

Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Katedra ekologie a životního prostředí



MIKROBIÁLNÍ BIOFILMY TEKOUČÍCH VOD A JEJICH VÝZNAM PRO METANOGENEZI

Lenka Brablcová

DISERTAČNÍ PRÁCE

Školitel: doc. RNDr. Martin Rulík, Ph.D.

Olomouc 2013

BIBLIOGRAFICKÉ ÚDAJE

<u>Autorka:</u>	Lenka Brablcová
<u>Název disertace (ČJ):</u>	Mikrobiální biofilmy tekoucích vod a jejich význam pro metanogenezi
<u>Název disertace (AJ):</u>	Microbial biofilms in running waters and their impact on methanogenesis
<u>Studijní program:</u>	Ekologie a ochrana prostředí
<u>Studijní obor:</u>	Ekologie
<u>Vedoucí práce:</u>	doc. RNDr. Martin Rulík, Ph.D.

Podpořeno projekty:

- GAČR 526/09/1639
„Biogeochemie metanu a detekce metanogenních a metanotrofních bakterií v říčních sedimentech“.
- FRVŠ 2135/2009
„Obohacení výuky studentů v oblasti aplikace vybraných molekulárních metod na pozadí problematiky přírodních biofilmů“

ABSTRAKT

Mikrobiální biofilmy hrají ve vodních ekosystémech významnou roli v procesu degradace organických látek, jsou centrem metabolické aktivity a umožňují existenci širokého spektra mikrobiálních společenstev. V tekoucích vodách se biofilmové nárosty vyskytují nejčastěji na ponořených substrátech, jako jsou kameny, kořeny stromů, vodní makrofyta, makroskopické agregáty, ale také bentický a hyporheický sediment. Přestože sedimenty tekoucích vod bývají považovány za aerobní prostředí, zdá se, že mohou obsahovat nepravidelně uskupené anoxické a hypoxické kapsy, jež vytváří v sedimentu mozaiku různých typů prostředí. Tato různá prostředí podmiňují existenci rozmanitých mikrobiálních společenstev, jimiž zprostředkované odlišné mikrobiální procesy mohou v tomto prostředí probíhat současně. Aerobní i anaerobní metabolické procesy jsou významné nejen pro odbourávání organických látek a dynamiku dekompozice, ale také pro základní tok energie a koloběh elementárních prvků v celém ekosystému. Rozklad organické hmoty je klíčovým procesem v lokálním i globálním koloběhu uhlíku, kdy dochází k uvolňování potenciálních skleníkových plynů (metan, oxid uhličitý). Proto mají procesy, probíhající v biofilmu sedimentů, význam i z hlediska zvyšování obsahu skleníkových plynů v atmosféře a globálním oteplování.

Tato disertační práce se zabývá analýzou společenstva mikroorganismů, jež se vyskytují v biofilmovém konsorciu a podílí se na procesech metanogeneze. Abychom lépe pochopili roli mikroorganismů v environmentálních procesech, je prvním krokem k pochopení funkce společenstva jeho detekce a identifikace. V této práci jsme pro analýzu mikrobiálních společenstev použili široké spektrum detekčních metod, se zaměřením na metody molekulární. Molekulární biologické techniky nabízí nové možnosti detekce, analýzy diverzity a složení mikrobiálního společenstva. Výstupy těchto metod a jejich vzájemné propojení nám mohou poskytnout obraz o vztazích a fungování společenstva v přírodních ekosystémech.

Klíčová slova: biofilm, hyporheický sediment, metan, tekoucí vody

ABSTRACT

Microbial biofilms play a fundamental role in organic matter decomposition, they are hot spots of microbial activity and allow coexistence of a great diversity of microbial communities. Microbial biofilms are formed in rivers on submerged surfaces such as stones, plants, roots, macroscopic aggregates and also benthic and hyporheic sediments. The seemingly well-oxygenated river sediments contain anoxic and hypoxic pockets associated with irregularities in sediment surfaces and creating a mosaic structure of various environments, where different microbial populations can live and different microbially mediated processes can occur simultaneously. Aerobic and anaerobic metabolic processes are important not only for decomposition dynamics, but also for energy and nutrient cycling within a whole ecosystem.

Moreover, organic matter decomposition in sediments is an important process in global and local carbon budgets as it ultimately recycles complex organic compounds from environments to carbon dioxide and methane. Thus the river sediment biofilms may act as a considerable source of these greenhouse gases which are important in global warming.

The aim of this Ph.D. thesis is to analyse microbial community occurring in biofilm structure and influencing the processes of methanogenesis. An important first step towards understanding the role of microorganisms in environmental processes is their detection and determination. We have used a variety of molecular biological techniques for microbial community analysis, with focus on detection, microbial diversity and community structure determination. The application of these methods and their combination can help us in understanding the microbial processes and their impact on the whole ecosystem.

Key words: biofilm, hyporheic sediment, methane, running waters

OBSAH

SEZNAM ORIGINÁLNÍCH PUBLIKACÍ.....	vii
PODÍL AUTORKY NA JEDNOTLIVÝCH PUBLIKACÍCH.....	viii
PODĚKOVÁNÍ	ix
OBECNÝ ÚVOD.....	1
Mikrobiální biofilmy.....	1
Přírodní biofilmy ve vodních ekosystémech.....	3
Hyporheický biofilm a produkce metanu.....	5
Mikroorganismy v procesu metanogeneze	7
Detekce mikrobiálních společenstev.....	8
CÍLE A STRUKTURA DISERTAČNÍ PRÁCE	10
STUDOVANÉ LOKALITY	13
VYBRANÉ METODY DETEKCE MIKROORGANIZMŮ	14
Odběr a úprava vzorků.....	14
Stanovení celkové abundance mikroorganismů.....	14
Stanovení buněčné biomasy.....	15
Fluorescenční in situ hybridizace.....	15
Denaturační gradientová gelová elektroforéza.....	16
Měření enzymatické aktivity.....	16
SHRNUTÍ VÝSLEDKŮ.....	17
ZÁVĚR	18
LITERATURA	19

PŘÍLOHY I – VI

 Publikace nebo manuskripty

PŘÍLOHY VII – VIII

 Publikační činnost

 Životopis

SEZNAM ORIGINÁLNÍCH PUBLIKACÍ

Tuto disertační práci tvoří publikace nebo manuskripty, jenž jsou označeny a citovány jako přílohy č. I – VI.

I.

Brablcová L, Buriánková I, Badurová P, Rulík M (2012) The phylogenetic structure of microbial biofilms and free-living bacteria in a small stream, *Folia Microbiol*, DOI 10.1007/s12223-012-0201-y (in press)

II.

Buriánková I, Brablcová L, Mach V, Hýblová A, Badurová P, Cupalová J, Čáp L, Rulík M (2012) Methanogens and methanotrophs distribution in the hyporheic sediments of a small lowland stream. *Fundam Appl Limnol* (17): 87-102

III.

Rulík M, Mach V, Cupalová J, Brablcová L, Buriánková I, Čáp L (2008) Running waters as an important source of methane emissions to atmosphere: preliminary results from the Sítka stream, Czech Republic. *J Environ Sci Eng* (10): 43-52.

IV.

Brablcová L, Buriánková I, Badurová P, Rulík M (2012) Occurrence and diversity of methanogenic archaea detected by FISH and DGGE in stream hyporheic sediment. *Submitted to Environ Microbiol* (EMI-2012-1185)

V.

Brablcová L, Buriánková I, Rulík M (2009) Mikrobiální biofilmy tekoucích vod. In: *Zborník prednášok a posterov* (M Prokšová, M Seman, eds.), pp. 42-49. Konferencie ČSSM - Mikrobiológia vody 2009

VI.

Rulík M, Badurová P, Brablcová L, Buriánková I, Gratzová K, Mach V, Bednařík A (2012) Srovnání mikrobiálního osídlení tří velikostních frakcí říčního sedimentu. In: *Zborník príspevkov* (M Prokšová, ed.), pp. 115-122. Konferencie ČSSM - Mikrobiológia vody a životného prostredia 2012

PODÍL AUTORKY NA JEDNOTLIVÝCH PUBLIKACÍCH

Autorka se podílela na všech výše uvedených publikacích buď formou analýzy a vyhodnocení sledovaných environmentálních parametrů nebo jako hlavní autor, kdy kromě laboratorních analýz vytvořila také celkovou koncepci publikací.

I.

Lenka Brablcová se v této práci podílela na odběru a úpravě vzorků a veškerých laboratorních analýzách. Samostatně pak vyhodnotila data, interpretovala výsledky, napsala celý manuskript a finalizovala publikaci.

II.

Lenka Brablcová se v této práci podílela na odběru a úpravě vzorků, měření a vyhodnocení enzymatických aktivit a vyhodnocení mikroskopických analýz. Dále se podílela na revizi a korekci publikace.

III.

Lenka Brablcová se v této práci podílela na odběru a úpravě vzorků, mikroskopických analýzách a jejich vyhodnocení. Dále se podílela na revizi a korekci publikace.

IV.

Lenka Brablcová se v této práci podílela na odběru a úpravě vzorků a veškerých laboratorních analýzách. Samostatně pak vyhodnotila data, interpretovala výsledky a napsala celý manuskript.

V.

Lenka Brablcová se v této práci podílela na odběru a úpravě vzorků a veškerých laboratorních analýzách. Samostatně pak vyhodnotila data, interpretovala výsledky a napsala celý příspěvek.

VI.

Lenka Brablcová se v této práci podílela na odběru a úpravě vzorků, měření enzymatických aktivit, měření buněčné biomasy a stanovení množství polysacharidů. Dále se podílela na revizi a korekci publikace.

PODĚKOVÁNÍ

Nejprve bych ráda poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Martinu Rulíkovi, Ph.D. za jeho vedení, konzultace, podporu a čas, který mi po celou dobu mého studia věnoval. Oceňuji také jeho pomoc a cenné rady při psaní dílčích studií této práce.

Dále děkuji svým kolegům doktorandům a dalším kolegům z Katedry ekologie za projevený zájem a morální podporu. Zvláštní dík pak patří mé kolegyni Mgr. Ivě Buriánkové za několikaletou spolupráci a nezištné přátelství.

V neposlední řadě děkuji také svým rodičům, kteří mi umožnili studovat a během studia mě všestranně podporovali. Na závěr děkuji svému partnerovi Michalovi za jeho trpělivost, pochopení a veškerou pomoc.

OBECNÝ ÚVOD

Mikrobiální biofilmy

Mikrobiální společenstva se ve vodním prostředí vyskytují buď ve formě planktonních mikroorganismů nebo jako přisedlá biofilmová komunita (Van Horn et al. 2011). Odhaduje se, že 99% bakterií, vyskytujících se v přírodním prostředí, žije v biofilmu nebo alespoň přetrvává na nějakém povrchu (Costerton et al. 1987).

Existuje celá řada definic biofilmu, obecně jej lze charakterizovat jako komplexní soustavu mikroorganismů (bakterií, archeí, sinic, hub, řas a prvoků), které produkují extracelulární polymerní produkty a vytváří tak na podkladu funkční mikrobiální konsorcium ukotvené v rozsáhlé polymerní matici (Lock et al. 1984, Costerton et al. 1987, Neu et Lawrence 1997, Fried et al. 2000). Jedna z nejaktuálnějších definic popisuje biofilm jako „přisedlé společenstvo mikroorganismů, charakterizované tím, že buňky, které jsou ireverzibilně přichyceny k podkladu nebo k sobě navzájem, jsou zanořeny v matici svých extracelulárních produktů a vykazují odlišný fenotyp s ohledem na rychlost růstu a transkripci genů“ (Donlan et Costerton 2002).

Mikroorganismy žijí v biofilmu z mnoha důvodů, polysacharidová matrice je nejen místem akumulace živin, ale slouží také jako bariéra, jež chrání mikrobiální společenstvo před predátory, patogeny, extrémními podmínkami prostředí jako pH, teplota, UV-záření, vysychání nebo působení toxických látek a antibiotik (Lock 1994, Paerl et Pinckney 1996, Boureau et al. 2003, Hall-Stoodley et al. 2004).

Další výhodou biofilmu je koexistence více mikrobiálních druhů, kdy jeden druh mikroorganismu využívá produkty metabolismu jiného druhu, což umožňuje přežívání „obyvatel“ biofilmu i v prostředí chudém na živiny (Korber et al. 1995). Biofilmová společenstva také umožňují mikroorganismům přetrvat v tomto výhodném prostředí a nebýt odplaveny vodním proudem (Johnson 2008).

Biofilm se vytváří v podstatě v každém prostředí, jež je v kontaktu s vodou; jeho vznik a vývoj probíhá ve 4 fázích (Costerton 1987, Mueller et al. 1992, Neu 1996, Donlan 2001, Rulík et al. 2011):

- i) fáze vzniku organického filmu tzv. conditioning - přisedání a adsorpce organických molekul na podklad
- ii) fáze přisedání buněk (adheze) - buňky k přichycení používají specifické, povrchově aktivní molekuly tzv. adheziny, jež mohou mít povahu bílkovin, glykopeptidů nebo polysacharidů, nebo buňkám při adhezi pomáhají buněčné

struktury např. fimbrie; proces přichycení může být buď reverzibilní, nebo ireverzibilní

- iii) fáze růstu biofilmu - po úspěšném přichycení buněk k povrchu následuje fáze růstu a zrání biofilmu, v této fázi mikroorganismy produkují poměrně velké množství extracelulárních polymerních produktů a postupně se tak vytváří vyžralá a stratifikovaná vrstva biofilmu
- iv) fáze uvolňování buněk z biofilmu - v této fázi dochází k uvolňování jednotlivých mikrobiálních buněk nebo jejich shluků a následné disperzi do okolního prostředí; k disperzi dochází zpravidla po dosažení kritické abundance buněk v biofilmu anebo působením fyzikálních faktorů (např. hydraulických sil)

Zejména v posledních dvou vývojových fázích biofilmu dochází ke vzniku vnitrobiofilmové komunikace tzv. quorum sensing. Díky quorum sensing mohou buňky v biofilmu kontrolovat růst a denzitu celého společenstva. Proces je založen na produkci chemických signálů a jejich vysílání do okolního prostředí. Tyto chemické signály mohou být dvojího typu, buď je to *N*-acyl-homoserin lakton, vyskytující se u gramnegativních bakterií nebo oligopeptidy, jimiž disponují především grampozitivní bakterie. Quorum sensing je účinným regulačním mechanismem tvorby biofilmu; pokud je buněčná denzita nízká, k vysílání signálu nedochází, naopak při zvyšující se buněčné hustotě roste také intenzita vysílaných signálů. Produkované chemické signály tak upozorňují okolní buňky o populační hustotě a zabraňují dalšímu populačnímu růstu (Dobretsov 2010).

