoří pobřeží Nizozemska, Německa, Dánska a od Severního moře je vymezují Fríské ostrovy. Území je největší zachovaný intertidální systém světa s ekologickým významem, který přesahuje hranice jeho výskytu. (whc.unesco.org/en/list/1314, 11.4.2017)

Celá oblast poskytuje bohatý zdroj živin mnoha živočichům. Je to významné útočiště pro migrující ptáky a odchovy ryb (waddensea-worldheritage.org/, 10.4. 2017). Zvířata, která se zde krmí, zkonsumují ohromné množství potravy ve formě bezobratlých a měkkýšů (Fontana et Catherine 2015). Za touto hojností stojí především toky organických a anorganických látek ze souše i z moře, které vedou k vysoké produktivitě (Alongi 1998). V těchto procesech přeměny organické a anorganické hmoty hrají klíčovou roli mikroorganismy, které se podílí na koloběhu látek a procesech remineralizace živin (Decho 2000). Mikroorganismy tak zajišťují přeměnu anorganických látek na organické a stojí na počátku trofického řetězce wattových moří (Mann 1973).

Dle množství mikroorganismů na dané lokalitě je možné usuzovat velikost její mikrobiální produkce. Proto jsme se rozhodli kvantifikovat mikrobiální abundanci, biomasu a navíc zjistit taxonomickou bohatost mikrobiálního společenstva ve třech typech sedimentů a jejich hloubkových profilech. Studie zabývající se touto tematikou se často soustředí na jeden substrát (Cammen 1991) nebo srovnávají pouze dva typy sedimentu (Llobet-Brosa et al. 1998, Lemke 2010). V této práci porovnááme navzájem charakteristické typy sedimentů wattového pobřeží ostrova Sylt. Chceme tak přispět ke komplexnějšímu pohledu na roli mikroorganismů v systému wattového moře.

2. Cíle práce

Hlavním cílem diplomové práce bylo stanovení mikrobiální abundance a vertikální distribuce mikroorganismů. Dále zjistit biomasu mikroorganismů ve vertikálním profilu pro 3 typy substrátů. Výzkum se také věnuje druhové diverzitě v doméně *Eubacteria* v závislosti na vertikálním profilu.

3. Lokalita a metody

3.1. Ostrov Sylt

Německý ostrov Sylt, je jedním ze Severofríských ostrovů, nacházejících se v Severním moři. Při východním pobřeží přechází do wattového moře, které ho odděluje od pevniny. Tvoří část národního parku Wattenmeer, který je od roku 2009 vyhlášen biosférickou rezervací v rámci světového dědictví UNESCO, ptačí oblastí dle Natury 2000 a Ramsarským mokřadem. (www.nationalpark-wattenmeer.de).

3.2. Odběr vzorků

Vzorkování probíhalo v lednu roku 2015 v průběhu odlivových period. Vzorky byly odebrány v zálivu Königshaffen u města List, nedaleko AWI Wadden Sea Station. Odebrány byly tři typy sedimentu, bahnitý (M-mud), písčité (S-sand) a substrát z ústřicových lavic (U). K odběru byla použita sonda – trubice z plexiskla, umožňující odběr sedimentu do hloubky 20 cm. Jádro bylo poté rozděleno na jednotlivé hloubkové profily (0–5 cm, 5–10 cm, 10–15 cm, 15–20 cm). Pro každý substrát bylo odebráno 6 sond (0–20 cm), 3 sondy byly použity na granulometrickou analýzu a stanovení organického uhlíku, zbývající 3 pro stanovení polysacharidů, mikrobiální abundance a biomasy a pro analýzu mikrobiální diverzity. V případě ústřicových lavic se díky neprostupnosti substrátu nepodařilo odebrat poslední profil (15–20 cm). Vzorky byly uchovávány při -20°C.

3.3. Granulometrický rozbor

Sediment byl proset přes systém deseti sít s postupně se snižující velikostí ok. Jednotlivé frakce sedimentu byly zváženy. Průměrná velikost zrna určena s použitím softwaru Gradistat (verze 8.0) (Blott et Pye, 2001).

3.4. Stanovení sušiny

Do předem umytých a zvážených keramických misek byla přidána navážka vlhkého sedimentu (cca 20 g). Sušení probíhalo po dobu 24 h v sušárně při 105°C. Poté byly vzorky přeneseny do exsikátoru a po vychladnutí zváženy.

3.5. Stanovení neutrálních sacharidů

Z roztoku D-glukosy byly připraveny kalibrační roztoky (koncentrace 0–100 µl/ml). Navážka vzorku sedimentu činila 0,1 g. Ke všem připraveným zkumavkám (kalibrační roztoky i vzorky) bylo přidáno 1 ml 5 % roztoku fenolu a 5 ml koncentrované H₂SO₄, směs ihned protřepána a ponechána reagovat 30 minut (Dubois 1956). Vzorky byly měřeny na spektrofotometru (Cecil CE 9500, Labimex) při adsorbanci 490 nm. Pro sestrojení kalibrační křivky byl použit MS Excel a naměřené hodnoty přepočítány na µg/g.

3.6. Stanovení mikrobiální abundance a biomasy

3.6.1 Hustotní centrifugace a sonikace

Ze vzorků fixovaných v paraformaldehydu (finální koncentrace 2%) bylo odebráno 10 ml do zkumavky o objemu 50ml a přidáno 10 ml fyziologického roztoku (0,9 % NaCl). Pro oddělení buněk od podkladu bylo použito 50 µl směsi detergentu (Triton X-100, 0,5 %, v/v; 0.1M tetrasodium pyrophosphate and distilled water). Následovala inkubace po dobu 5 hodin za jemného míchání (třepačka OS- 10, 200 rpm) a sonikace 3x 30, 15 % power (sonotroda MS73, SonopulsHD 2200, Sonorex, Germany). Pro hustotní centrifugaci bylo použito 5ml média Nycodenz (1.31 g/ml, Axis- Shield, Oslo, Norway). Vzorky byly centrifugovány po dobu 60 min při 6000 rpm (Rotofix 32A, Hettich, Germany). Výsledný supernatant o objemu 10 ml byl uchováván při 4°C (Amalfitano et Fazi 2008).

3.6.2 Barvení DAPI

Na membránové filtry bílé 0,2 μm (GTTP, Milipore, France) bylo pipetováno 200–1000 μl (dle koncentrace buněk ve vzorku). Supernatant byl filtrován vakuovou filtrací s použitím podpůrných filtrů (nitrocelulóza filtry Milipore). Poté byly filtry rozděleny na sekce a barveny fluorochromem DAPI finální koncentrace 65 $\mu\text{l/ml}$ (80 $\mu\text{g/ml}$, Sigma, Germany). Inkubace probíhala za tmy a v chladu po dobu 10 min (Porter et Feig 1980). Po obarvení byly filtry promyty v destilované vodě a 80 % ethanolu.

3.6.3 Fluorescenční mikroskopie a vyhodnocení v programu NIS Elements

Filtry byly pozorovány v epifluorescenčním mikroskopu (hranol pro pozorování fluorochromu DAPI při excitaci/emisi 358/461 nm – Olympus BX 60, Olympus corporation Japan) a kamerou (DP 70, Olympus) při zvětšení 1000x. Celkově 400 buněk bylo snímáno na 20 náhodně vybraných polí ve třech opakováních. Obrazová analýza byla provedena v programu NIS Elements (Nikon, Česká Republika) a výsledky vyjádřeny v g/DW (dry weight). Výsledná biomasa byla vypočtena z naměřených parametrů pomocí konverzního faktoru (Norland 1993).