Morfologie biofilmového společenstva však není ovlivňována pouze behaviorálními faktory uvnitř biofilmu, ale také faktory fyzikálními jako je např. rychlost proudění. V prostředí s vyšší rychlostí proudu, jsou biofilmy hustší a hladší, naopak ty, které rostou při pomalejším proudění, jsou více porézní. Plně vyžralý biofilm má heterogenní strukturu, buňky rostou v mikrokoloniích, navzájem spojených spletitými kanálky (Rulík et Holá 2012). Vývoj těchto kanálků může podporovat transport živin a odpadních produktů směrem do hlubších částí nebo naopak ven z biofilmu (De Beer et al. 1994).

Biofilm nalezneme prakticky všude, kde je relativní dostatek vody, živin, přiměřená výměna plynů a jakýkoli povrch. Kromě přírodního prostředí se biofilmy vyskytují i v četných průmyslových odvětvích či humánní medicíně. Vlastnosti a funkce těchto

unikátních mikrobiálních společenstev jsou využívány pro některé průmyslové aplikace (čistírny odpadních vod), zatímco v jiných odvětvích průmyslu může mít přítomnost biofilmu spíše negativní vliv (vodárenství). V čištění odpadních vod se biofilmové společenstvo uplatňuje zejména v podobě biofilmových reaktorů jako druhý stupeň čištění odpadní vody (Baudišová et Mikeš 2011). Ve vodárenských zařízeních dochází k tvorbě biofilmů na vnitřních stěnách potrubí, komor vodojemů a dalších zařízeních rozvodných sítí, což má negativní vliv na kvalitu pitné vody (Rittmann et Snoeyink 1984).

Nejen v průmyslových odvětvích má výskyt biofilmu dopad na lidskou společnost, biofilmové nárosty také významně ovlivňují lidský organizmus jako takový. Bakterie vyskytující se v lidském organizmu ve formě biofilmu způsobují celou řadu závažných zdravotních problémů (Costerton et al. 1999). Mezi nejčastější zdravotní problémy spojené s tvorbou biofilmu patří infekce dutiny ústní, zánět středního ucha, cystická fibróza a další. Významným problémem posledních desetiletí je také přítomnost biofilmových nárostů na umělých implantátech, jako jsou umělé srdeční chlopně, kardiostimulátory, umělé kloubní náhrady či nitroděložní tělíska (Holá et Růžička 2011).

Přírodní biofilmy ve vodních ekosystémech

V přírodním prostředí se biofilm vytváří všude tam, kde jsou dostupné zdroje živin a vody, tedy prakticky ve všech vodních ekosystémech. V tekoucích vodách kolonizuje biofilmové společenstvo ponořené substráty, jako jsou kameny, kořeny stromů, vodní makrofyta, ale také bentický a hyporheický sediment a makroskopické agregáty (Romaní et al. 2004, Grossart et Ploug 2000, Eggert et Wallace 2007, Hempel et al. 2008, příloha č. I)

Jak už bylo řečeno, ne všechny mikroorganismy, vyskytující se ve vodních ekosystémech, žijí v biofilmu. Bakterie, které žádný povrch nekolonizují, jsou dispergovány ve vodním sloupci a jsou velmi často označovány jako tzv. free-living, tedy volně žijící bakterie. Abychom lépe pochopili fungování a ekologii biofilmových společenstev, je důležité zjistit, zda mezi těmito dvěma typy bakterií existují podstatné rozdíly (Boureau et al. 2003).

Řada autorů (Jones et al. 2006, Haglund et al. 2003, Crump et al. 1999, Garneau et al. 2009) uvádí rozdíl nejen ve fylogenetickém složení společenstva, ale především v metabolické aktivitě volně žijících a přisedlých bakterií. Značné rozdíly mezi

společenstvem mikrobiálního biofilmu a volně žijícími bakteriemi jsme potvrdili také v naší studii na říčce Bystřici (viz příloha č. I).

I když planktonní buňky sdílejí s buňkami žijícími v biofilmu stejné funkce zpracování živin, jsou „obyvatelé“ biofilmu mnohem aktivnější než planktonní mikroorganismy. Důvodem může být skutečnost, že metabolismus planktonních mikroorganismů je ovlivňován pouze dostupností alochtonních zdrojů (živiny z okolního prostředí) a top-down efektem predátorů a jsou zde téměř zanedbatelné synergické a kooperativní vazby (Dufour et Torréton 1996, Thelaus et al. 2008). Protože je biofilm vysoce strukturovaným společenstvem vzájemně kooperujících mikroorganismů, využívají buňky v biofilmu nejen alochtonní zdroje živin z okolí, ale také živiny vznikající přímo uvnitř biofilmu (autochtonní zdroje živin), jež produkují především sinice a řasy (Sobczak 1996, Pohlou et al. 2010, Romaní 2010). Většina dostupných živin se však nachází ve formě vysokomolekulárních látek a není proto pro mikroorganismy přímo využitelná. Tyto látky musí projít procesem degradace, na níž se podílí široká škála extracelulárních enzymů. Hlavními producenty těchto extracelulárních enzymů jsou především bakterie, v menší míře také houby a řasy (Romaní 2010).

Díky této degradační schopnosti tak hrají biofilmy ve vodních ekosystémech klíčovou roli v odbourávání organických látek a uvolňování živin do okolního prostředí (Chróst et Overbeck 1990, Meyer 1994). Nejvyšší metabolické aktivity dosahují zejména biofilmová společenstva dnových (bentických) sedimentů, neboť v sedimentu dochází k akumulaci živin, což zajišťuje optimální podmínky pro růst a enzymatickou aktivitu mikrobiálního společenstva (Giorgio et Williams 2005). Poměrně vysokou metabolickou aktivitu sedimentu ve srovnání s bakteriemi vodního sloupce jsme prokázali také při výzkumu říčních biofilmů na říčce Bystřici (příloha č. V). Významným faktorem ovlivňujícím abundanci a aktivitu mikrobiálního společenstva v sedimentu je velikostní frakce zrn sedimentu. Inverzní vztah mezi mikrobiální abundancí a velikostí zrn, tedy vyšší počet mikroorganismů na menších zrnech sedimentu, uvádí hned několik autorů (Leichtfried 1985, Griebler et al. 2001, Santmire et Leff 2007). Vyšší abundanci a enzymatickou aktivitu na menších zrnech sedimentu jsme potvrdili také v naší studii (příloha č. VI).

Protože jsou biofilmy nejen centrem transformace látek z prostředí, ale také místem jejich akumulace a imobilizace, má biofilm ve vodních ekosystémech významnou funkci nejen jako biondikátor znečištění, ale i jako „zpracovatel“ vodních polutantů, čímž významně přispívá k samočištění vodních toků (Mickelburg et al. 1984, Fried

et al. 2000, Froehner 2012, Rulík 2012). Mikroorganismy biofilmu jsou také součástí potravních řetězců a prostřednictvím tzv. mikrobiální smyčky slouží jako potravní zdroje pro organismy na vyšších trofických úrovních (Azam et al. 1983). Ling et Alldredge (2003) a Pusch (1996) navíc zjistili, že zejména místa s vysokou mikrobiální aktivitou jsou hojně kolonizována vodními bezobratlými živočichy.

Hyporheický biofilm a produkce metanu

Bentické sedimenty tekoucích vod poskytují vysokou aktivní plochu pro přichycení a vývoj mikrobiálního společenstva. Biofilmové společenstvo se však nevyskytuje pouze na povrchu sedimentu, ale kolonizuje také sedimenty pod povrchem říčního dna. Biotop, jenž se nachází pod povrchem říčního dna, se nazývá hyporheická zóna (Arnon et al. 2010, Wong et Williams 2010). Hyporheická zóna je obecně definována jako intersticiální (porézní) oblast pod povrchem říčního dna, zásobovaná částečně vodou z koryta a částečně vodou podzemní. Hyporheická zóna je centrum vysoké metabolické aktivity a hraje proto významnou roli v procesu samočištění, akumulace, mineralizace a přeměny živin (Hendricks 1993, White 1993, Jones et Holmes 1996, Storey et al. 1999, Fischer et al. 2005). Když kyslíkem saturovaná povrchová voda vstupuje pod povrch říčního dna, dochází k poklesu koncentrace kyslíku, který je spotřebováván při degradaci organické hmoty. Protože ale voda v hyporheické zóně nesetrvává na jednom místě, nedochází tak k celkové spotřebě kyslíku, jak je to např. u stojatých vod v jezerech, a hyporheické sedimenty tak mohou lokálně obsahovat kyslík až do hloubky 80 cm (Bretschko 1981, Holmes et al. 1994). Přítomnost kyslíku v hloubce až 50 cm jsme potvrdili také během našeho výzkumu hyporheických sedimentů (příloha č. II a IV).

Zdánlivě dobře okysličená hyporheická zóna obsahuje anoxická a hypoxická místa, tzv. anaerobní mikrohabitaty, a vytváří tak mozaikovitou strukturu environmentálně odlišných prostředí, jež poskytují optimální podmínky pro existenci širokého spektra mikrobiálních populací (Baker et al. 1999, Storey et al. 1999, Morrice et al. 2000, Fischer et al. 2005). Protože je degradace organické hmoty závislá na enzymatické aktivitě těchto mikrobiálních populací, dochází v hyporheické zóně k odbourávání organické hmoty jak za oxických, tak za anoxických podmínek. Rozklad látek je zpravidla efektivnější za přístupu kyslíku, avšak v místech, kde je množství kyslíku minimální, dochází k odbourávání látek především pomocí anaerobních pochodů (Triska et al. 1993). V hyporheické zóně se vyskytuje široká škála anaerobně

respiračních procesů, jako je např. respirace nitrátu, železa, sulfátu či metanogenní respirace (Storey et al. 1999). Většina těchto procesů je řízena aktivitou vzájemně kooperujícího biofilmového společenstva, kdy např. metanogenní archea využívají produkty metabolismu některých jiných „obyvatel“ biofilmu (fermentačních a acidogenních bakterií), za vzniku finálního produktu – metanu (Dolfing 1988, Ferry 1993, Hornibrook et al. 2000). Metanogeneze je striktně anaerobním procesem, v biofilmu k ní dochází buď za předpokladu, že se biofilmové společenstvo nachází v anaerobním prostředí, anebo v případě, že má biofilmová vrstva dostatečnou tloušťku a umožňuje tak vznik anoxického prostředí v hlubších vrstvách biofilmu (Damgaard et al. 2001).

Metan (CH_4) je významným komponentem v geochemickém cyklu uhlíku ve vodních ekosystémech, a protože v mnohých říčních sedimentech byla naměřena jeho vysoká koncentrace (Schindler et Krabbenhoft 1998, Hlaváčová et al. 2005, Sanders et al. 2007, Wilcock et Sorrell 2008, přílohy č. II, III, IV), můžeme říční sedimenty považovat za významný zdroj tohoto skleníkového plynu, jenž se podílí na globálních klimatických změnách (Hlaváčová et al. 2006). Kromě říčních sedimentů se metanogenní společenstva vyskytují také v rýžovištích (Garcia 1990, Watanabe et al. 2006), trávicím traktu přežvýkavců (Lin et al. 1997) nebo permafrostu (Kobabe et al. 2004, Ganzert et al. 2006).

Výskyt metanogenních archeí nelze přirozeně omezit pouze na přírodní ekosystémy. Přítomnosti metanogenů v biofilmovém konsorciu se využívá např. k čištění odpadních vod prostřednictvím anaerobních biofilmových reaktorů. V reaktorech dochází k procesu tzv. anaerobní digesce, tedy odbourávání organických látek bez přístupu kyslíku, kdy konečným produktem je metan, využitelný jako zdroj energie (Lettinga 1995). Model biofilmového reaktoru je v podstatě analogický s prostředím sedimentu. Během anaerobní digesce je organická hmota degradována konsorciem mikroorganismů za vzniku prekurzorů jako H_2/CO_2 , acetát, metanol nebo formiát, z nichž metanogenní archea vytváří metan (Lens et al. 1994, McKeown et al. 2009). Bylo prokázáno, že efektivitu metanogeneze může ovlivňovat hned několik faktorů. Významnou roli v regulaci koncentrace metanu hraje kyslík, neboť v aerobním prostředí dochází k jeho spotřebě díky metanotrofním bakteriím (Damgaard et al. 2001). Kromě oxických podmínek může vést k inhibici metanogeneze také přítomnost dalších mikroorganismů (např. sulfát-redukujících bakterií, které

s metanogeny soupeří o dostupné elektrony) a změna teploty, ovlivňující mikrobiální aktivitu (Overmeire et al. 1994, McHugh et al. 2006).

Mikroorganizmy v procesu metanogeneze

Metan je produkován výhradně prostřednictvím metanogenních archeí, jakožto finální produkt anaerobní respirace (Garcia et al. 2000, Chaban et al. 2006). Metanogenní archea, náležící do kmene *Euryarchaeota*, se dělí na 5 řádů: *Methanopyrales*, *Methanococcales*, *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales* a *Methanosarcinales*. Fylogenetické analýzy odhalily, že metanogeny mohou být také rozděleny do dvou tříd. Metanogenní „třída I“ sdružuje řády *Methanopyrales*, *Methanobacteriales* a *Methanococcales*, zatímco „třída II“ je tvořena dvěma zbývajícimi řády: *Methanomicrobiales* a *Methanosarcinales* (Baptiste et al. 2005). Metanogeny se vyskytují zejména v anoxických prostředích s extrémně nízkým redoxním potenciálem. Míra produkce metanu je ve vodních sedimentech kontrolována především dostupností prekurzorů metanogeneze (acetátu a H_2/CO_2). Podle schopnosti asimilace substrátu, dělíme metanogeny na acetoklastické a hydrogenotrofní. Acetoklastické metanogeny využívají ke tvorbě metanu především acetát, zatímco hydrogenotrofní vytváří metan z H_2/CO_2 (Conrad 2007). Za normálních okolností vznikají až dvě třetiny metanu z acetátu; acetoklastická metanogeneze je dominantní cestou vzniku metanu také v prostředí charakteristickým nižší průměrnou teplotou (Schulz et al. 1997, Conrad 1999, Fey et al. 2004, McKeown et al. 2009).

V přírodních sladkovodních ekosystémech dochází přirozeně vedle produkce metanu také k jeho odbourávání. Ke spotřebě metanu může docházet jak za aerobních, tak za anaerobních podmínek. Anaerobní odbourávání metanu bylo popsáno teprve nedávno a mikroorganizmy zodpovědné za tento proces využívají k asimilaci metanu jako donory elektronů především nitráty a sulfáty (Strous et Jetten 2004). Aerobní oxidace metanu je častějším jevem a zodpovídají za ni metan-oxidující bakterie, neboli metanotrofy. Metanotrofní bakterie patří do kmene *Proteobacteria* a stejně jako metanogeny se dělí na dvě základní skupiny. Metanotrofy „typu I“ taxonomicky náleží do třídy *Gammaproteobacteria* a do čeledi *Methylococcaceae*, jež sdružuje ještě další dvě podskupiny; druhou skupinu tvoří metanotrofy „typu II“, jež patří do třídy *Alphaproteobacteria* a sdružují čeledě *Methylocystaceae* a *Beijerinckiaceae* (Bowman 2006, Semrau et al. 2010). Nejčastějšími biotopy metanotrofních bakterií

jsou jezerní sedimenty (Carini et al. 2005), trvale zamrzlé půdy a polární jezera (Whalen et al. 1996, Trotsenko et Khmelenina 2005) a rýžoviště (Henckel et al. 1999).

Metanotrofy jsou specializovanou skupinou metylotrofních bakterií, které využívají metan jakožto zdroj uhlíku a donor elektronů, přičemž elektronovým akceptorem je zde O₂. Oxidace metanu proto přímo závisí na dostupnosti těchto dvou zdrojů (Hanson et Hanson 1996).

Protože jsou metanotrofní bakterie závislé na činnosti metanogenních archeí, hrají tyto dvě skupiny mikroorganismů významnou roli v procesu vzniku/spotřeby metanu a výrazně tak ovlivňují koloběh uhlíku ve vodních ekosystémech (viz příloha č. II).

Detekce mikrobiálních společenstev

Protože velká část environmentálních procesů je úzce spojena s výskytem mikrobiálních společenstev, je prvním krokem k pochopení jejich funkce v ekosystému především detekce a identifikace jednotlivých mikroorganismů (Cottrell et Kirchmann 2000, Neufeld et Mohn 2006).

V současné době se k detekci, identifikaci a charakteristice společenstva mikroorganismů používá široká škála detekčních metod. V minulosti hojně rozšířená metoda kultivace mikroorganismů dnes již zvolna ustupuje moderním molekulárním technikám, jež jsou schopny detekovat i nekultivovatelné mikroorganismy. Molekulární biologické techniky nabízí nové možnosti detekce a analýzy diverzity a složení mikrobiálního společenstva (Muyzer et al. 1993, Amann et al. 1995, Araya et al. 2003). Dnes již standardně používané metody jsou založeny na detekci buněčné DNA pomocí fluorochromů nebo identifikaci mikroorganismů spolehlivými molekulárními markery jako je 16S rRNA (a kódující geny) (Muyzer et Smalla 1998).

Vizualizace mikroorganismů prostřednictvím molekulárně vázaných fluorochromů se používá nejen k odhadu celkové abundance mikroorganismů (nejčastěji pomocí fluorochromu DAPI), ale také k detekci a identifikaci jejich fylogenetických vztahů, prostorové distribuci ve vzorku a relativní abundanci (metoda fluorescenční *in situ* hybridizace - FISH) (Juretschko et Fritsche 2011).

Obě výše uvedené metody byly aplikovány ke zjištění celkové abundance a fylogenetického složení společenstva ve vzorcích přírodních biofilmů (příloha č. I, V) a také k identifikaci metanogenního a metanotrofního společenstva hyporheického sedimentu (příloha č. II, III, IV, VI).

Pro pochopení vztahů mezi složením a funkcí společenstva je klíčové také odhalení mikrobiální diverzity a metabolické aktivity daného společenstva (Neufeld et Mohn 2006). K určení taxonomické diverzity, hrubého odhadu druhové bohatosti společenstva a vizualizaci převládajících (dominantních) druhů se používá metoda denaturační gradientové gelové elektroforézy (DGGE) (Tabatabaei et al. 2009). Tuto moderní a efektivní metodu jsme použili k porovnání diverzity společenstva metanogenních archeí na pěti lokalitách říčky Sitky (příloha č. IV). Ke zjištění intenzity metabolických procesů mikrobiálního společenstva se používají metody založené na detekci enzymatické aktivity, kdy je po aplikaci substrátu (např. tetrazoliových solí nebo fluorogenních substrátů esteráz) sledováno množství vzniklého produktu (Baruch et al. 2004). Tyto metody měření enzymatické aktivity jsme aplikovali také v přílohách č. II, V a VI.

Použití metod, které nás informují o výskytu, složení, diverzitě a aktivitě mikrobiálních společenstev a jejich vzájemné propojení, nám může poskytnout obraz o fungování mikrobiálních společenstev v tekoucích vodách a přispět tak ke zvýšení informovanosti v oblasti biodegradability polutantů, znečištění vodních toků a procesů hrajících klíčovou roli v problematice klimatických změn (Neufeld et Mohn 2006).

CÍLE A STRUKTURA DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem disertační práce bylo analyzovat společenstvo mikroorganismů, vyskytující se v biofilmovém konsorciu a podílející se na procesech metanogeneze v přirozeném prostředí vodního toku.

V disertační práci byly sledovány dva hlavní cíle:

Charakterizovat a porovnat biofilmové společenstvo mikroorganismů, kolonizující různé typy substrátu a společenstvo planktonních mikroorganismů pomocí determinace

- fylogenetické struktury planktonního a biofilmového společenstva (přílohy č. I, V)
- buněčné biomasy planktonního a biofilmového společenstva (přílohy č. I, VI)
- enzymatické aktivity planktonního a biofilmového společenstva (přílohy č. V, VI)

Detekovat a popsat společenstva mikroorganismů zapojených do metanogenního cyklu v biofilmu hyporheického sedimentu se zaměřením na

- distribuci společenstva metanogenních archeí (přílohy č. II, III, IV, VI) a metanotrofních bakterií (příloha č. II)
- diverzitu společenstva metanogenních archeí (příloha č. IV)

Struktura disertační práce

Disertační práci tvoří publikace nebo manuskripty v anglickém (přílohy č. I, II, III, IV) a českém (příloha č. V, VI) jazyce, v nichž jsem hlavní autorkou (přílohy č. I, IV, V), nebo spoluautorkou (přílohy č. II, III, VI).

I.

V první publikaci srovnáváme biofilmová společenstva, kolonizující různé typy přírodních substrátů (kameny, kořeny stromů, vodní makrofyta, sediment a makroskopické agregáty) a planktonní společenstvo volně žijících bakterií. Zaměřili jsme se na charakteristiky, jako je abundance, biomasa a fylogenetické složení společenstva. Prokázali jsme významné rozdíly, jak mezi biofilmovým a planktonním společenstvem, tak mezi biofilmovými společenstvy navzájem.

II.

Ve druhé publikaci se zabýváme studiem distribuce a aktivity metanogenních archeí a metanotrofních bakterií na pěti lokalitách a dvou hloubkách hyporheického sedimentu. Obě skupiny mikroorganismů byly detekovány na všech studovaných lokalitách i v obou hloubkách. Souběžně byla sledována také enzymatická a metanotrofní aktivita a metanogenní potenciál studovaných mikrobiálních společenstev.

III.

Třetí práce je zaměřena na produkci metanu v malém nížinném toku. V této studii jsme detekovali jak množství tohoto skleníkového plynu, jenž uniká do atmosféry, tak i výskyt a relativní počty metanogenních archeí. Tato práce obsahuje primární výstupy výzkumu, jenž je detailněji popsán v příspěvku č. II.

IV.

V tomto manuskriptu jsme zkoumali výskyt a genetickou diverzitu společenstva metanogenních archeí na pěti lokalitách a dvou hloubkových frakcích hyporheického sedimentu. Potvrdili jsme přítomnost metanogenních archeí na všech lokalitách a v obou zkoumaných hloubkách sedimentu. Z hlediska druhové diverzity se jevila jako nejbohatší lokalita č. 4. Dále byl potvrzen výskyt dvou konkrétních metanogenních rodů.

V.

V pátém příspěvku opět srovnáváme biofilmy různých substrátů (s výjimkou vodních makrofyt) se společenstvem volně žijících bakterií. V této studii jsme zkoumali abundanci, fylogenetické složení a enzymatickou aktivitu společenstva. Tato práce obsahuje předběžné výsledky, jež byly finalizovány v příspěvku č. I, výstupem je souhrnné pojednání o naměřených parametrech.

VI.

V posledním příspěvku srovnáváme charakteristiky tří velikostních frakcí hyporheického sedimentu na pěti lokalitách malého nížinného toku. Zaměřili jsme se na studium parametrů, jako je celková abundance, biomasa, enzymatická aktivita a výskyt metanogenních archeí na jednotlivých frakcích. Prokázali jsme, že většina výše uvedených parametrů byla mnohem více asociována s nejmenší frakcí sedimentu.

STUDOVANÉ LOKALITY

Bystřice je 53.9 km dlouhá řeka 2. řádu, pramenící v Nížkém Jeseníku v nadmořské výšce 600m. Je levostranným přítokem řeky Moravy, do níž se vlévá v Olomouci. Plocha povodí je 267.4 km² a průměrný průtok činí 1.88 m³/s.

Bystřice je neregulovaným tokem s bohatou ripariální vegetací. Studovaná lokalita (49°44'N, 17°26'E) se nachází v Přírodním parku Údolí Bystřice, kde řeka vytváří hluboké skalnaté údolí s kaňony, na nichž se prosadily kvalitní lesní porosty místy připomínající prales.

Výsledky výzkumu probíhajícím na této lokalitě jsou uvedeny v přílohách č. I a V.

Sitka je 35 km dlouhá řeka 3. řádu, pramenící v Hrubém Jeseníku v nadmořské výšce 650 m. Plocha povodí je 118.81 km² a průměrný průtok činí 0.81 m³/s. Sitka se vlévá do řeky Oskavy asi 5 km severně od Olomouce.

V horním úseku toku řeka protéká zalesněným územím s minimálním antropogenním vlivem, zatímco ve své dolní části řeka přirozeně meandruje zemědělsky intenzivně využívanou krajinou. Až na malé úseky je Sitka převážně neregulovaným tokem s bohatou ripariální vegetací. V horním úseku řeky (kde se nachází studované lokality I - III) převažuje spíše štěrkovité podloží, dolní část toku (lokality IV-V) je charakteristická jemnozrnným sedimentem.

Výsledky výzkumu probíhajícím na pěti vybraných lokalitách řeky Sitky jsou uvedeny ve studiích č. II, III, IV a VI.

VYBRANÉ METODY DETEKCE MIKROORGANIZMŮ

Odběr a úprava vzorků

Na lokalitě řeky Bystřice byly odebrány vzorky povrchového sedimentu, kamenů, plavených kořenů stromů, vodních makrofyt a říční vody pro analýzu a porovnání biofilmového a planktonního společenstva. Na říčce Sitce byl na pěti vymezených lokalitách odebrán hyporheický sediment za použití metody freeze-core (Bretschko et Klemens 1986). Touto metodou jsme získali vzorky sedimentu až do hloubky 50 cm.

Pro úpravu environmentálních vzorků se stále častěji používá metoda hustotní centrifugace, která je založena na skutečnosti, že se ve vzorku vyskytují částice o různé hustotě. Každá částice sedimentuje v centrifugační tubě pouze do té úrovně média, která odpovídá hustotou její vlastní hustotě; zde se zastaví a setrvá. Ve většině případů je gradient vytvářen tak, že hustota na dně centrifugační tuby odpovídá hustotě částic, které chceme ze vzorku odstranit, zatímco hustotní vrstva nebo vrstvy nad ní odpovídají hustotě částic, které chceme uchovat (Rickwood et al. 1982). Aplikaci hustotní centrifugace však musí přirozeně předcházet postupy, které buňky z environmentálního vzorku uvolní (jako nejefektivnější se jeví kombinace použití detergentu a sonikace, tedy vystavení vzorku přímému působení ultrazvuku). Úprava vzorku s využitím kombinace výše uvedených metod je doporučována pro vzorky půdy, sedimentu nebo mikrobiálního biofilmu (Whiteley et al. 2003, Amalfitano et Fazi 2008). Použití mikroskopických technik je totiž často limitováno přítomností anorganického materiálu, který překrývá přítomné mikrobiální buňky. Hustotní centrifugace slouží zpravidla k separaci buněk od anorganického materiálu a zvyšuje tak čistotu vzorku (Boenigk 2004, Fazi et al. 2005).

Stanovení celkové abundance mikroorganismů

Abundance a s ní související biomasa mikrobiálního společenstva jsou významnými ukazateli v mikrobiální ekologii. Tyto parametry nám umožňují kvantifikovat společenstvo mikroorganismů v přírodním vzorku (Bratbak 1985).

Pro stanovení celkové abundance mikroorganismů ve vzorku se nejčastěji používají metody založené na barvení buněk fluorochromy a následné detekci obarvených buněk v epifluorescenčním mikroskopu. Jedná se většinou o barviva se specifickou vazbou na nukleové kyseliny a současnou schopností fluorescence. Mezi nejčastěji

používané fluorochromy patří DAPI (4,6-diamidino-2-fenylindol), barvivo s modrou fluorescencí. Díky specifické vazbě DAPI na DNA je mnohem jednodušší rozpoznat obarvený anorganický materiál a jednotlivé buňky (Porter et Feig 1980).

Stanovení buněčné biomasy

Obecně je biomasa charakterizována jako koncentrace živých organismů na určité jednotce plochy v určitém časovém měřítku. Mikrobiální biomasu (objem buněk) ve vzorku je možné stanovit různými metodami. Kombinace fluorescenční mikroskopie a analýzy obrazu je vysoce efektivní metodou, která umožňuje změřit hned několik buněčných parametrů najednou (délka, šířka, plocha, celkový obvod buňky) (Bratbak 1985). Základem pro stanovení buněčné biomasy je barvení vzorku DAPI a získání snímků z epifluorescenčního mikroskopu. Snímky jsou poté analyzovány pomocí software (NIS Elements). Tento program obsahuje funkce, jež změří žádané parametry objektu. Hodnoty těchto buněčných parametrů lze pak pomocí konverzního faktoru přepočítat na buněčnou biomasu (metodika dle Norland 1993).

Fluorescenční in situ hybridizace

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je efektivní metoda, která slouží k detekci a identifikaci fylogenetické struktury mikrobiálního společenstva přímo v přírodním vzorku. FISH je založena na identifikaci jednotlivých mikroorganismů prostřednictvím 16S rRNA oligonukleotidových sond, jež obsahují fluorescenční barvivo – velmi často indokarbocyanin Cy3 (Kallistova et al. 2007, Shiraishi et al. 2008).

Metoda FISH zahrnuje dvě základní fáze; v první fázi jsou buňky s roztokem oligonukleotidové sondy (próby) hybridizovány při specifické teplotě v tzv. hybridizační peci. Následně je nenavázaná nebo nespecificky navázaná próba vymyta „pracím“ puřem. Tato část postupu zajistí spojení prób s komplementárními cílovými úseky. Tyto cílové úseky jsou přitom vybrány tak, aby představovaly specifickou část genomu určitého taxonu, tudíž platí, co próba, to jiný taxon (Pernthaler et al. 2001).