3.7. Zjištění druhové diverzity domény *Eubacteria* ve vertikálním profilu

3.7.1. Izolace nukleových kyselin a polymerázová řetězová reakce

Nukleové kyseliny byly izolovány z navážky 0,5 g sedimentu pomocí Power Soil Isolation kit (MoBio, Carlsbad, USA) dle návodu použití. DNA byla poté amplifikována metodou PCR za použití primerů (Tab 1) specifických pro doménu *Eubacteria*. Pro PCR amplifikaci byl použit TC-XP thermal cycler (Bioer Technology, Hangzhou, China). Reakční směs (Tab 2) o objemu 50 μl obsahovala 2 μl DNA. Podmínky pro PCR pro primery 968 F + 1378 R (Tab 3) byly stanoveny na základě (Buriánková upraveno dle Heuer et al. 1997). Kontrola produktů PCR byla provedena na spektrofotometru

NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientifics) a vzorky byly dále uchovány při -75 °C

Tabulka 1: Použité primery

Primer	Sekvence
968 F* (detekce domény <i>Eubacteria</i>)	5'- AA GCG GAA GAA CCT TAC -3' (Heuer et al. 1997)
1378 R (detekce domény <i>Eubacteria</i>)	5'- CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG -3' (Heuer et al. 1997)

*Primery používané pro denaturační gradientovou elektroforézu (DGGE) mají na 5'-konci připojenou GC kotvu (CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G)

Tabulka 2: Příprava reakční směsi pro PCR

Pro primery (968 F + 1378 R)	
H₂O	39,5
Pufr	5
F primer	0,5
R primer	0,5
dNTP	1
GC rich	1
Taq - polymerase	0,5
master mix celkem	48 + 2 µl DNA
Celkem	50 µl

Tabulka 3: Podmínky PCR pro primery 968 F + 1378 R

PCR cyklus primery 968 F + 1378 R				pro
Krok	doba	teplota	počet cyklů	
Počáteční denaturace	4 min	95 °C	1 cyklus	
Denaturace	1 min	95 °C	35 cyklů	
Annealing	1 min	55 °C		
Elongace	2 min	72 °C		
Závěrečná elongace	20 min	72 °C	1 cyklus	
Chlazení	nekonečno	4 °C		

3.7.2 Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)

Pro DGGE byl použit systém INGENYphorU System (Ingeny, Netherlands). Produkty PCR byly naneseny na 6% polyakrylamidový gel ponořený v 1 X TAE (40 mM Tris, 20 mM kyselina octová, 1 mM EDTA, pH 7,4). Zvolila jsem rozmezí denaturačních gradientů gelu 45- 65 % (Tab 4). Elektroforéza byla spuštěná po prvních 10 min na 110 V, poté na 90 V po dobu 16 hod při 60°C. Gel byl barven pomocí SYBR Green (1:10 000 dilution, Lonza, Rockland, USA) po dobu 60 min za nepřístupu světla. Fotografie byla pořízena na UV iluminátoru (Molecular Dynamics) a snímky analyzovány v program Gel2K (University of Bergen, Norway) dle protokolu Chroňákové et al. (Ústav půdní biologie, BC AV ČR, České Budějovice)

Tabulka 4: Příprava zásobních roztoků (0% a 80%)

	6% polyakrylamid	
	0%	80%
Močovina	-	50,4 g
Formamid	-	48 ml
50x TAE, pH 7,8	3 ml	3 ml
40% Acryl/ Bisacrylamid	22,5 ml	22,5 ml
Doplnit dH ₂ O do	150 ml	150 ml

4. Výsledky

4.1. Granulometrické měření

Z výsledků měření granulometrie vychází dva typy trendů v souvislosti s vertikálním profilem. Medián velikosti zrna u substrátu M a S vykazuje tendenci zvětšovat se s klesající hloubkou. Naopak v případě sedimentu U, s rostoucí hloubkou, medián velikosti zrna mírně klesá (Tab 5).

Medián pro všechny vzorky je 0,25 mm. Nejvyšší hodnota mediánu velikosti zrna byla zjištěna u sedimentu M 0,62 mm. Nižší hodnoty pak vykazoval sediment S 0,61 mm a nejnižší velikost zrna byla změřena u vzorku U 0,001 mm.

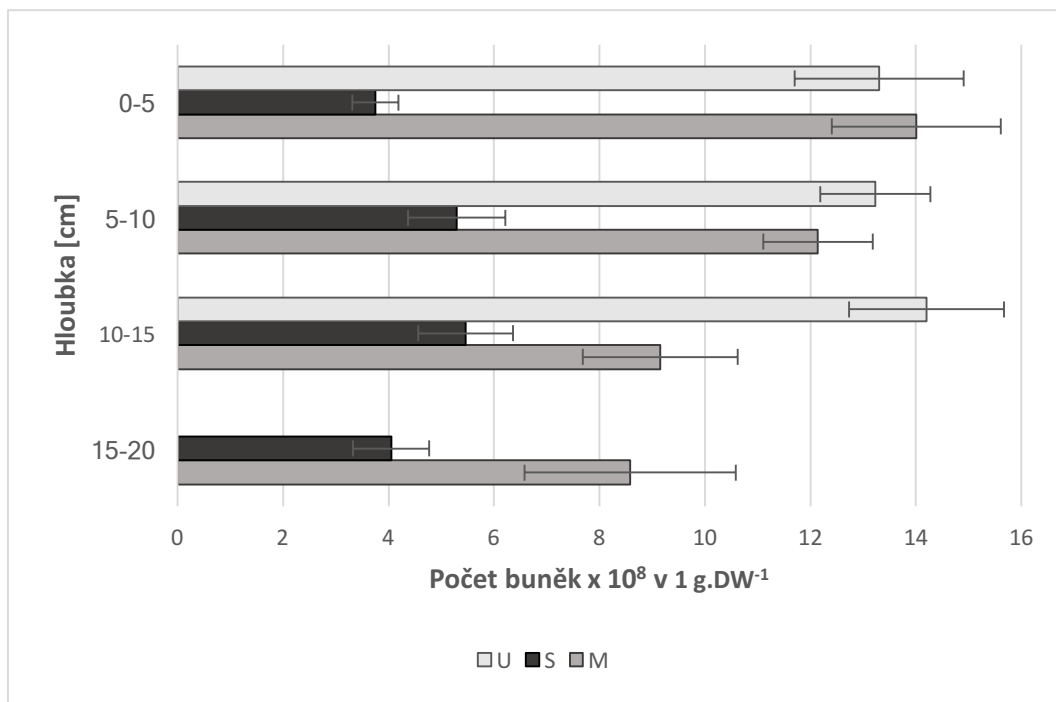
Tabulka 5: Hloubkový profil mediánu velikosti zrna u různých typů sedimentu

Hloubka [cm]	Typ sedimentu [mm]		
	M	S	U
0- 5	0,478	0,376	0,00108
5-10	0,557	0,430	0,00103
10-15	0,699	0,928	0,00046
15-20	0,750	0,886	-

4.2. Mikrobiální abundance ve vertikálním profilu pro různé typy sedimentů

Byly zjištěny rozdílné trendy mikrobiální abundance ve vertikálním profilu (Obr. 1). V případě M je to pozvolný pokles abundance s rostoucí hloubkou. Naopak u sedimentu U je tendence k mírnému nárůstu. Podobný trend vykazuje S, s výjimkou posledního hloubkového profilu, kde se počty mikroorganismů snižují.

V rámci všech vzorků se mikrobiální abundance pohybovala v rozmezí 2,33- 24,56 x 10⁸ v 1 g/DW. Nejvyšší průměrný počet buněk obsahoval sediment U s 13,58 x 10⁸ v 1g/DW. Pro M bylo naměřeno 10,97 x 10⁸ v 1g/DW a nejnižší průměrná abundance 4,64 x 10⁸ v 1g/DW byla zjištěna u sedimentu S.

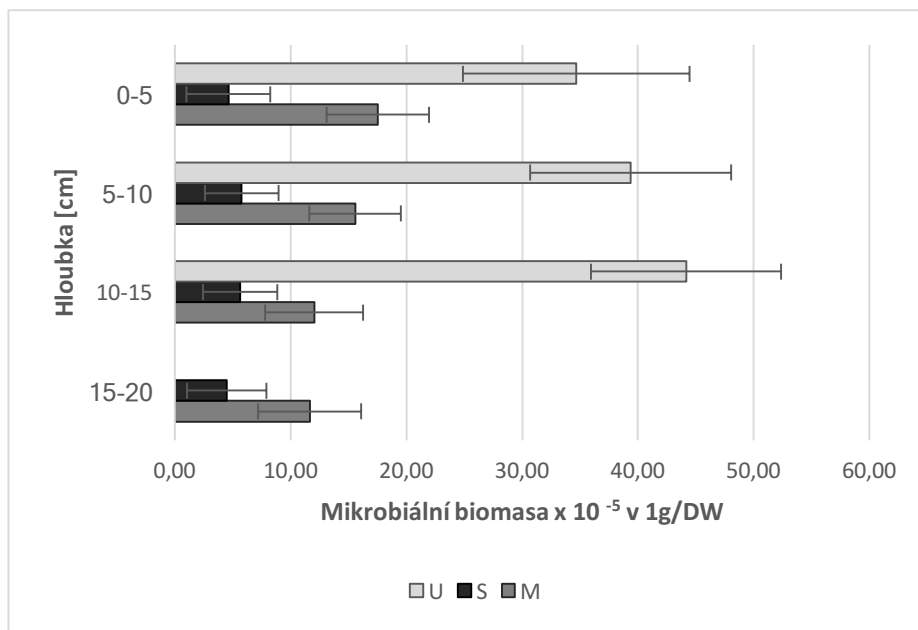


Obrázek 1: Celková průměrná abundance mikroorganismů ve vertikálním profilu pro různé typy sedimentu, chybová úsečka značí \pm SD

4.3. Mikrobiální biomasa ve vertikálním profilu pro různé typy sedimentu

Hodnoty biomasy se v hloubkovém profilu lišily. Trend pozvolného snižování jsem zaznamenala u sedimentu M. Naopak u sedimentu U je znatelné zvýšení biomasy s rostoucí hloubkou. Pro S pak nelze vyvodit žádný trend, biomasa má v různých hloubkách podobné hodnoty.

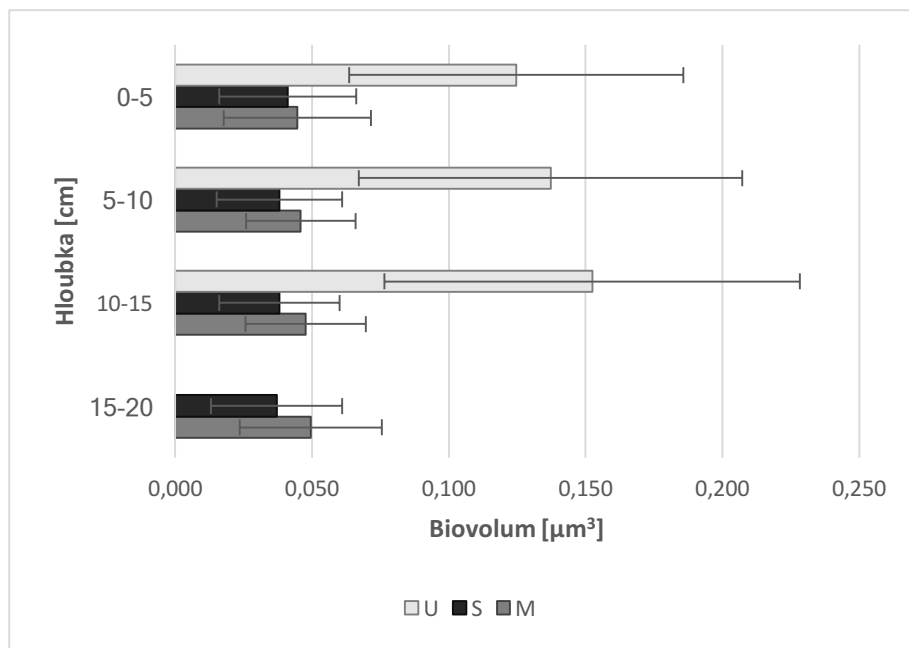
Při srovnání se naměřené hodnoty mezi jednotlivými sedimenty liší (Obr. 2). Mikrobiální biomasa kolísala v rozmezí $2,23 \times 10^{-6}$ - $44,16 \times 10^{-5}$ g C v 1g/DW. Nejvyšší průměrná hodnota byla $39,40 \times 10^{-5}$ g C v 1g/DW u sedimentu U. Pro sediment M $14,19 \times 10^{-5}$ g C v 1g/DW a nejnižší obsah biomasy byl zjištěn u vzorku S $5,11 \times 10^{-6}$ g C v 1g/DW.



Obrázek 2: Mikrobiální biomasa ve vertikálním profilu pro různé typy sedimentu, chybová úsečka značí \pm SD