Denaturační gradientová gelová elektroforéza

Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE) se používá k determinaci genetické diverzity mikrobiálního společenstva. Jedná se o moderní technologii, umožňující separaci molekul DNA v polyakrylamidovém gelu. Pomocí DGGE lze vygenerovat genetický profil neboli tzv. fingerprint zkoumaného společenstva.

Metoda je založena na rozdílné pohyblivosti fragmentů 16S rDNA v polyakrylamidovém gelu, jenž obsahuje lineárně se zvyšující gradient denaturantů. Prostřednictvím DGGE jsou tak na gelu tříděny fragmenty stejné délky, které se však liší v zastoupení jednotlivých nukleotidů. Fragmenty lišící se v zastoupení nukleotidů se tak zastaví na různých pozicích v gelu a vytvoří soustavu proužků (tzv. bandů), kdy počet vytvořených bandů představuje počet dominantních zástupců mikrobiálního společenstva. Vzniklé bandy mohou být poté z gelu vyříznuty a pomocí sekvenace tak můžeme zjistit detailní informace o jednotlivých druzích, které se ve společenstvu vyskytují (Fischer et Lerman 1979, Muyzer et al. 1993).

Měření enzymatické aktivity

K měření intenzity metabolických procesů jsme v této práci použili metody, založené na detekci aktivity buněčných enzymů (konkr. nescifických esteráz a dehydrogenáz). K detekci se využívají původně nefluoreskující substráty, u nichž po inkubaci se vzorkem vzniká fluoreskující produkt, detekovatelný mikroskopicky nebo spektrofotometricky. Konkrétně jsme ke stanovení podílu respirujících buněk / měření aktivity dehydrogenáz využili jako substrát tetrazoliové soli (CTC 5-cyano-2,3-ditolyltetrazolium-chlorid / INT 2-iodo-3-nitrotetrazolium-chlorid). K měření esterázové aktivity slouží jako substrát fluorescein diacetát (FDA). Množství vzniklého produktu (v případě INT a CTC formazánu, u FDA fluoresceinu) tak odpovídá intenzitě metabolické aktivity (Tóth 1993, Battin 1997).

SHRNUTÍ VÝSLEDKŮ

V první části této práce jsme se zabývali porovnáním mikrobiálního společenstva biofilmu se společenstvem volně žijících bakterií. Konkrétně jsme se zaměřili na biofilmy tekoucích vod, kolonizující povrchy sedimentu, kamenů, vodních makrofyt, kořenů ripariální vegetace a makroskopických agregátů vodního sloupce.

Pro srovnání jsme využili mikrobiálních parametrů, jako jsou celková abundance a biomasa, buněčný objem, enzymatická aktivita a fylogenetická struktura studovaných společenstev.

Co se fylogenetické struktury týče, potvrdili jsme přítomnost zástupců obou studovaných domén (*Bacteria*, *Archaea*) i podskupin proteobakterií (*Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*-, *Deltaproteobacteria*), jak pro všechna biofilmová společenstva, tak i pro volně žijící bakterie. Z kvantitativního hlediska byl říční kámen substrátem, u něhož bylo nejvyšší zastoupení téměř všech fylogenetických skupin, naopak celkově nejnižší relativní počty byly nalezeny u volně žijících bakterií.

Celková abundance a buněčná biomasa byly nejvyšší v biofilmu sedimentu a kořene; průměrně nejvyššího buněčného objemu dosáhlo biofilmové společenstvo kamene, zatímco nejnižší hodnoty byly detekovány v sedimentu.

Při studiu enzymatických aktivit vykazovalo nejvyšší aktivitu biofilmové společenstvo sedimentu a kamene a ve srovnání s mikroorganismy volné vody, byla aktivita v sedimentu mnohonásobně vyšší. Při porovnání velikostních frakcí sedimentu byla nejvyšší aktivita potvrzena u nejmenší frakce (<1 mm), stejně jako další studované parametry (celková abundance, biomasa, množství polysacharidů i abundance metanogenních archeí).

Ve druhé části práce jsme se zaměřili na detekci a identifikaci společenstva metanogenních archeí a metanotrofních bakterií ve dvou hloubkových frakcích hyporheického sedimentu (povrchová a hloubková frakce). Vzorky sedimentu byly odebrány na pěti lokalitách v podélném profilu malého nížinného toku. Kromě samotné detekce jsme studovali také další parametry společenstva, jako jsou enzymatická a metanotrofní aktivita, metanogenní potenciál a v neposlední řadě genetická diverzita metanogenních archeí.

Jak metanogenní archea, tak i metanotrofy byly detekovány na všech lokalitách a v obou zkoumaných hloubkových profilech sedimentu, přičemž s rostoucí hloubkou vykazovaly obě skupiny rostoucí podíl ve společenstvu. Naopak hodnoty ostatních

zkoumaných parametrů (enzymatická a metanotrofní aktivita, metanogenní potenciál) byly vyšší v povrchové vrstvě hyporheického sedimentu.

Z hlediska genetické diverzity jsme identifikovali mezi lokalitami 19 odlišných metanogenních taxonů. Získaná data byla dále analyzována pomocí shlukové analýzy, jež odhalila tři skupiny lokalit, lišící se množstvím dominantních taxonů. První skupinu tvořily lokality dolní části toku s výrazně vyšším počtem taxonů, další dvě skupiny lokalit (s nižším počtem taxonů) se nacházely v horním úseku toku. Jako nejbohatší se jevila lokalita č. 4 (v dolní části toku), na níž sekvenační analýza odhalila jeden ze dvou nalezených metanogenních rodů, patřícího do řádu *Methanomicrobiales*. Druhý zástupce metanogenních archeí byl nalezen také v dolní části toku (na lokalitě č. 5) a taxonomicky náleží do řádu *Methanosarcinales*.

ZÁVĚR

Výstupy této práce poskytují nové zajímavé informace o výskytu, struktuře a diverzitě biofilmových společenstev v tekoucích vodách. Zároveň ale potvrzují všeobecné předpoklady o rozdílnosti biofilmových a planktonních společenstev, přítomnosti a aktivitě mikroorganismů metanogenního cyklu v sedimentech tekoucích vod a jejich významu v koloběhu uhlíku.

Původní záměr, věnovat se v této disertační práci pouze tématice mikrobiálních biofilmů tekoucích vod, byl posléze rošířen také na problematiku mikrobiálních procesů, významných v procesu metanogeneze. Impulsem k této změně byla spoluúčast na výzkumném grantu GAČR „Biogeochemie metanu a detekce metanogenních a metanotrofních bakterií v říčních sedimentech“. Práce na tomto grantu vyústila nejen v rozšíření tématu této disertační práce, ale také k celkovému rozšíření znalostí v oblasti mikrobiálních procesů v ekosystémech tekoucích vod.

LITERATURA

- Amalfitano S, Fazi S (2008) Recovery and quantification of bacterial cells associated with streambed sediments. *J Microbiol Methods* 75: 237-243.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59: 143-169.
- Araya R, Tani K, Takagi T, Yamaguchi N, Nasu M (2003) Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis. *FEMS Microbiol Ecol* 43: 111-119.
- Arnon S, Marx LP, Searcy KE, Packman AI (2010) Effects of overlying velocity, particle size, and biofilm growth on stream - subsurface exchange of particles. *Hydrol Process* 24: 108-114.
- Azam F, Fenchel T, Field JG, Gray JS, Meyer-Reil LA, Thingstad F (1983) The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. *Mar Ecol Prog Ser* 10: 257-263.
- Baker MA, Dahm CN, Vallet HM (1999) Acetate retention and metabolism in the hyporheic zone of a mountain stream. *Limnol Oceanogr* 44: 1530-1539.
- Bapteste E, Brochier C, Boucher Y (2005) Higher-level classification of the Archaea: evolution of methanogenesis and methanogens. *Archaea* 1: 353-363.
- Baruch A, Jeffery DA, Bogyo M (2004) Enzyme activity – it's all about image. *Trends Cell Biol* 14: 29-35.
- Battin TJ (1997) Assessment of fluorescent diacetate hydrolysis as a measure of total esterase activity in natural stream sediment biofilms. *Sci Total Environ* 198: 51-60.
- Baudišová D, Mikeš J (2011) Biofilmy v čistírenství. In: Mikrobiální biofilmy (M Rulík et al.), pp. 234-239. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- Boenigk J (2004) A disintegration method for direct counting of bacteria in clay-dominated sediments: dissolving silicates and subsequent fluorescent staining of bacteria. *J Microbiol Methods* 56: 151-159.
- Boureau T, Jacques MA, Berruyer R, Dessaux Y, Dominguez H, Morris CE (2003) Comparison of the phenotypes and genotypes of biofilm and solitary epiphytic bacterial populations on broadleaved endive. *Microb Ecol* 47: 87-95.
- Bowman J (2006) The Methanotrophs - The Families Methylococcaceae and Methylocystaceae. In: The Prokaryotes, Vol. 5 (M Dworkin, ed.), pp. 266-289. Springer - Verlag, New York, USA.
- Bratbak G (1985) Bacterial biovolume and biomass estimations. *Appl Environ Microbiol* 49: 1488-1493.
- Bretschko G (1981) Vertical distribution of zoobenthos in an alpine brook of the Ritrodat-Lunz study area. *Verh Internat Verein Limnol* 21: 873-876.
- Bretschko G, Klemens WE (1986) Quantitative methods and aspects in the study of the interstitial fauna of running waters. *Stygologia* 2: 297-316.
- Carini S, LeClerc G, Joye SB (2005) Aerobic methane oxidation and methanotroph community composition during seasonal stratification in Mono Lake, California (USA). *Environ Microbiol* 7: 1127-1138.
- Chaban B, Ng SYM, Jarrell KF (2006) Archaeal habitats – from the extreme to the ordinary. *Can J Microbiol* 52: 73-116.
- Chróst RJ, Overbeck J (1990) Substrate ectoenzyme interaction: significance of β -glucosidase activity for glucose-metabolism by aquatic bacteria. *Arch Hydrobiol* 34: 93-98.

- Conrad R (1999) Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. *FEMS Microbiol Ecol* 28: 193-202.
- Conrad R (2007) Microbial ecology of methanogens and methanotrophs. *Adv Agron* 96: 1-63.
- Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ (1987) Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann Rev Microbiol* 41: 435-464.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-1322.
- Cottrell MT, Kirchman DL (2000) Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* 66: 5116-5122.
- Crump BC, Armbrust EV, Barros JA (1999) Phylogenetic analysis of particle attached bacteria and free-living bacterial communities in the Columbia river, its estuary and the adjacent coastal ocean. *Appl Environ Microbiol* 65: 3192-3204.
- Damgaard LR, Nielsen LP, Revsbech NP (2001) Methane microprofiles in a sewage biofilm determined with a microscale biosensor. *Wat Res* 35 (6): 1379-1386.
- De Beer D, Stoodley P, Lewandowski Z (1994) Liquid flow in heterogeneous biofilms. *Biotechnol Bioeng* 44: 636-641.
- Dobretsov S (2010) Marine Biofilms. In: Biofouling (S Durr, JC Thomason, eds.), pp. 123-136. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- Dolfing J (1988) Acetogenesis. In: Biology of Anaerobic Microorganisms (AJB Zehnder, ed.), pp. 417-468. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- Donlan RM (2001) Biofilm formation: a clinically relevant microbial process. *Clin Infect Dis* 33: 1387-1392.
- Donlan RM, Costerton JW (2002) Biofilms: Survival mechanism of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15:167-193.
- Dufour PH, Torr ton JP (1996) Bottom-up and top-down control of bacterioplankton from eutrophic to oligotrophic sites in the tropical northeastern Atlantic Ocean. *Deep- Sea Res I* 43: 1305-1320.
- Eggert SL, Wallace JB (2007) Wood biofilm as a food resource for stream detritivores. *Limnol Oceanogr* 52: 1239-1245.
- Fazi S, Amalfitano S, Pernthaler J, Puddu A (2005) Bacterial communities associated with benthic organic matter in headwater stream microhabitats. *Environ Microbiol* 10: 1633-1640.
- Ferry JG (1993) Fermentation of acetate. In: Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics (JG Ferry, ed.), pp. 304-334. Chapman & Hall, London, UK.
- Fey A, Claus P, Conrad R (2004) Temporal change of ¹³C isotope signatures and methanogenic pathways in rice field soil incubated anoxically at different temperatures. *Geochim Cosmochim Acta* 68: 293-306.
- Fiebig DM, Lock MA (1991) Immobilization of dissolved organic matter from groundwater discharging through the stream bed. *Freshwater Biol* 26: 45-55.
- Fischer SG, Lerman LS (1979) Length-independent separation of DNA restriction fragments in two dimensional gel electrophoresis. *Cell* 16: 191-200.
- Fischer H, Kloep F, Wilczek S, Pusch MT (2005) A river's liver - microbial processes within the hyporheic zone of a large lowland river. *Biogeochemistry* 76: 349-371.
- Fried J, Mayr G, Berger H, Traunspurger W, Psenner R, Lemmer H (2000) Monitoring protozoa and metazoa biofilm communities for assessing wastewater quality impact and reactor up-scaling effects. *Water Sci Technol* 41: 309-316.

- Froehner S, Machado KS, Dombroski LF, Nunes AC, Kishi RT, Bleninger T, Sanéz J (2012) Natural Biofilms in Freshwater Ecosystem: Indicators of the Presence of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Water Air Soil Pollut* 223: 3965-3973.
- Ganzert L, Jürgens G, Münster U, Wagner D (2006) Methanogenic communities in permafrost-affected soils of the Laptev Sea coast, Siberian Arctic, characterized by 16S rRNA gene fingerprints. *FEMS Microbiol Ecol* 59: 476-488.
- Garneau ME, Vincent WF, Terrado R, Lovejoy C (2009) Importance of particle-associated bacterial heterotrophy in a coastal Arctic ecosystem. *J Mar Syst* 75: 185-197.
- García JL (1990) Taxonomy and ecology of methanogens. *FEMS Microbiol Rev* 87: 297-308.
- García JL, Patel BKC, Ollivier B (2000) Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe* 6: 205-226.
- Giorgio PA, Williams PB (2005) Respiration in aquatic ecosystems. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Griebler C, Mindl B, Slezak D (2001) Combining DAPI and SYBR Green II for the enumeration of total bacterial numbers in aquatic sediments. *Internat Rev Hydrobiol* 86: 453-465.
- Grossart HP, Ploug H (2000) Bacterial production and growth efficiencies: direct measurement on riverine aggregates. *Limnol Oceanogr* 45: 436-445.
- Hanson RS, Hanson TE (1996) Methanotrophic bacteria. *Microbiol Rev* 60: 439-471.
- Haglund AL, Lantz P, Tornblom E, Tranvik L (2003) Depth distribution of active bacteria and bacterial activity in lake sediment. *FEMS Microbiol Ecol* 46: 31-38.
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2: 95-108.
- Hempel M, Blume M, Blindow I, Gross EM (2008) Epiphytic bacterial community composition on two common submerged macrophytes in brackish water and freshwater. *Microbiology* 8: 1-10.
- Henckel T, Friedrich M, Conrad R (1999) Molecular analyses of the methane-oxidizing microbial community in rice field soil by targeting the genes of the 16 S rRNA, particulate methane mono-oxygenase, and methanol dehydrogenase. *Appl Environ Microbiol* 65: 1980-1990.
- Hendricks SP (1993) Microbial ecology of the hyporheic zone: a perspective integrating hydrology and biology. *J N Am Benthol Soc* 12: 70-78.
- Hlaváčová E, Rulík M, Čáp L (2005) Anaerobic microbial metabolism in hyporheic sediment of a gravel bar in a small lowland stream. *River Res Appl* 21: 1003-1011.
- Hlaváčová E, Rulík M, Čáp L, Mach V (2006) Greenhouse gases (CO₂, CH₄, N₂O) emissions to the atmosphere from a small lowland stream. *Arch Hydrobiol* 165: 339-353.
- Holá V, Růžička F (2011) Význam biofilmu v medicíně. In: Mikrobiální biofilmy (M Rulík et al.), pp. 57-62. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- Holmes RM, Fisher SG, Grimm NB (1994) Parafluvial nitrogen dynamics in a desert stream ecosystem. *J N Am Benthol Soc* 13: 468-478.
- Hornibrook ERC, Longstaffe FJ, Fyfe WS (2000) Evolution of stable carbon isotope compositions for methane and carbon dioxide in freshwater wetlands and other anaerobic environments *Geochim Cosmochim Acta* 64: 1013-1027.
- Johnson LR (2008) Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria. *J Theor Biol* 251: 24-34.
- Jones JB, Holmes RM (1996) Surface-subsurface interactions in stream ecosystems. *TREE* 11: 239-242.