4.4. Objem průměrné mikrobiální buňky v hloubkovém profilu pro různé typy sedimentu

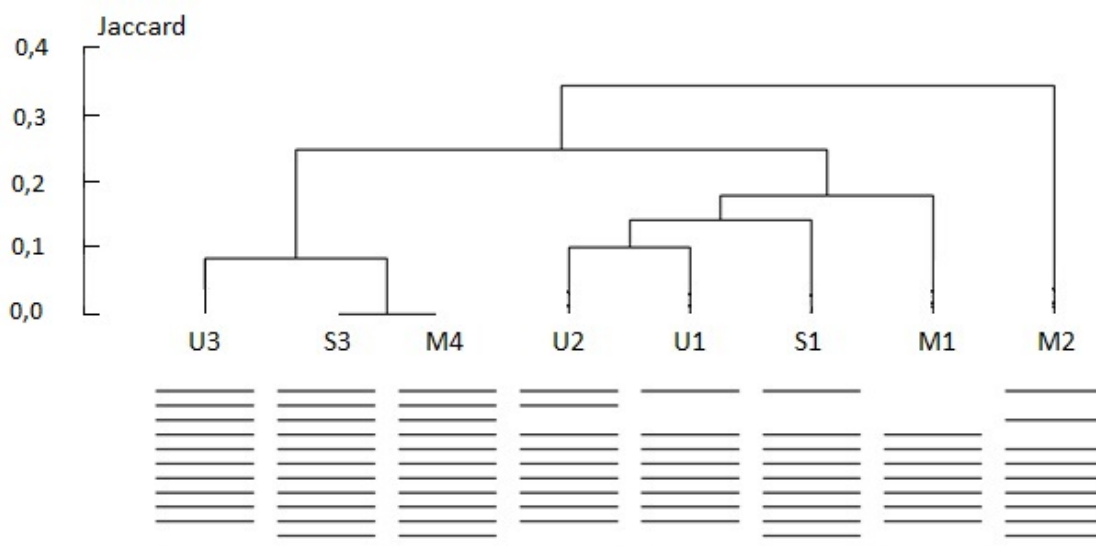
V hloubkovém profilu jsou patrné rozdíly mezi jednotlivými sedimenty (Obr. 3). U vzorku M a U je trend pozvolného zvětšování buňky s klesající hloubkou. V případě vzorku S má objem mírnou tendenci s rostoucí hloubkou klesat. Hodnoty byly naměřené v rozmezí $0,021 - 0,159 \mu\text{m}^3$. Při porovnání sedimentů mezi sebou byly nalezeny rozdíly. Největší průměrný objem buňky byl změřen u vzorku U $0,138 \mu\text{m}^3$, v případě M to bylo $0,047 \mu\text{m}^3$ a nejmenší objem byl zjištěn u vzorku S $0,038 \mu\text{m}^3$.



Obrázek 3: Objem průměrné mikrobiální buňky ve vertikálním profilu pro různé typy sedimentů, chybová úsečka značí \pm SD

4.5. Druhová diverzita domény *Eubacteria*

Z grafu podobnosti (Obr. 4) vyplývá, že ve všech vzorcích bylo nalezeno 12 fylotypů v rámci domény *Eubacteria*. Lze také vyčíst, že podobnost je závislá na hloubce, nikoli typu sedimentu. Vzorky tvořily dvě hlavní skupiny shluků, a to U3, M4, S3 a U1, U2, S1, M1, kde je patrné rozdělení právě podle hloubkového profilu. Nejbohatší byl sediment S3 a M4, který obsahoval všech 12 fylotypů. Nejchudší pak vzorek M1, kde bylo nalezeno 9 fylotypů. Do clusteru podobnosti nebyl zařazen vzorek S2, S4, M3 z důvodu nízkého obsahu DNA.



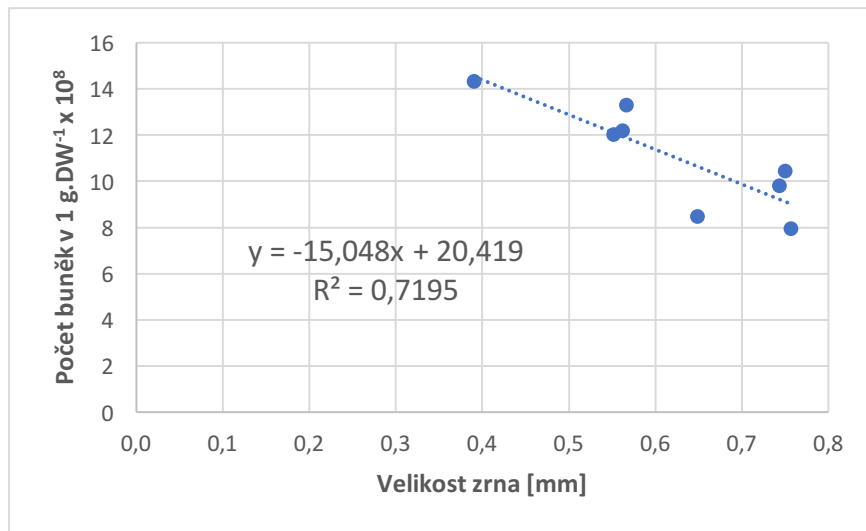
Obrázek 4: Jaccardův diagram: Cluster podobnosti druhové diverzity domény *Eubacteria* ve vertikálním profilu různých typů sedimentu

4.6. Vztahy mezi parametry ve vertikálním profilu

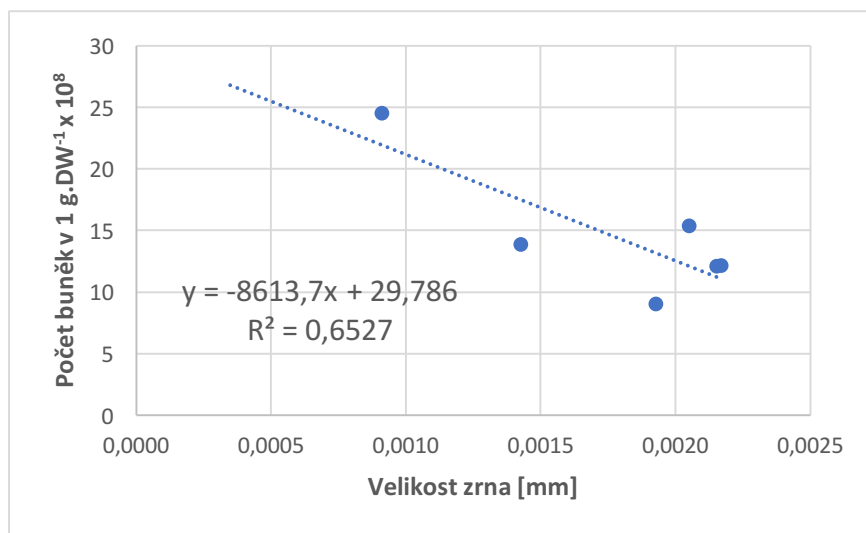
Ve vztahu mezi velikostí zrna a mikrobiální abundance byla prokázána negativní korelace u sedimentu M ($r = -0,84822$ (Obr. 5)) a pro U ($r = -0,80792$ (Obr. 6)), což neplatilo pro sediment S, kde vztah prokázán nebyl ($r = -0,1838$ (Obr. 7)).

Celková mikrobiální abundance a obsah polysacharidů byly významně pozitivně korelovány, pro M ($r = 0,875699$ (Obr. 11)) a U ($r = 0,808307$ (Obr. 12)). V případě vzorku S bez průkazného vztahu ($r = 0,418803$ (Obr. 13)).