- Jones PR, Cottrell M, Kirchman DL, Dexter SC (2006) Bacterial community structure of biofilms on artificial surfaces in an estuary. *Microb Ecol* 53:153-162.
- Juretschko S, Fritsche TR (2011) Application of Fluorescence In Situ Hybridization in Diagnostic Microbiology. In: Molecular microbiology – Diagnostic Principles and Practice, 2nd edition (DH Persing et al., eds.), pp. 3-20. ASM Press, Washington, USA.
- Kallistova AY, Kevbrina MV, Nekrasova VK, Shnyrev NA, Einola JKM, Kulomaa MS et al. (2007) Enumeration of methanotrophic bacteria in the cover soil of an aged municipal landfill. *Microb Ecol* 54: 637-645.
- Kobabe S, Wagner D, Pfeifer EM (2004) Characterisation of microbial community composition of a Siberian tundra soil by fluorescence in situ hybridization. *FEMS Microbiol Ecol* 50: 13-23.
- Korber DR, Lawrence JR, Lappin-Scott HM, Costerton JV (1995) Growth of microorganisms on surfaces. In: Microbial biofilms (HM Lappin-Scott & JV Costerton, eds.) pp. 15-45. Cambridge University Press, Cambridge UK.
- Leichtfried M (1985) Organic matter in gravel stream (Project Ritrodat-Lunz). *Verh Internat Verein Limnol* 22: 2058-2062.
- Lens PN, De Poorter MP, Cronenberg CC, Verstraete WH (1994) Sulfate reducing and methane producing bacteria in aerobic wastewater treatment systems *Wat Res* 29 (3): 871-880.
- Lettinga G (1995) Anaerobic digestion and wastewater treatment systems. *Antonie Van Leeuwenhoek* 67 (1): 3–28.
- Lin C, Raskin L, Stahl DA (1997) Microbial community structure in gastrointestinal tracts of domestic animals: comparative analyzes using rRNA-targeted oligonucleotide probes. *FEMS Microbiol Ecol* 22: 281-294.
- Ling SC, Alldredge AL (2003) Does the marine copepod *Calanus pacificus* consume transparent exopolymer particles (TEP)? *J Plankton Res* 25: 507-515.
- Lock MA, Wallace RR, Costerton JW, Ventullo RM, Charlton SE (1984) River epilithon: toward a structural-functional model. *Oikos* 42: 10-22.
- Lock MA (1994) Attached microbial communities in rivers. In: Aquatic microbiology - an ecological approach (TE Ford, ed.), pp 113-138. Blackwell, Oxford, UK.
- McHugh S, Collins G, O'Flaherty V (2006) Long-term, high-rate anaerobic biological treatment of whey wastewaters at psychrophilic temperatures. *Bioresour Technol* 97: 1669-1678.
- McKeown RM, Scully C, Enright AM, Chinalia FA, Lee C, Mahony T, Collins G, O'Flaherty V (2009) Psychrophilic methanogenic community development during long-term cultivation of anaerobic granular biofilms. *The ISME Journal* 3: 1231-1242.
- Meyer JL (1994) The microbial loop in flowing waters. *Microb Ecol* 28 (2): 195-199.
- Mickelburg S, Lock MA, Ford TE (1984) Spatial uptake of dissolved organic carbon in river beds. *Hydrobiologia* 108: 115-119.
- Morrice JA, Dahm CN, Valett HM, Unnikrishna P, Campana ME (2000) Terminal electron accepting processes in the alluvial sediments of a headwater stream. *J N Am Bethol Soc* 19: 593-608.
- Mueller RF, Characklis WG, Jones WL, Sears JT (1992) Characterization of initial events in bacterial surface colonization by two *Pseudomonas* species using image analysis. *Biotechnol Bioeng* 39: 1161-1170.
- Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59 (3): 695-700.

- Muyzer G, Smalla K (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 127-141.
- Neu TR (1996) Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol Rev* 60: 151-166.
- Neu TR, Lawrence JR (1997) Development and structure of microbial biofilms in river water studied by confocal scanning microscopy. *FEMS Microbiol Ecol* 24: 11-25.
- Neufeld JD, Mohn WW (2006) Assessment of Microbial Phylogenetic Diversity Based on Environmental Nucleic Acids. In: Molecular Identification, Systematics, and Population Structure of Prokaryotes (E Stackebrandt, ed.), pp. 219-259. Springer, Brunschweig, Germany.
- Norland S (1993) The relationship between biomass and volume of bacteria. In: Handbook of methods in aquatic microbial ecology (PF Kemp, BF Sherr, EB Sherr, JJ Cole, eds.), pp 303-307. Lewis Publishers, New Jersey, USA.
- Overmeire A, Lens P, Verstraete W (1994) Mass Transfer Limitation of Sulfate in Methanogenic Aggregates. *Biotechnol Bioeng* 44: 387-391.
- Paerl HV, Pinckney JL (1996) A minireview of microbial consortia: their roles in aquatic production and biogeochemical cycling. *Microb Ecol* 31: 225-247.
- Pernthaler J, Glöckner FO, Schönhuber W, Amann RI (2001) Fluorescence in situ hybridization. In: Methods in microbiology-marine microbiology (J Paul, ed.), vol. 30. Academic Press Ltd, London, UK.
- Pohlson E, Marxsen J, Kusel K (2010) Pioneering bacterial and algal communities and potential extracellular enzyme activities of stream biofilms. *FEMS Microbiol Ecol* 71: 364-373.
- Porter KG, Feig YS (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol Oceanogr* 25: 943-948.
- Pusch M (1996) The metabolism of organic matter in the hyporheic zone of a mountain stream, and its spatial distribution. *Hydrobiologia* 323: 107-118.
- Rickwood D, Ford T, Graham J (1982) Nycodenz: A new nonionic iodinated gradient medium. *Anal Biochem* 123: 23-31.
- Rittmann BE, Snoeyink VL (1984) Achieving biologically stable drinking water. *JAWWA* 76 (10): 106-114.
- Romaní AM, Giorgi A, Acuna V, Sabater S (2004) The influence of substratum type and nutrient supply on biofilm organic matter utilization in streams. *Limnol Oceanogr* 49: 1713-1721.
- Romaní AM (2010) Freshwater biofilms. In: Biofouling (S Durr & JC Thomason, eds.), pp. 137-153. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- Rulík M, Holá V, Růžička F, Votava M et al. (2011) Mikrobiální biofilmy. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- Rulík M, Holá V (2012) Mikrobiální biofilmy – Všudypřítomný a přitom málo známý fenomén. *Živa* 3: 104-106.
- Rulík M (2012) Mikrobiální biofilmy – Vodní prostředí. *Živa* 5: 220-223.
- Sanders IA, Heppell CM, Cotton JA, Wharton G, Hildrew AG, Flowers EJ, Trimmer M (2007) Emissions of methane from chalk streams has potential implications for agricultural practices. *Freshw Biol* 52: 1176-1186.
- Santmire JA, Leff LG (2007) The influence of stream sediment particle size on bacterial abundance and community composition. *Aquat Ecol* 41: 153-160
- Schindler JE, Krabbenhoft DP (1998) The hyporheic 1 zone as a source of dissolved organic carbon and carbon gases to a temperate forested stream. *Biogeochemistry* 43: 157-174.

- Schulz S, Matsuyama H, Conrad R (1997) Temperature dependence of methane production from different precursors in a profundal sediment (Lake Constance). *FEMS Microbiol Ecol* 22: 207-213.
- Shiraishi F., Zippel B., Neu TR, Arp, G (2008) In situ detection of bacteria in calcified biofilms using FISH and CARD - FISH. *J Microbiol Methods* 75: 103-108.
- Semrau JD, Dispirito AA, Yoon S (2010) Methanotrophs and copper. *FEMS Microbiol Rev* 34: 496-531.
- Sobczak WV (1996) Epilithic bacterial responses to variations in algal biomass and labile dissolved organic carbon in water. *J North Am Benthol Soc* 15: 143-154.
- Storey RG, Fulthorpe RR, Williams DD (1999) Perspectives and predictions on the microbial ecology of the hyporheic zone. *Freshwat Biol* 41: 119-130.
- Strous M, Jetten MSM (2004) Anaerobic oxidation of methane and ammonium. *Annu Rev Microbiol* 58: 99-117.
- Tabatabaei M, Zakaria MR, Rahim RA, Wright ADG, Shirai Y, Abdullah N et al. (2009) PCR-based DGGE and FISH analysis of methanogens in an anaerobic closed digester tank for treating palm oil mill effluent. *Electron J Biotechnol* 12 (3): 1-12.
- Thelaus J, Haecky P, Forsman M, Andersson A (2008) Predation pressure on bacteria increases along aquatic productivity gradients. *Aquat Microb Ecol* 52: 45-55.
- Tóth LG (1993) Measurement of the terminal electron transport system (ETS) activity of the plankton and sediment – International Training Course. Balaton Limnological Res. Inst. of the Hong. Acad. Sci. Hungary
- Triska FJ, Duff JH, Avanzino RJ (1993) Patterns of hydrological exchange and nutrient transformation in the hyporheic zone of a gravel-bottom stream: examining terrestrial-aquatic linkages. *Freshw Biology* 29: 259-274.
- Trotsenko YA, Khmelenina VN (2005) Aerobic methanotrophic bacteria of cold ecosystems. *FEMS Microbiol Ecol* 53: 15-26.
- Van Horn DJ, Sinsabaugh RL, Takacs-Vesbach CD, Mitchell KR, Dahm CN (2011) Response of heterotrophic stream biofilm communities to a gradient of resources. *Aquat Microb Ecol* 64: 149-161.
- Watanabe T, Kimura M, Asakawa S (2006) Community structure of methanogenic archaea in paddy field soil under double cropping (rice–wheat). *Soil Biol Biochem* 38: 1264-1274.
- Whalen SC, Reeburgh WS, Reimers CE (1996) Control of tundra methane emission by microbial oxidation In: Landscape Function: Implication for Ecosystem Response to Disturbance, a Case Study in Arctic Tundra (JF Reynolds & JD Tenhunen, eds.), pp. 257-274. Springer Verlag, Berlin.
- White DS (1993) Perspectives on defining and delineating hyporheic zone. *J N Am Benthol Soc* 12 (1): 61-69.
- Whiteley AS, Griffiths RI, Bailey MJ (2003) Analysis of the microbial functional diversity within water stressed soil communities by flow cytometric analysis and CTC+ cell sorting. *J Microbiol Methods* 54: 257-267.
- Wilcock RJ, Sorrell BK (2008) Emissions of greenhouse gases CH₄ and N₂O from low gradient streams in agriculturally developed catchments. *Water Air Soil Poll* 188: 155-170.
- Wong JCI, Williams DD (2010) Sources and seasonal patterns of dissolved organic matter (DOM) in the hyporheic zone. *Hydrobiologia* 647: 99-111.
- Zubkov MV, Sleigh MA (2000) Comparison of growth efficiencies of protozoa growing on bacteria on surfaces and in suspension. *J Eukaryot Microbiol* 47: 62-69.

I. The phylogenetic structure of microbial biofilms and free-living bacteria in a small stream

Lenka Brablcová, Iva Buriánková, Pavlína Badurová, Martin Rulík

(Folia Microbiol, in press)

The phylogenetic structure of microbial biofilms and free-living bacteria in a small stream

Lenka Brablcová · Iva Buriánková · Pavlína Badurová · Martin Rulík

Received: 7 November 2011 / Accepted: 5 October 2012
© Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i. 2012

Abstract The phylogenetic composition, bacterial biomass, and biovolume of both planktonic and biofilm communities were studied in a low-order Bystřice stream near Olomouc City, in the Czech Republic. The aim of the study was to compare the microbial communities colonizing different biofilm substrata (stream aggregates, stream sediment, underwater tree roots, stream stones, and aquatic macrophytes) to those of free-living bacteria. The phylogenetic composition was analyzed using fluorescence in situ hybridization for main phylogenetic groups. All phylogenetic groups studied were detected in all sample types. The stream stone was the substratum where nearly all phylogenetic groups were the most abundant, while the lowest proportion to the DAPI-stained cells was found for free-living bacteria. The probe specific for the domain *Bacteria* detected 20.6 to 45.8 % of DAPI-stained cells while the probe specific for the domain *Archaea* detected 4.3 to 17.9 %. The most abundant group of *Proteobacteria* was *Alphaproteobacteria* with a mean of 14.2 %, and the least abundant was *Betaproteobacteria* with a mean of 11.4 %. The average value of the *Cytophaga–Flavobacteria* group was 10.5 %. Total cell numbers and bacterial biomass were highest in sediment and root biofilm. The value of cell biovolume was highest in stone biofilm and lowest in sediment. Overall, this study revealed relevant differences in phylogenetic composition, bacterial biomass, and biovolume between different stream biofilms and free-living bacteria.