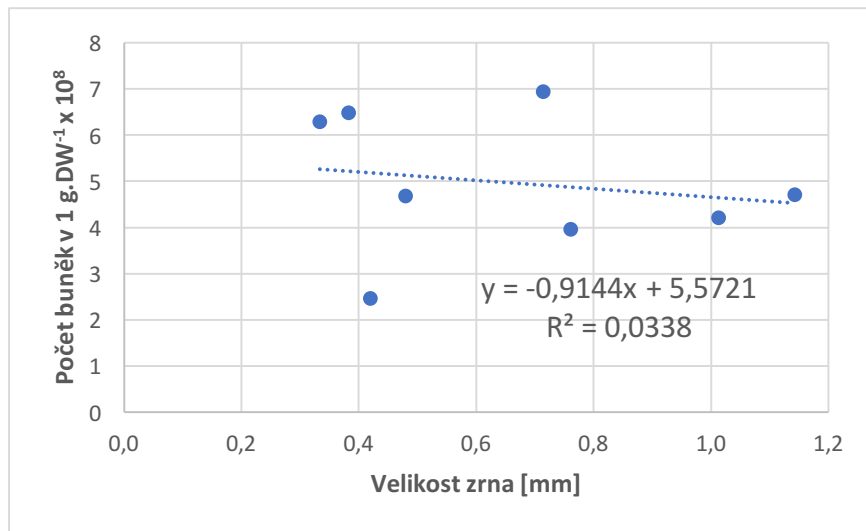
Mezi obsahem polysacharidů a mikrobiální biomasou byla zjištěna pozitivní korelace u M ($r = 0,875699$ (Obr. 8)) a U ($r = 0,808307$ (Obr. 9)) s výjimkou S, kde nebyl pozorován signifikantní vztah ($r = 0,404081$ (Obr. 10)).



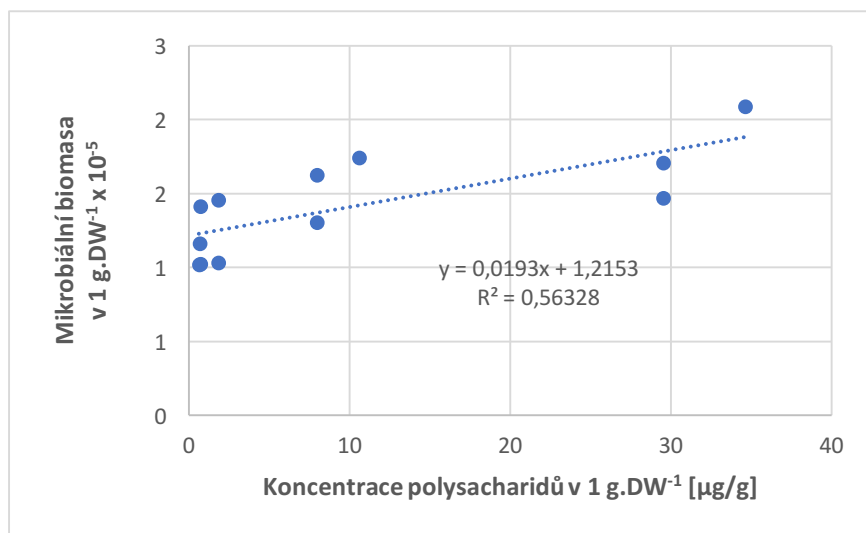
Obrázek 5: Vztah mezi velikostí zrna a celkovou mikrobiální abundancí vertikálního profilu sedimentu bahno (M)



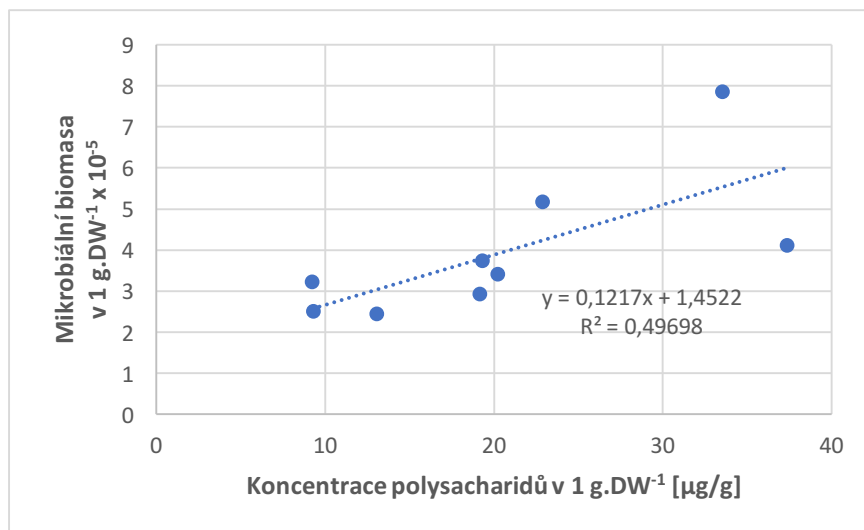
Obrázek 6: Vztah mezi velikostí zrna a celkovou mikrobiální abundancí vertikálního profilu sedimentu ústřicových lavic (U)



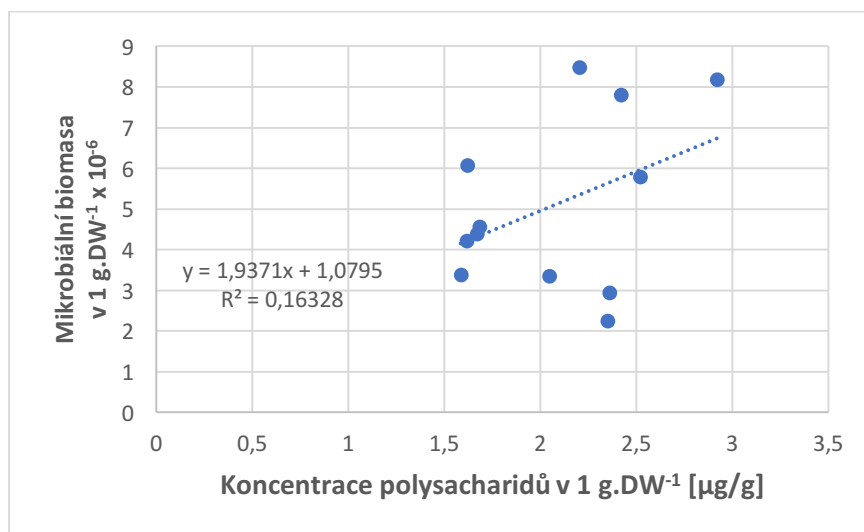
Obrázek 7: Vztah mezi velikostí zrna a celkovou mikrobiální abundancí vertikálního profilu sedimentu písku (S)



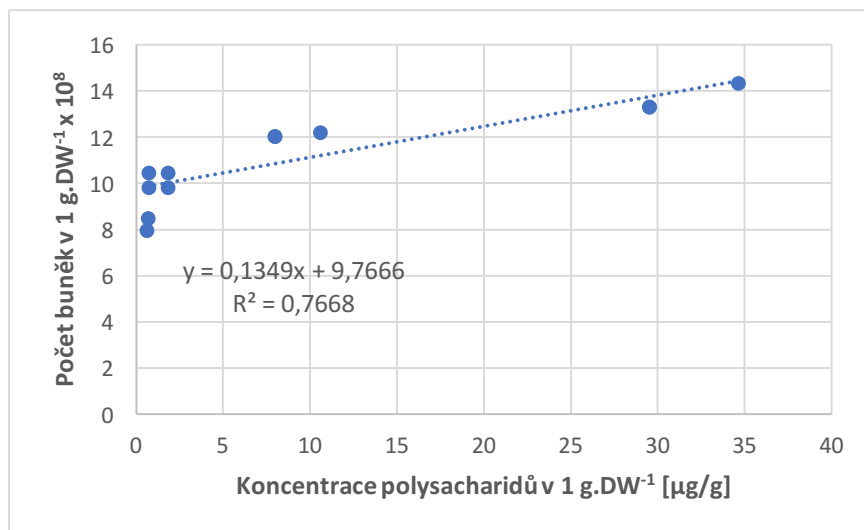
Obrázek 8: Vztah koncentrace polysacharidů a mikrobiální biomasy vertikálního profilu sedimentu bahno (M)