L. Brablcová (✉) · I. Buriánková · P. Badurová · M. Rulík
Laboratory of Aquatic Microbial Ecology, Department of Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Science, Palacký University,
Šlechtitelů 11,
783 71, Olomouc, Czech Republic
e-mail: formicula@email.cz

Abbreviations

FLB	Free-living bacteria
AGR	Macroscopic stream aggregates
SED	Stream sediment
STN	Stream stone
ROT	Riparian underwater roots
PLT	Water buttercup leaves
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole, fluorescent dye
Cy3	Indocarbocyanine fluorescent dye
FISH	Fluorescence in situ hybridization

Introduction

Microbial biofilms, i.e., assemblages of bacteria, archaea, fungi, algae, and protozoans, are formed in rivers on submerged surfaces such as stones, plants, roots, and also macroscopic aggregates (Zubkov and Sleigh 2000; Grossart and Ploug 2000). The biofilm matrix allows for the storage of nutrients and extracellular enzymes (Lock 1994), and thus, biofilms are considered to be hot spots for the turnover of organic matter and the transfer of carbon to higher organism groups in small streams (Augsburger et al. 2008). Biofilms may also offer protection from naturally occurring stresses as well as from pathogenic agents (Boureau et al. 2003).

Only a part of microbial life, however, is associated with biofilms: the remainder exists as solitary or non-aggregated cells. For this reason, as a first step in understanding the impact of biofilms on the ecology of bacteria, it is important to determine whether there are differences in types of bacteria within biofilms compared to those outside (Boureau et al. 2003). One of the available biofilm substrata is the macroscopic aggregate. Macroscopic aggregates are known to be preferential sites of microbial colonization in aquatic

systems (Grossart and Ploug 2000). The community structure of bacteria attached to particle detritus (aggregate) differs from that of free-living bacteria. Bacteria attached to particles are more important for the degradation and subsequent recycling of carbon and nutrients than free-living bacteria (Jones et al. 2006).

Other available biofilm substrata are in most cases, rocks, cobbles, sand, and wood which coexist in stream reaches, and all of these substrata host biofilms with differing structural characteristics (Lock 1994). Golladay and Sinsabaugh (1991) suggested that wood biofilms (epixylon) might be overlooked sites of metabolic activity in streams. Since leaves break down at a faster rate in streams, wood serves as a long-lasting substrate for biofilm development. Given the high microbial activity associated with wood biofilms, epixylon probably serves as a high-quality food source for invertebrates. Rocks are common substrata at the edge of lakes where they are kept free from fine sediment by waves and ice scour and are physically stable relative to unconsolidated sediment or macrophytes (Vadeboncouer and Lodge 2000).

Microbial colonization of stones depends on environmental factors, such as water availability and nutrient sources, and on petrologic parameters, such as mineral composition, as well as the porosity and permeability of the material (Arino and Saiz-Jimenez 1996). Within sediments, there is often a heterogeneous mixture of particles of different sizes, origins, and surface features. These differences potentially impact the number of bacteria as well as the composition of the bacterial community (Eisenmann et al. 1999).

Biofilms are not only formed on abiotic surfaces but also on living organisms such as aquatic plants and algae. In contrast to algae, information on bacterial biofilms on aquatic macrophytes is rather scarce. Biofilms can be both beneficial and detrimental to submerged macrophytes. On the positive side, epiphytic biofilms provide organic compounds and carbon dioxide to the macrophytes and enhance nutrient recycling. Negative impacts on submerged macrophytes could arise from increased shading by thick biofilms and possibly also from pathogenic bacteria present in the biofilm (Hempel et al. 2008).

In this study, we compare the microbial communities of five different biofilm substrata to those of free-living bacteria (FLB). These substrata are macroscopic aggregates (AGR), stream sediment (SED), riparian underwater alder (*Alnus glutinosa*) roots (ROT), bottom stream round stones (STN), and water buttercup (aquatic macrophyte *Batrachium aquatile*) leaves (PLT). We focused on characteristics such as total cell numbers (TCNs), bacterial biomass and biovolume, and phylogenetic structure by fluorescence in situ hybridization (FISH). FISH is a powerful technique for detecting and identifying bacteria and

archaea in situ in environmental samples. It has been applied to various types of sample, including environmental biofilms (Shiraishi et al. 2008). In FISH, taxon-specific oligonucleotide probes that target the rRNA of cells are used to differentiate among cells of different taxa. Specifically, we enumerated members of the domains *Bacteria* and *Archaea*; the *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*-, and *Deltaproteobacteria*; and the *Cytophaga-Flavobacteria* groups.

The biomass and abundance of bacterial populations are recognized as an important parameter when studying microbial ecology. These parameters are used to determine the quantity of microorganisms (Bratbak 1985). Several approaches have been used to determine bacterial biomass in natural aquatic ecosystems. In this study, we assessed bacterial abundance and biomass by direct microscopic methods.

Materials and methods

Study site and sampling

The sampling site is located on the second-order Bystřice stream (49°44'N, 17°26'E), near Olomouc City, in the Czech Republic. The Bystřice is an undisturbed 53.9-km-long stream originating in the Nížký Jeseník mountains at 600 m above sea level, and it becomes confluent with the Morava river in Olomouc (212 m above sea level). The catchment area is 267.4 km². The geology is composed mainly of lower carboniferous flysch with a preponderance of shale and graywack. The mean annual discharge is 1.88 m³/s. The Bystřice stream is unregulated with well-established riparian vegetation. The sampling site is located in the Natural Park Údolí Bystřice, where the stream has created a deep rocky valley with canyons overgrown with high-quality old-growth forest.

Six types of environmental samples (sediment, submerged tree roots, aquatic macrophytes, round stones, river aggregates, and free-living bacteria) were taken from 40 m stream reach in the autumn of 2008. At the sampling site, the stream was 4 m wide and approximately 0.3–0.4 m deep. Sampling and measurements were done during the normal discharge levels (i.e., no spates or high flood levels were included). Generally, six subsamples were taken from all environments studied.

Sediment samples and round stones averaging 30 mm in diameter were randomly collected from the uppermost sediment layer. Riparian underwater alder roots (*A. glutinosa*) <50 mm in diameter were cut from different trees, and submerged leaves from different living stands of water buttercup (aquatic macrophyte *B. aquatile*) were also collected. Surface water was collected at a depth of 0.1 m below the surface level into six previously acid-washed borosilicate glass bottles (1.5 L volume each).

Sample preparation

The collected samples of sediment, submerged tree roots, aquatic macrophytes, round stones, and stream water were immediately transferred to the laboratory. Sediment samples were sieved (pore size, 1 mm) to exclude large gravel, and only a fraction <1 mm was used for subsequent analysis. The roots were cut into small pieces (10 mm in length). A total of 9 L of stream water (1.5 L for one subsample) was filtered through 2- μ m pore size polycarbonate filters to separate river aggregates (onto the filter) and free-living bacteria (into filtered water). All samples were then fixed with formaldehyde (2 % final conc.)

To remove cells from the substrata, all samples, except for filtered water, were incubated for 3 h under mild agitation with detergent mixture (Tween 20 0.5 %, v/v, 0.1 mol/L tetrasodium pyrophosphate, and distilled water), followed by sonication for 3 \times 30 s at 15 % power (sonotrode MS 73, Sonopuls HD2200, Sonorex, Germany) and density centrifugation (protocol by Amalfitano and Fazi 2008). For density centrifugation, 2 mL of the non-ionic medium Nycodenz (1.31 g/mL; Axis-Shield, Norway) was placed underneath 4 mL of sample (incubated and sonicated cell suspension) using a syringe needle and then centrifuged at 3,000 \times g for 1 h (Rotofix 32A, Hettich, Germany). After the centrifugation, 2 mL of supernatants was taken for subsequent analysis.

Additional purification of cells by a combination of sonication and detergent treatment, followed by density gradient centrifugation, is often recommended for soil, sediment, or biofilm samples (Amalfitano and Fazi 2008; Whiteley et al. 2003). Even if the total cell numbers could be slightly underestimated, sonication and density centrifugation are techniques still powerful enough to enable comparison between equally treated samples (Griffiths et al. 2003; Bjerkan et al. 2009). Further, checking of direct microscopic cell counts after sonication showed that efficiency of the sonication reached up to 85–90 % (as shown in our previous experiments). Direct counting of bacteria in sediment is limited due to masking of bacteria by sediment particles. Density centrifugation results in the separation of bacteria from sediment particles and improves the purity of cell suspensions (Boenigk 2004; Fazi et al. 2005).

Measurement of physicochemical parameters

Sediment organic matter content was determined by oven-drying at 105 °C and subsequent combustion at 550 °C for 5 h. Organic matter values were then converted to carbon equivalents and expressed in percentage (protocol by Meyer et al. 1981). Nitrate (NO₃⁻) and phosphate (PO₄³⁻) concentrations were measured spectrophotometrically (DR-2000, Hach-Lange, Germany). Running water temperature,

dissolved oxygen saturation, conductivity, and pH were measured directly in the field with a portable Hanna HI 9828 pH/ORP/EC/DO multimeter (Fischer Scientific, USA) (Table 1).

Direct counts and biomass measurement

The supernatants and filtered water were filtered onto 0.22- μ m polycarbonate membrane filters (GTTP; Millipore, France). Filters were then cut into sections and stained for 10 min with DAPI solution (6.3 mg/mL, w/v; Sigma, Germany) in a dark, cold place (protocol by Porter and Feig 1980). After staining, the samples were rinsed in distilled water and 80 % ethanol, air-dried, mounted onto slides, and counted on an epifluorescence microscope (Olympus BX 60, \times 1,000 magnification, Olympus Corporation, Japan) equipped with a camera (Olympus DP 12). A total of 400 bacterial cells were counted on at least 20 fields in six subsamples for each substratum. As it was impossible to provide the same unit for all studied samples, we used volume unit for filtered water, aggregates, and sediment and area unit for stones, roots, and macrophytes. TCNs were expressed per milliliter or square centimeter (depending on type of substratum).

The area of tree roots and macrophytes was estimated via scanning, and images were then analyzed by image analysis software (NIS Elements, Laboratory Imaging, Prague, Czech Republic). The stone surface area was estimated by the “aluminum foil method” (Lamberti et al. 1991). Cell volumes were evaluated via images taken with the camera (Bertoni et al. 2010). A total of 400 bacterial cells were measured. Proportions of the cells (length, width, area, etc.) were measured and analyzed using image analysis software (NIS Elements). For the evaluation of bacterial biomass, cell volume was converted into carbon content using allometric model: $m = 120 \times V^{0.72}$, where m is biomass, 120 is the conversion factor between biomass and volume, V is bacterial volume (in cubic micrometers), and 0.72 is a scaling factor (protocol by Norland 1993; modified after Simon and Azam

Table 1 Selected physicochemical parameters of the sampling site

Variable	
Stream water temperature [°C]	9.90
Dissolved O ₂ content [mg/L]	9.50
Nitrate—NO ₃ ⁻ [mg/L]	0.15
Phosphate—PO ₄ ³⁻ [mg/L]	0.14
Conductivity [μ S/cm]	186.50
pH	6.62
Organic carbon concentration—sediment <1 mm [%]	1.14

Values are means ($n=2$)

1989). The biomass was expressed as micrograms of carbon per liter or square centimeter.

Fluorescence in situ hybridization

We used indocarbocyanine dye Cy3-labeled oligonucleotide probes EUB338 (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') for the domain *Bacteria* (Amann et al. 1990b) and ARCH915 (5'-GTGCTCCCCCGCCAATTCCT-3') for the domain *Archaea* (Raskin et al. 1994). ALF1B (5'-CGTTCGYTCTGAGCCAG-3'), BET42a (5'-GCCTTCCCCTTCGTTT-3'), GAM42a (5'-GCCTTCCCCTTCGTTT-3'), and DELTA495a (5'-AGTTAGCCGGTGCTTCCT-3') probes were used for *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*-, and *Deltaproteobacteria* groups (Manz et al. 1992; Lucker et al. 2002) and CF319a+b (5'-TGGTCCGTRTCTCAGTAC-3') for *Cytophaga-Flavobacteria* (Manz et al. 1996). The cells were hybridized according to the protocol described by Pernthaler et al. (2001). The supernatants and filtered water which were also used for direct counts were filtered onto polycarbonate membrane filters (0.22 μm GTTP; Millipore, France). The filters were then cut into sections and placed on glass slides. For the hybridization mixtures, 2 μL of probe-working solution was added to 16 μL of hybridization buffer in a microtube. Hybridization mix was added to the samples, and the slides with filter sections were incubated at 46 $^{\circ}\text{C}$ for 3 h. After incubation, the sections were transferred into preheated washing buffer (48 $^{\circ}\text{C}$) and incubated for 15 min in a water bath at the same temperature. The filter sections were washed and air-dried. The DAPI staining procedure was carried out as previously described. Finally, the samples were mounted in a 4:1 mix of Citifluor and Vecta Shield. The relative proportion of bacteria and archaea to the total number of DAPI-stained cells was calculated.

Statistics

One-way ANOVA was used to compare TCNs, biovolume, and bacterial biomass of different substrata. Owing to

different units (area vs volume), in the case of TCNs and bacterial biomass, SED, AGR, and FLB were grouped, while ROT, PLT, and STN were analyzed separately. All tests were considered significant at $p < 0.05$. Data analyses were performed using the NCSS 6.0 software (Hintze 2007).

Results and discussion

Total cell numbers

The TCNs dominated in sediment biofilm (SED) where the average value was 21.03×10^6 cells/mL wet sediment, while significantly different abundance was estimated for bacteria attached to aggregates (AGR) 0.05×10^6 cells/mL ($p < 0.05$). For substrata with area units (in square centimeters), there was a significant difference between TCNs found in root biofilm (ROT— 7.10×10^6 cells/cm²) and plant biofilm (PLT— 1.29×10^6 cells/cm²; $p < 0.05$) (Table 2).

As was expected, cell abundance for substrata with volume unit was found to be highest in SED. Our prediction is supported by studies of Fischer et al. (2002) and Haglund et al. (2003). These authors suggest that sediment bacteria constitute an important component of the benthic food web as well as of nutrient cycling and the decomposition of organic matter. Sediment organic matter content thus can be an important indicator of high bacterial abundance.

Simon et al. (2002) suggested that bacteria on marine snow aggregates are several orders of magnitude more abundant than those in the surrounding water. For this reason, we would expect higher cell numbers for AGR. However, we found higher cell numbers for FLB than for AGR. The lower cell numbers for AGR can probably be explained by the rocky bottom stream character which can limit the number of riverine aggregates and thus the number of bacterial cells which are attached to these aggregates. Crump et al. (1999), who studied FLB and AGR in the Columbia River estuary, reported similar values to our study. Bertoni et al. (2010) found slightly higher values in Lake Maggiore than in our study.