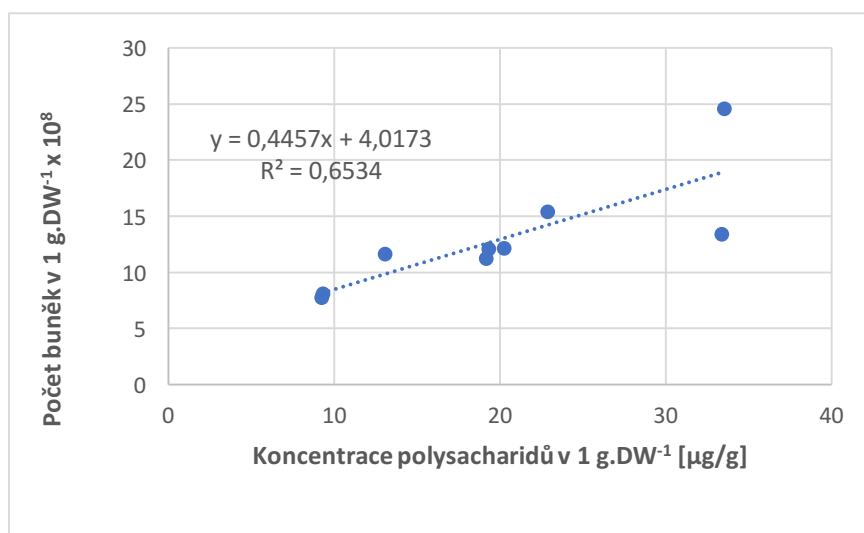
Obrázek 9: Vztah koncentrace polysacharidů a mikrobiální biomasy vertikálního profilu sedimentu ústřicové lavice (U)



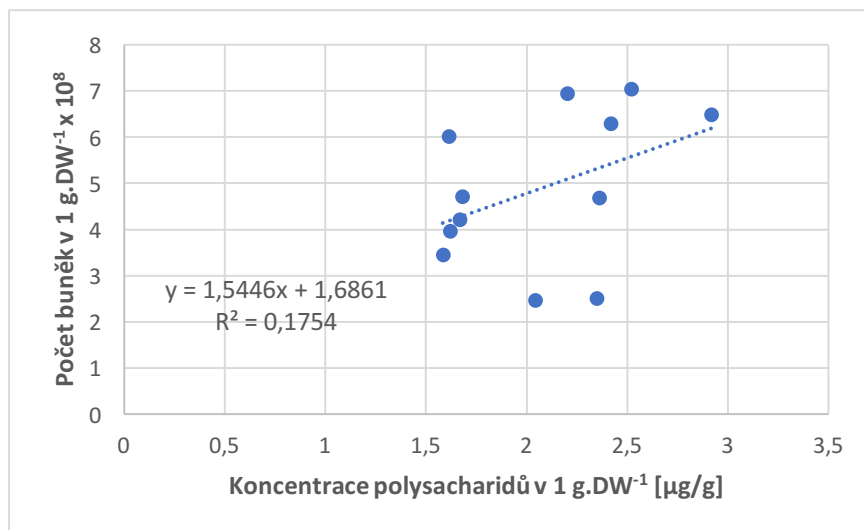
Obrázek 10: Vztah koncentrace polysacharidů a mikrobiální biomasy vertikálního profilu sedimentu písek (S)



Obrázek 11: Vztah koncentrace polysacharidů a celkové mikrob. abundance vertikálního profilu sedimentu (M)



Obrázek 12: Vztah koncentrace polysacharidů a celkové mikrob. abundance vertikálního profilu sedimentu (U)



Obrázek 13: Vztah koncentrace polysacharidů a celkové mikrob. abundance vertikálního profilu sedimentu (S)

5. Diskuze

Tato práce porovnává tři typy sedimentů watového moře z hlediska celkové mikrobiální abundance a biomasy. Rozdíly byly sledovány v hloubkovém profilu u vzorků písku (S), bahna (M) a ústřicových lavic (U). Navíc byla provedena analýza druhové bohatosti v doméně *Eubacteria*. Výsledky ukazují, že ústřicové lavice jsou z hlediska celkového počtu mikroorganismů a biomasy nejbohatším typem sedimentu na rozdíl od písku, který má hodnoty nejnižší. Celková mikrobiální abundance vzorků U a M silně negativně korelovala s velikostí zrna. Navíc zde byla prokázána pozitivní korelace mezi koncentrací polysacharidů a celkovou mikrobiální abundancí. V případě sedimentu S nebyl zjištěn průkazný vztah s ostatními parametry. Analýza druhové bohatosti domény *Eubacteria* odhalila 12 fylogrup a závislost diverzity na hloubkovém profilu, nikoli na typu sedimentu.

5.1. Mikrobiální abundance ve vertikálním profilu

Hodnoty výsledků se shodují s obecnou představou, že povrchové marinní sedimenty obsahují velmi podobné řády mikroorganismů o hodnotách 10^8 v 1 g/DW (Schmidt 1998). Změřené rozmezí hodnot celkové mikrobiální abundance 2,33- 24,56 x 10^8 v 1 g/DW se řádově shoduje s výsledky 1,17- 99,7 x 10^8 , které zjistil Dale (1974) v intertidálním sedimentu Peptideswick Inlet v Nova Scotia. K podobným, ale vyšším hodnotám také z ostrova Sylt, dospěli Musat et al (2005). Důvod většího množství mikroorganismů může být odběr vzorků v letních měsících, kdy je mikrobiální aktivita vyšší než v zimě (Tuomi et al. 1999). Nejvyšší průměrná mikrobiální abundance byla změřena u vzorku U, nižší pak u M a nejméně pro vzorek S.

Vysvětlením může být postupné zvětšování velikosti zrna v sedimentu, ve směru U, M, S. Kdy je známo, že čím jemnější jsou částice na dně mělčin, tím větší je jejich schopnost vázat organický materiál (Reichholf et al., 1990) a poskytovat větší kolonizovatelný povrch pro osídlení mikroorganismy (Meyer et al., 1987). Tvrzení je podloženo silně negativní korelací mezi velikostí zrna a celkovou mikrobiální abundancí (U: $r = -0,80792$, M: $r = -0,84822$).

Stejnou posloupnost mikrobiální abundance v obdobných typech sedimentu, objevili i Stoeck a Albers (2000) a Dale (1974). Popisují negativní korelaci mezi celkovou mikrobiální abundancí a vzdáleností od slávkové lavice. Pravděpodobný důvod bude vyšší obsah organických látek, v blízkosti lavic tvořených měkkými. Hustá populace ústřic či slávek vylučuje velké množství suspendovaných částic a rozpuštěného organického materiálu. Díky sedimentaci těchto organických látek a pevnosti sedimentu vytváří ústřicové lavice "hot spots" funkční biodiversity, což svědčí o vyšší mikrobiální produkci (Carleton Ray et McCormic Ray 2014).