Table 2 The values of total cell numbers, bacterial biomass, and biovolume per unit of volume or area for five different substrata and free-living bacteria

	FLB	AGR	SED	STN	ROT	PLT
TCNs ^a $\times 10^6$	2.42 \pm 0.82	0.05 \pm 0.01	21.03 \pm 1.36	2.54 \pm 0.23	7.10 \pm 3.66	1.29 \pm 0.14
Bacterial biomass ^b	67.25 \pm 12.36	1.56 \pm 0.19	512.30 \pm 65.92	0.09 \pm 0.04	0.22 \pm 0.02	0.04 \pm 0.01
Bacterial biovolume ^c	0.14 \pm 0.12	0.17 \pm 0.16	0.12 \pm 0.08	0.22 \pm 0.17	0.17 \pm 0.13	0.16 \pm 0.17

Values are means ($n=6$) \pm SD

^aTotal cell numbers per milliliter for FLB, AGR, and SED and per square centimeter for STN, ROT, and PLT

^bUnits are micrograms of carbon per liter for FLB, AGR, and SED and micrograms of carbon per square centimeter for STN, ROT, and PLT

^cUnits are cubic micrometers per cell

Nunan et al. (2005) and Dakora and Philips (2002) suggest that plants are likely to be a major factor influencing bacterial communities through, for example, root exudation. The composition of the root exudates often ranges from mucilage, root border cells, extracellular enzymes, simple and complex sugars, vitamins, and amino and organic acids and can serve as nutrient elements for microbial communities. Similarly, the leaves offer optimal conditions for microbial growth due to their ability to secrete mucilage and a diversity of chemical compounds including simple sugars and proteins (Morris and Monier 2003). Thus, in our study, we could assume high cell numbers for both ROT and PLT. Indeed, a relatively high value of bacterial abundance was found in ROT, but the abundance in PLT was lower than assumed (Table 2). However, we are aware that the PLT biofilm in our study cannot represent the biofilms formed on all kinds of plant surfaces.

Root biofilm studies are very scarce, particularly for tree roots. For wood biofilm, there is a comparable study by Eggert and Wallace (2007) who studied biofilm on small wooden sticks in a first-order stream in North Carolina and found slightly higher values than in our study. Kang and Goulder (1996), who studied the biofilm on *Callitriche* sp. and *Elodea canadensis* leaves in a small stream in North-East England, found an order of magnitude higher abundance than values for the PLT (*B. aquatile*) in our study.

We expected that the lowest value of microbial abundance would occur in STN because stone is assumed to be a nutrient-poor surface. Surprisingly, the least abundant substrate was PLT. Stone biofilm was studied, for example, by Romani et al. (2004) in northeast Spain (values two orders of magnitude higher than in our study), and another stone biofilm study was presented by Olapade et al. (2006), who studied cobbles in biofilm in the Mahoning River, USA (similar values as our study).

Bacterial biovolume and biomass

The proportion of cell biovolume ranged from 0.01 to 3.0 μm^3 , and the most abundant size class was 0.1–0.3 μm^3 per cell (Fig. 1). The mean biovolume of bacterial cells in studied biofilms was 0.16 μm^3 . The value of bacterial biovolume in stone biofilm (STN) was significantly different from that in the sediment (SED) biofilm ($p < 0.05$) (Table 2).

For the substrata with volume units, a significantly different value of bacterial biomass was found for SED (512.30 $\mu\text{gC/L}$) compared to the value from AGR (1.56 $\mu\text{gC/L}$) ($p < 0.05$). Among substrata where TCNs were calculated per area unit, a significantly different value of bacterial biomass was estimated in the ROT biofilm (0.22 $\mu\text{gC/cm}^2$) than in the PLT biofilm (0.04 $\mu\text{gC/cm}^2$; $p < 0.05$) (Table 2).

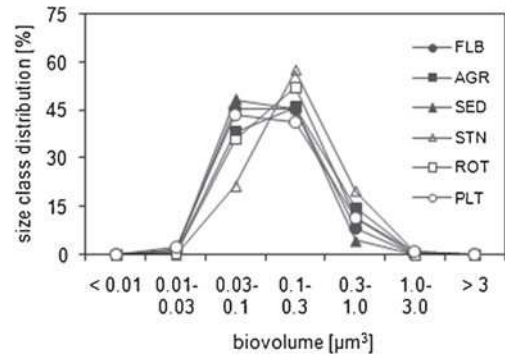


Fig. 1 Percentage size class distribution of cell biovolume for six different samples

The relatively low value of cell biovolume found in sediment biofilm is rather surprising. We expected the lowest cell volume for FLB, because FLB are considered to have worse nutrient conditions than bacteria in a biofilm matrix (Schweitzer et al. 2001). Nevertheless, the values of cell biovolume measured in sediment are not in conflict with other studies. For example Koutný and Rulík (2007) estimated similar values of cell biovolume in sediment biofilm of a Sitka stream in Czech Republic. Generally, the cell biovolume values in our study are not in contrast with other studies. Similar values were measured by Buesing and Gessner (2002), Bertoni et al. (2010), and Eggert and Wallace (2007).

Biomass is commonly derived from biovolume and cell number estimates (Buesing and Gessner 2002). Thus, it was not surprising that the highest values of bacterial biomass were found in SED and ROT (samples with the highest cell numbers; Table 2). Similar biomass values were estimated by Eggert and Wallace (2007) who studied biofilm on small wooden sticks in North Carolina. The value of C content for FLB was an order of magnitude lower than the values measured by Chrost et al. (2000) in the eutrophic Mazurian lake.

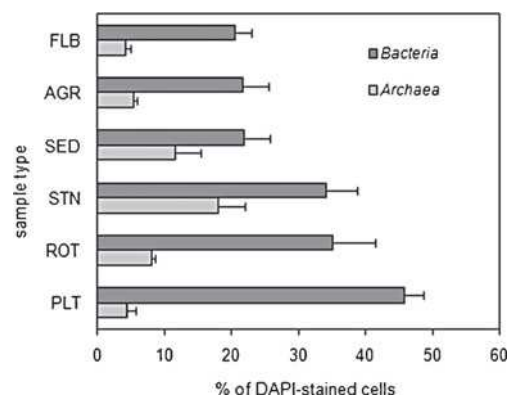


Fig. 2 The relative percentage proportion of the domains *Bacteria* and *Archaea* to DAPI-stained cells in all studied samples detected with EUB338 and ARCH915 probes. Error bars give the standard deviation

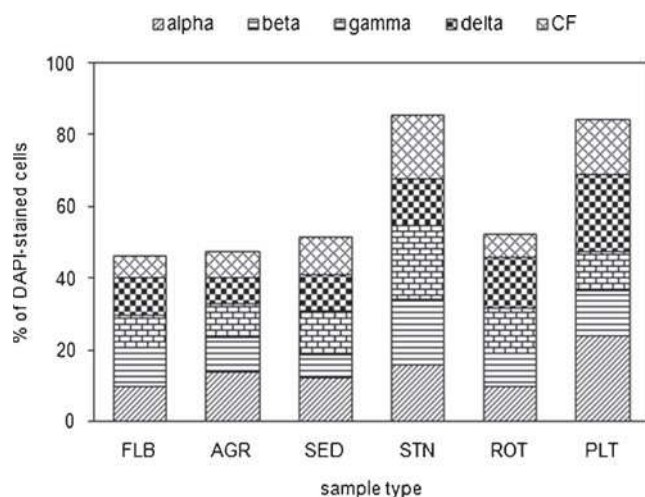


Fig. 3 The percentage of DAPI-stained cells detected with probes targeting *Proteobacteria* (ALF1B—alpha, BET42a—beta, GAM42a—gamma, DELTA495a—delta) and *Cytophaga–Flavobacteria* (CF319a+b—CF) for six different environmental samples

The reason for this might be the lower trophic level of our stream (Table 1).

Phylogenetic composition (FISH)

The *Proteobacteria* groups, *Cytophaga–Flavobacteria* group, and both domains were detected on all types of substrata. The proportion of DAPI-stained cells detected with the probe specific for the domain *Bacteria* varied between 20.6 (FLB) and 45.8 % (PLT) with a mean of 29.9 %. The probe specific for the domain *Archaea* detected

8.7 % of DAPI-stained cells, with a range of 4.3 (FLB) to 17.9 % (STN) (Fig. 2).

The *Alphaproteobacteria* group dominated among *Proteobacteria* groups with a mean of 14.2 %, while the least abundant group was *Betaproteobacteria* with a mean of 11.4 %. The relative proportion of the *Alphaproteobacteria* group varied from 9.7 (PLT) to 23.9 % (ROT). The relative abundance of the *Betaproteobacteria* group was highest in STN (18.4 %) and lowest in SED (6.6 %). The proportion of the *Gammaproteobacteria* group ranged from 8.8 (FLB) to 20.6 % (STN). The last *Proteobacteria* group, *Deltaproteobacteria*, was the most abundant in PLT (21.7 %) and the least abundant for AGR (7.1 %). On average, the *Cytophaga–Flavobacteria* group comprised 10.5 % of the DAPI-stained cells with a range of 6.1 (FLB) to 17.8 % (STN) (Fig. 3).

The average value of DAPI-stained cells detected with the EUB338 probe specific for the domain *Bacteria* was only 29.9 %. Bacterial abundance detected by this probe was really low in our study, while in most studies, the values were much higher (Cottrell and Kirchman 2003; Gillan et al. 2005; Jones et al. 2006). However, Bouvier and Giorgio (2003), who wrote a general review of the percentage of cells detected by EUB338, found different results. The percentage of bacterial cells detected with this probe in the water column of the Kitahashi River was only 20 %, and the value in the sediment of a refinery aquifer (Germany) was 22 % of DAPI-stained cells. The same authors also suggest that one of the main factors for explaining the number of cells is the ecosystem type. Marine and freshwater sediments tend to yield a lower percentage of EUB than all

Table 3 Comparison of the most abundant *Proteobacteria* groups on the six different environmental samples

Sample type	The most abundant <i>Proteobacteria</i> group	Locality	Study
FLB	<i>Betaproteobacteria</i> [13 %]	River water; Elbe River, Germany	Kloep et al. (2006)
	<i>Alphaproteobacteria</i> [22 %]	Seawater; Delaware Bay, USA	Jones et al. (2006)
	<i>Betaproteobacteria</i> [11 %]	Stream water	This study
AGR	<i>Gammaproteobacteria</i> [up to 50 %]	River aggregates; river Weser, Germany	Grossart and Ploug (2000)
	<i>Betaproteobacteria</i> [50–54 %]	River aggregates; Elbe River, Germany	Böckelmann et al. (2000)
	<i>Alphaproteobacteria</i> [14 %]	Stream aggregates	This study
SED	<i>Betaproteobacteria</i> [10 %]	River sediment; Elbe River, Germany	Kloep et al. (2006)
	<i>Betaproteobacteria</i> [17 %]	Reservoir sediment; Quitzdorf reservoir, Germany	Wobus et al. (2003)
	<i>Alphaproteobacteria</i> [12 %]	Stream sediment	This study
STN	<i>Alphaproteobacteria</i> [up to 12 %]	River cobbles; Mahoning River, USA	Olapade et al. (2006)
	<i>Betaproteobacteria</i> [40 %]	Basalt core; Snake river aquifer, USA	Lehman et al. (2001)
	<i>Gammaproteobacteria</i> [20 %]	Stream stones	This study
ROT	<i>Betaproteobacteria</i>	Rice roots; Gottinger Wald, Germany	Kreuzer et al. (2006)
	<i>Deltaproteobacteria</i> [14 %]	Underwater alder roots	This study
PLT	<i>Alphaproteobacteria</i> [17 %]	<i>M. spicatum</i> ; Lake Constance, Germany	Hempel et al. (2008)
	<i>Alphaproteobacteria</i> [40 %]	Maple leaves; Mahoning river, USA	McNamara and Leff (2004)
	<i>Alphaproteobacteria</i> [24 %]	<i>B. aquatile</i>	This study

other systems. Usually, the number of bacteria detected by the EUB338 probe exceeds or equals the sum of the numbers of bacteria detected with the group-specific probes (Cottrell and Kirchman 2000). However, in our study, the sum of the bacterial numbers detected with the group-specific probes greatly exceeded the bacterial abundance detected with EUB338 (Figs. 2 and 3). This finding might imply that the specificity of the EUB338 probe for the domain *Bacteria* was probably too low in our study. The other reason for the lower EUB values in our study may be due to using only the EUB338 probe—other EUB probes (e.g., EUB338 II and EUB338 III suitable for *Planctomycetales* and *Verrucomicrobiales*) were not used.

As expected, the domain *Archaea* showed the lowest value for FLB in our study. Surprisingly, the number of cells detected by the ARCH915 probe was found to be highest in STN rather than in SED as we had anticipated. However, the value found for SED in our study (Fig. 2) was much higher than the value found in marine sediment in Norway (Gillan et al. 2005) and also in stream sediment in the Austrian Alps (Battin et al. 2001). The higher abundance of *Archaea* members in stone biofilm than in sediment could indicate the maturity of the biofilm because with increasing biofilm maturity, the proportion of *Archaea* and *Eucarya* (mainly fungal filaments) increases (Wilmes et al. 2009).

In this study, the *Alphaproteobacteria* group was the dominant bacterial taxa, and surprisingly, *Betaproteobacteria*, which are accepted as the most frequent group in freshwater ecosystems, were the least abundant group of *Proteobacteria*. In stream biofilms, *Betaproteobacteria* are considered to be early colonizers, whereas in mature states, *Alphaproteobacteria* and *Cytophaga–Flavobacteria* dominate (Amann et al. 1990a; Manz et al. 1999). Thus, the higher abundance of the *Alphaproteobacteria* group can signify that most of the biofilm substrata in this study are in their mature states. In addition, the proportion of bacterial groups can change over time due to environmental factors. Brümmer et al. (2000) studied microbial community composition in two rivers with different levels of pollution. They revealed that members of *Betaproteobacteria* were the most abundant organisms in massively polluted rivers. Based on these hypotheses, we speculate that the rather low abundance of *Betaproteobacteria* members might be influenced by the low trophic level of the studied Bystřice stream (Table 1). A detailed comparison of *Proteobacteria* groups for FLB and studied biofilm substrata is given in Table 3.

The members of the *Cytophaga–Flavobacteria* group were the most abundant in STN, while the lowest percentage of DAPI-stained cells was found for the FLB (Fig. 3). High percentages of this phylogenetic group were reported by Grossart and Ploug (2000) for river aggregates and

Hempel et al. (2008) for epiphytic bacteria. The *Cytophaga–Flavobacteria* group is known to be abundant in aquatic ecosystems and to have a potentially unique role in the utilization of organic material. *Cytophaga*-like bacteria are well known for their capacity to use biopolymers and other large dissolved organic matter molecules (Kirchman et al. 2003; Cottrell and Kirchman 2003).

We found considerable differences in the proportion of cells hybridized by FISH for all substrata studied. The STN was the substratum with the highest efficiency of DAPI-stained cells. The sum of percentage of DAPI-stained cells hybridized with *Proteobacteria* and *Cytophaga–Flavobacteria* probes attained about 86 % in the STN sample. In contrast, the lowest efficiency of DAPI-stained cells was found for FLB (about 46 %; Fig. 3). Moreover, the lowest proportion of DAPI-stained cells for both domains was also detected for FLB (Fig. 2). Factors limiting detection of microbial cells by FISH might be the abundance of ribosomes per cell, accessibility of the rRNA, and cell wall permeability (Cottrell and Kirchman 2000).