Trendy objevené v hloubkovém profilu jsou specifické pro každý typ sedimentu. Pro vzorek U je to zvyšování hodnot s klesající hloubkou, u vzorku M je tendence opačná (Köster et Meyer-Reil 2001, Gerbersdorf et al 2008). Hodnoty korespondují s výsledky granulometrického měření. Kde při zmenšování velikosti zrna celkové průměrné počty mikroorganismů narůstají a naopak. Pouze u vzorku S nebyl nalezen žádný trend. Vysvětlení může podávat značná nehomogenita a pórovitost sedimentu, který je pak více disturbován pohybem vody. Jinou příčinou může být i jeho strukturální labilita, kdy dojde ke znehodnocení vzorku již při jeho odběru (Musat et al 2006).

5.2. Mikrobiální biomasa ve vertikálním profilu

Rozmezí hodnot se pohybovalo od $2,23 \times 10^{-6}$ - $44,16 \times 10^{-5}$ g C v 1 g/DW. Nejvyšší průměrný obsah biomasy má vzorek U, poté následoval sediment M a nejmenší význam z hlediska obsahu má S. Zde se hodnoty pohybovaly v nižším řádu 10^{-6} g C v 1 g/DW, oproti vzorkům U a M které se nachází v rozmezí řádu 10^{-5} g C v 1 g/DW. Stejný trend zaznamenali i Köster a Meyer-Reil (2001), kteří tvrdí, že obsah biomasy graduje od hrubozrnného sedimentu typu písek k jemnozrnným sedimentům jako je bahno (Black et al. 1995).

V hloubkovém profilu jsem objevila trendy pro sediment M a U. Tyto tendence vysvětlují předchozí měřené parametry. Dle výsledků usuzuji, že hodnoty mikrobiální biomasy přímo souvisí s celkovou mikrobiální abundancí a obsahem polysacharidů. Dokládají to nalezené signifikantní vztahy mezi zmíněnými parametry. Pozitivní korelace

mezi obsahem biomasy a množství obsažených polysacharidů v případě U $r=0,808307$ a M $r=0,875699$ a silná pozitivní korelace celkové mikrobiální abundance a koncentrace polysacharidů u všech typů sedimentu U: $r=0,9419$, M: $r=0,8168$, S: $r=0,7733$. Z výsledků tedy vychází, že čím vyšší budou celkové mikrobiální počty a koncentrace polysacharidů, tím vyšší bude i biomasa mikroorganismů a naopak.

Pozvolné snižování biomasy směrem do hloubky jsem zaznamenala u sedimentu M, stejně jako Stoeck a Albers (2000), kteří tento trend pozorovali i u slávkových lavic. V mém měření bylo u vzorku U znatelné zvýšení biomasy s rostoucí hloubkou, které koresponduje s výše zmíněnými hodnotami. V případě písku není potvrzen signifikantní trend ani vztah, s výjimkou závislosti na celkovém množství mikroorganismů.

5.3. Druhová bohatost domény *Eubacteria*

Analýza druhové diverzity odhalila celkem ve všech vzorcích 12 fylogrup. K velmi podobné, ale nižší hodnotě, 11 fylogrup, také z ostrova Sylt, dospěli ve své studii i Musat et al (2006). S tím rozdílem, že jejich vzorky neobsahují sediment z ústřicových lavic a byly odebírány v průběhu jarních a letních měsíců. Absence ústřicových lavic ve vzorcích, může vysvětlovat jeden chybějící fylogrup. Při porovnání s našimi výsledky, kde probíhal odběr vzorků v lednu, vyplývá, že množství fylogrup zůstává v průběhu roku poměrně konstantní a druhová bohatost se tedy zásadně nemění.

Mikrobiální diverzita v rámci domény *Eubacteria* vykazovala trend v závislosti na hloubkovém profilu, nikoli na typu sedimentu. Vzorky vytvořily dva shluky, mělčí (0-5 cm, 5-10 cm) a hlubší skupinu (10-15cm, 15–20 cm (15 cm u ústřicových lavic)). Autoři Llobet- Brosa et al. (1998) popisují, v rámci sedimentu písku a bahna, znatelný pokles eubakterií ve vertikálním profilu. Tento trend jsem nepotvrdila. Naopak nejbohatší byly vzorky M3 a S4, tedy bahno 10-15 cm a písek 15-20 cm. Při srovnání se studií z Camarque (delta Rhony), kde zkoumali sediment pouze do hloubky 8,75 cm, nevyplývá žádný významný trend spojený s vertikálním profilem (Villanueva et al 2004). Z výsledků usuzuji, že větší vliv na druhovou bohatost mají podmínky prostředí daného hloubkového profilu než typ sedimentu. V tomto případě nejsou dostupné studie pro srovnání.

6. Souhrn

Intertidální pobřeží Severního moře, známé jako wattové moře, je krajina s ekologickým přesahem daleko za hranice svého území. Tyto periodicky zaplavované mělčiny jsou zároveň významným evropským estuáriem. Toky látek ze souše a moře skýtají bohaté zdroje živin pro mnoho živočichů a slouží jako významné útočiště migrujících ptáků a odchovů ryb. V přeměnách organických a anorganických látek zde zaujímají nezastupitelnou roli mikroorganismy, které zprostředkovávají složité přeměny látek a jsou tak předstupněm v trofické síti.

Tato práce je zaměřená na zjištění celkové mikrobiální abundance a biomasy ve vertikálním profilu různých sedimentů wattového moře ostrova Sylt. Doplněním je analýza bohatosti v doméně *Eubacteria*. Byly porovnávány vzorky sedimentu písku, bahna a ústřicových lavic. Z výsledků vyplývá, že nejvhodnějším typem sedimentu jsou ústřicové lavice, které poskytují nejlepší kombinaci faktorů pro růst mikroorganismů. Za významný faktor považují především velikost zrna a obsah polysacharidů, který sám o sobě svědčí o počtu mikroorganismů na daném stanovišti. Jako sediment s nejmenším významem v rámci této práce považují písek. Zde byly měřené hodnoty významně nižší než u sedimentu bahna a ústřicových lavic. Výsledky analýzy bohatosti v doméně *Eubacteria* prokázaly, že množství zjištěných fylotypů není závislé na typu sedimentu, ale hloubkovém profilu. To vypovídá, že hlavní vliv mají podmínky prostředí v dané hloubce.

Hlavní rozdíl odlišující tuto práci od podobných studií je srovnání různých typů sedimentů v rámci jednoho výzkumu. Ojedinelé je i rozšíření vzorkovaného profilu až do hloubky 20 cm. V dostupné literatuře je jako nejvýznamnější vnímán hlavně povrch sedimentu. V této práci bylo u sedimentu ústřicových lavic prokázáno, že významné zastoupení mikrobiální abundance, může mít i sediment nižších hloubkových profilů. Překvapujícím faktem bylo tedy i to, že nejbohatší vzorky v rámci druhové bohatosti pocházely z nižších hloubkových profilů

7. Literatura

Alongi, D. M. Microbial-meiofaunal interrelationships in some tropical intertidal sediments. *J. Mar. Res.* **46**, 349–365 (1988).

Amalfitano, S. & Fazi, S. Author's personal copy Recovery and quantification of bacterial cells associated with streambed sediments. (2008). doi:10.1016/j.mimet.2008.06.004

Black, H. J. Koster, M. Meyer-Reyl, L. A. Andres, D. Dokumentation von Benthosgemeinschaften in Flachwasserbereichen der Nordrugschen Boddengewasser. str. 26-29 (Deutsche Bundesstiftung Umwelt, Osnabruck, 1995)

Blott, S. J. & Pye, K. GRADISTAT: a grain size distribution and statistics package for the analysis of unconsolidated sediments. *Earth Surf. Process. Landforms* **26**, 1237–1248 (2001).

Cammen, L. M. Annual bacterial production in relation to benthic microalgal production and sediment oxygen uptake in an intertidal sandflat and an intertidal mudflat. **71**, 13–25 (1991).

Carleton, G. R. McCormick-Ray, J. Marine Conservation: Science, Policy, and Management (Wiley Blackwell, Chichester, 2014)

Dale, N. G. Bacteria in intertidal sediment: Factors related to their distribution. *Limnol. Oceanogr.* **19**, 509–519 (1974).

Decho, A. W. & Decho, A. W. Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Cont. Shelf Res.* **20**, 1257–1273 (2000).

DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* **28**, 350–356 (1956).

Fontana ,C. G.: Wadden Sea. str 3 (Salem Press Encyclopedia of Science, 2015)

Gerbersdorf, S. Manz, W. Paterson, D. The engineering potential of natural benthic bacterial assemblages in terms of the erosion resistance od sediments. str. 282-294 (Blackwell Publishing Ltd., 2008)

Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K. & Wellington, E. M. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3233–41 (1997).

Kemp, P.F. The fate of benthic bacterial production. *Rev. Aquat. Sci.* **2**, 109–124. (1990).

- Köster, M. & Meyer-Reil, L. Characterization of carbon and microbial biomass pools in shallow water coastal sediments of the southern Baltic Sea (Nordrügensche Bodden). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **214**, 25–41 (2001).
- Lemke, A., Lunau, M., Badewien, T. & Simon, M. Short-term and seasonal dynamics of bacterial biomass production and amino acid turnover in the water column of an intertidal ecosystem, the Wadden Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* **61**, 205–218 (2010).
- Llobet-Brossa, E., Rosselló-Mora, R. & Amann, R. Microbial Community Composition of Wadden Sea Sediments as Revealed by Fluorescence In Situ Hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2691–6 (1998).
- Llobet-Brossa, E., Rosselló-Mora, R. & Amann, R. Microbial Community Composition of Wadden Sea Sediments as Revealed by Fluorescence In Situ Hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2691–6 (1998).
- Mann, K. H. Production and use of detritus in various freshwater, estuarine, and coastal marine ecosystems. *Limnol. Ocean.* **33**, 9–930 (1988).
- Meyer, J. L., Edwards, R. T. & Risley, R. Bacterial growth on dissolved organic carbon from a blackwater river. *Microb. Ecol.* **13**, 13–29 (1987).
- Musat, N. *et al.* Microbial community structure of sandy intertidal sediments in the North Sea, Sylt-Rømø Basin, Wadden Sea. *Syst. Appl. Microbiol.* **29**, 333–348 (2006).
- Norland, S. Relationship between biomass and volume of bacteria, Handbook of methods in aquatic microbial ecology. 303-307 (Lewis Publishers, New Jersey, 1993)
- Porter, K. G. & Feig, Y. S. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* **25**, 943–948 (1980).
- Reichholf, J. Janke, K. Kremer, B. Ekologie mořských životních prostředí Evropy. str. 44-45 (Ikar Praha, 1990)
- Schmidt, J., Deming, J. & Jumars, P. Constancy of bacterial abundance in surficial marine sediments. *Limnol.* (1998).
- Stoeck, T. & Albers, B. Microbial biomass and activity in the vicinity of a mussel bed built up by the blue mussel *Mytilus edulis*. *Helgol. Mar. Res.* **54**, 39–46 (2000).

Tuomi, P., Lundsgaard, C., Ekebom, J., Olli, K. & Künnis, K. The production and potential loss mechanisms of bacterial biomass in the southern Gulf of Riga. *J. Mar. Syst.* **23**, 185–196 (1999).eich

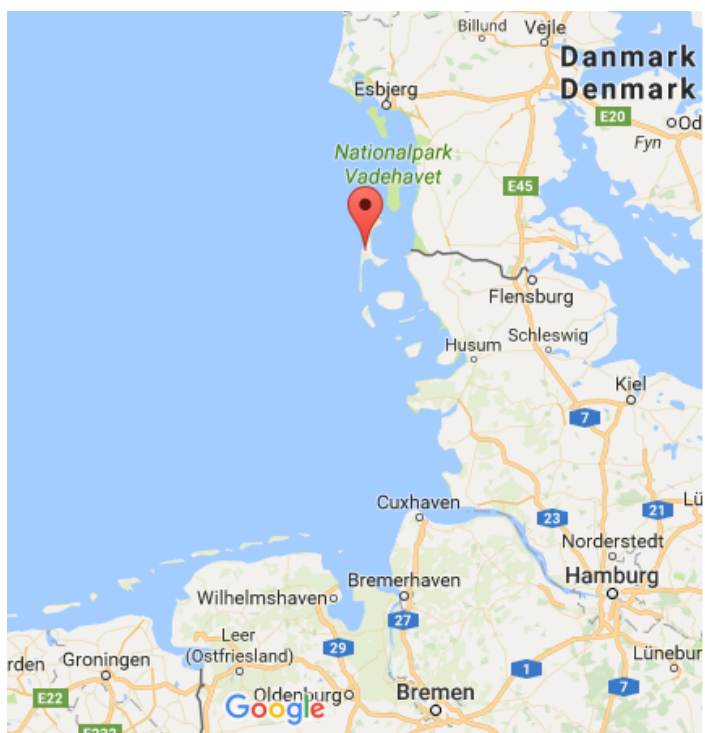
Villanueva, L., Navarrete, A., Urmeneta, J., White, D. C. & Guerrero, R. Combined phospholipid biomarker-16S rRNA gene denaturing gradient gel electrophoresis analysis of bacterial diversity and physiological status in an intertidal microbial mat. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 6920–6 (2004)

Internetové zdroje:

Wadden Sea - UNESCO World Heritage Centre. UNESCO World Heritage Centre [online]. Copyright © Klaus Dieter Meinen [cit. 10.05.2017]. Dostupné z: <http://whc.unesco.org/en/list/1314,11.4.2017%20>

Wadden Sea Diversity | Waddensea Worldheritage. There is a place where heaven and earth share the same stage | Waddensea Worldheritage [online]. Copyright © Common Wadden Sea Secretariat [cit. 10.05.2017]. Dostupné z: <http://www.waddensea-worldheritage.org/wadden-sea-world-heritage/wadden-sea-diversity>

8. Příloha



Obrázek č. 1: Poloha ostrova Sylt (zdroj: google.cz/maps)



Obrázek č. 2: Intertidální mělčiny ostrova Sylt

(autor: Ralf Roletschek, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=28817842>)



Obrázek č. 3: Lokalita odběru (zdroj: archiv Doc. RNDr. Martin Rulík, PhD.)



Obrázek č. 4 a č. 5: Sondy pro vertikální odběr sedimentu - odběr vzorků na ostrově Sylt (zdroj: archiv Doc. RNDr. Martin Rulík, PhD.)