Generally, the values detected by FISH in particular biofilm substrata exceeded the values obtained for FLB. Our findings that biofilm members of different phylogenetic groups are more abundant than free-living bacteria can be supported by the fact that substrate-associated bacterial communities have a higher proportion of metabolically active cells than free-living bacteria (Haglund et al. 2003).

Authors are aware that the results of this paper can be limited (comparing variables from different media, absence of more detailed analyses); however, comparison of microbial communities colonizing different habitats in aquatic environments can help to illustrate the diversity and potential functions of distinct biofilm communities.

Acknowledgments The methods which required use of epifluorescence microscope were made available to us by the Department of Botany, Palacky University. We thank all the staff of this department for their cooperation. Mr. Simon Hooper and Mr. Alex Outlon are acknowledged for language correction, and the reviewers who amended the final version of the manuscript are thanked.

References

- Amalfitano S, Fazi S (2008) Recovery and quantification of bacterial cells associated with streambed sediments. *J Microbiol Methods* 75:237–243
- Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA (1990a) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* 56:1919–1925
- Amann RI, Krumholz L, Stahl DA (1990b) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. *J Bacteriol* 172:762–770

- Arino X, Saiz-Jimenez C (1996) Factors affecting the colonization and distribution of cyanobacteria, algae and lichens in ancient mortars. In: Riederer J (ed) Proceedings of the eighth international congress on deterioration and conservation of stone. Rathgen Forschungslabor, Berlin, pp 725–731
- Augsburger C, Gleixner G, Kramer C, Kusel K (2008) Tracking carbon flow in a 2-week-old and 6-week-old stream biofilm food web. *Limnol Oceanogr* 53:642–650
- Battin TJ, Wille A, Sattler B, Psenner R (2001) Phylogenetic and functional heterogeneity of sediment biofilms along environmental gradients in a glacial stream. *Appl Environ Microbiol* 67:799–807
- Bertoni R, Callieri C, Corno G, Rasconi S, Caravati E, Contesini M (2010) Long term trends of epilimnetic and hypolimnetic bacteria and organic carbon in a deep holo-oligomictic lake. *Hydrobiologia* 644:279–287
- Bjerkkan G, Witso E, Bergh K (2009) Sonication is superior to scraping for retrieval of bacteria in biofilm on titanium and steel surfaces in vitro. *Acta Orthopaedica* 80:245–250
- Böckelmann U, Manz W, Neu TR, Szewzyk U (2000) Characterization of the microbial community of lotic organic aggregates (“River snow”) in the Elbe River of Germany by cultivation and molecular methods. *FEMS Microbiol Ecol* 33:157–170
- Boenigk J (2004) A disintegration method for direct counting of bacteria in clay-dominated sediments: dissolving silicates and subsequent fluorescent staining of bacteria. *J Microbiol Methods* 56:151–159
- Boureau T, Jacques MA, Berruyer R, Dessaux Y, Dominguez H, Morris CE (2003) Comparison of the phenotypes and genotypes of biofilm and solitary epiphytic bacterial populations on broad-leaved endive. *Microb Ecol* 47:87–95
- Bouvier T, Giorgio PA (2003) Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence in situ hybridization (FISH): a quantitative review of published reports. *FEMS Microbiol Ecol* 44:3–15
- Bratbak G (1985) Bacterial biovolume and biomass estimations. *Appl Environ Microbiol* 49:1488–1493
- Brümmer IHM, Fehr W, Wagner-Dobler I (2000) Biofilm community structure in polluted rivers: abundance of dominant phylogenetic groups over a complete annual cycle. *Appl Environ Microbiol* 66:3078–3082
- Buesing N, Gessner MO (2002) Comparison of detachment procedures for direct counts of bacteria associated with sediment particles, plant litter and epiphytic biofilms. *Aquat Microb Ecol* 27:29–36
- Chrost RJ, Koton M, Siuda W (2000) Bacterial secondary production and bacterial biomass in four Mazurian lakes of differing trophic status. *Polish J Environ Stud* 9:255–266
- Cottrell MT, Kirchman DL (2000) Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* 66:5116–5122
- Cottrell MT, Kirchman DL (2003) Contribution of major bacterial groups to bacterial biomass production (thymidine and leucine incorporation) in the Delaware estuary. *Limnol Oceanogr* 48:168–178
- Crump BC, Armbrust EV, Barros JA (1999) Phylogenetic analysis of particle attached bacteria and free-living bacterial communities in the Columbia river, its estuary and the adjacent coastal ocean. *Appl Environ Microbiol* 65:3192–3204
- Dakora DF, Phillips DA (2002) Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant Soil* 245:35–47
- Eggert SL, Wallace JB (2007) Wood biofilm as a food resource for stream detritivores. *Limnol Oceanogr* 52:1239–1245
- Eisenmann H, Burgherr P, Meyer EI (1999) Spatial and temporal heterogeneity of an epilithic streambed community in relation to the habitat template. *Can J Fish Aquat Sci* 56:1452–1460
- Fazi S, Amalfitano S, Pernthaler J, Puddu A (2005) Bacterial communities associated with benthic organic matter in head-water stream microhabitats. *Environ Microbiol* 10:1633–1640
- Fischer H, Wanner SC, Pusch M (2002) Bacterial abundance and production in river sediments as related to the biochemical composition of particulate organic matter (POM). *Biogeochemistry* 61:37–55
- Gillan DC, Danis B, Pernet P, Joly G, Dubois P (2005) Structure of sediment-associated microbial communities along a heavy-metal contamination gradient in the marine environment. *Appl Environ Microbiol* 71:679–690
- Golladay SW, Sinsabaugh RL (1991) Biofilm development on leaf and wood surfaces in a boreal river. *Freshw Biol* 25:437–450
- Griffiths RI, Whiteley AS, O’Donnell AG, Bailey MJ (2003) Physiological and community responses of established grassland bacterial populations to water stress. *Appl Environ Microbiol* 69:6961–6968
- Grossart HP, Ploug H (2000) Bacterial production and growth efficiencies: direct measurement on riverine aggregates. *Limnol Oceanogr* 45:436–445
- Haglund AL, Lantz P, Tornblom E, Tranvik L (2003) Depth distribution of active bacteria and bacterial activity in lake sediment. *FEMS Microbiol Ecol* 46:31–38
- Hempel M, Blume M, Blindow I, Gross EM (2008) Epiphytic bacterial community composition on two common submerged macrophytes in brackish water and freshwater. *Microbiology* 8:1–10
- Hintze J (2007) NCSS 2007. NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA
- Jones PR, Cottrell M, Kirchman DL, Dexter SC (2006) Bacterial community structure of biofilms on artificial surfaces in an estuary. *Microb Ecol* 53:153–162
- Kang JJ, Goulder R (1996) Epiphytic bacteria downstream of sewageworks outfalls. *Wat Res* 30:501–510
- Kirchman DL, Yu L, Cottrell MT (2003) Diversity and abundance of uncultured *Cytophaga*-like bacteria in the Delaware estuary. *Appl Environ Microbiol* 69:6587–6596
- Kloep F, Manz W, Roske I (2006) Multivariate analysis of microbial communities in the River Elbe (Germany) on different phylogenetic and spatial levels of resolution. *FEMS Microbiol Ecol* 56:9–94
- Koutný J, Rulík M (2007) Hyporheic biofilm particulate organic carbon in a small lowland stream (Sitka, Czech Republic): structure and distribution. *Int Rev Hydrobiol* 92:402–412
- Kreuzer K, Adamczyk J, Iijima M, Wagner M, Scheu S, Bonkowski M (2006) Grazing of a common species of soil protozoa (*Acanthamoeba castellanii*) affects rhizosphere bacterial community composition and root architecture of rice (*Oryza sativa* L.). *Soil Biol Biochem* 38:1665–1672
- Lamberti GA, Gregory SV, Ashkenas LR, Wildman RC, Moore KMS (1991) Stream ecosystem recovery following a catastrophic debris flow. *Can J Fish Aquat Sci* 48:196–208
- Lehman RM, Colwell FS, Bala GA (2001) Attached and unattached microbial communities in a simulated basalt aquifer under fracture- and porous-flow conditions. *Appl Environ Microbiol* 67:2799–2809
- Lock MA (1994) Attached microbial communities in rivers. In: Ford TE (ed) Aquatic microbiology—an ecological approach. Blackwell, Oxford, pp 113–138
- Lucker S, Doris S, Kasper U, Kjeldsen B, MacGregor BJ, Wagner M, Loy A (2002) Improved 16S rRNA-targeted probe set for analysis of sulfate-reducing bacteria by fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* 68:5064–5081
- Manz W, Amann RI, Ludwig W, Wagner M, Schleifer KH (1992) Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Appl Microbiol* 15:593–600

- Manz W, Amann RI, Ludwig W, Vancanneyt M, Schleifer KH (1996) Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga flavobacter bacteroides in the natural environment. *Microbiology* 142:1097–1106
- Manz W, Wendt-Poohoff K, Neu TR, Szewzyk U, Lawrence JR (1999) Phylogenetic composition, spatial structure and dynamics of lotic bacterial biofilms investigated by fluorescent in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. *Microb Ecol* 37:137–155
- McNamara CJ, Leff LG (2004) Bacterial community composition in biofilms on leaves in a northeastern Ohio stream. *JN Am Bentholl Soc* 23:677–685
- Meyer JL, Likens GE, Sloane J (1981) Phosphorus, nitrogen, and organic carbon flux in a headwater stream. *Arch Hydrobiol* 91:28–44
- Morris CE, Monier JM (2003) The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 41:429–453
- Norland S (1993) The relationship between biomass and volume of bacteria. In: Kemp PF, Sherr BF, Sherr EB, Cole JJ (eds) *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publishers, New Jersey, pp 303–307
- Nunan N, Daniell TJ, Singh BK, Papert A, McNicol JV, Prosser JI (2005) Links between plant and rhizoplane bacterial communities in grassland soils, characterized using molecular techniques. *Appl Environ Microbiol* 71:6784–6792
- Olapade OA, Depas MM, Jensen ET, McLellan SL (2006) Microbial communities and fecal indicator bacteria associated with *Cladophora* mats on beach sites along Lake Michigan shores. *Appl Environ Microbiol* 72:1932–1938
- Pernthaler J, Glöckner FO, Schönhuber W, Amann RI (2001) Fluorescence in situ hybridization. In: Paul J (ed) *Methods in microbiology—marine microbiology* vol. 30. Academic Press Ltd, London
- Porter KG, Feig YS (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol Oceanogr* 25:943–948
- Raskin L, Stromley JM, Rittman BE, Stahl DA (1994) Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Appl Environ Microbiol* 60:1232–1240
- Romani AM, Giorgi A, Acuna V, Sabater S (2004) The influence of substratum type and nutrient supply on biofilm organic matter utilization in streams. *Limnol Oceanogr* 49:1713–1721
- Schweitzer B, Huber I, Amann RI, Ludwig W, Simon M (2001) α - and β -*Proteobacteria* control the consumption and release of amino acids on lake snow aggregates. *Appl Environ Microbiol* 67:632–645
- Shiraishi F, Zippel B, Neu TR, Arp G (2008) In situ detection of bacteria in calcified biofilms using FISH and CARD-FISH. *J Microbiol Methods* 75:103–108
- Simon M, Azam F (1989) Protein-content and protein-synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Mar Ecol Progr Ser* 51:201–213
- Simon M, Grossart HP, Schweitzer B, Ploug H (2002) Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. *Aquat Microb Ecol* 28:175–211
- Vadeboncouer Y, Lodge DM (2000) Periphyton production on wood and sediment: substratum-specific response to laboratory and whole-lake nutrient manipulations. *JN Am Bentholl Soc* 19:68–81
- Whiteley AS, Griffiths RI, Bailey MJ (2003) Analysis of the microbial functional diversity within water stressed soil communities by flow cytometric analysis and CTC+ cell sorting. *J Microbiol Methods* 54:257–267
- Wilmes P, Remis J, Hwang M, Auer M, Thelen MP, Banfield JF (2009) Natural acidophilic biofilm communities reflect distinct organismal and functional organization. *ISME J* 3:266–270
- Wobus A, Bleul C, Maassen S, Scheerer C, Schuppler M, Jacobs E, Roske I (2003) Microbial diversity and functional characterization of sediments from reservoirs of different trophic state. *FEMS Microbiol Ecol* 46:331–347
- Zubkov MV, Sleigh MA (2000) Comparison of growth efficiencies of protozoa growing on bacteria on surfaces and in suspension. *J Eukaryot Microbiol* 47:62–69

II. Methanogens and methanotrophs distribution in the hyporheic sediments of a small lowland stream

Iva Buriánková, Lenka Brablcová, Václav Mach, Aneta Hýblová, Pavlína Badurová,
Jana Cupalová, Lubomír Čáp, Martin Rulík

(Fundam Appl Limnol, 181(2): 87–102)



Methanogens and methanotrophs distribution in the hyporheic sediments of a small lowland stream

Iva Buriánková¹, Lenka Brablcová¹, Václav Mach¹, Aneta Hýblová¹,
Pavlína Badurová¹, Jana Cupalová¹, Lubomír Čáp² and Martin Rulík^{1,*}

With 4 figures and 4 tables

Abstract: Distribution of microbial activity, methanogenic archaea and type I and II methanotrophs were studied in a small lowland stream Sitka in Czech Republic. The methanogens and methanotrophic bacteria were detected using FISH with 16 S rRNA-targeted oligonucleotide probes. The highest microbial density was obtained in the upper sediment layer 0–25 cm; this zone corresponded also to that of the highest metabolic activity, as indicated by the methanogenic potential, methanotrophic activity, INT and FDA profiles. Both methanogenic archaea and aerobic methanotrophs were found at all localities along the longitudinal stream profile. The proportion of these groups to the DAPI-stained cells was quite consistent and varied only slightly but a higher proportion to the DAPI-stained cells in the deeper sediment layer 25–50 cm was observed. On average 23.4 % of DAPI-stained cells were detected by FISH with a probe for methanogens while type I methanotrophs reached ~21.4 % and type II methanotrophs 11.9 %, respectively. The percentage of DAPI-stained cells hybridizing with methanotroph-specific probes was generally higher for type I than type II. Our data show that the methanogenic archaea and aerobic methanotrophs can be numerically dominant components of the hyporheic biofilm community and affect CH₄ cycling in river sediments.

Key words: methane, hyporheic sediment, methanogenic archaea, methanotrophs, FISH.

Introduction

The hyporheic zone, the volume of saturated sediment beneath and beside streams containing some proportion of water from surface channel, plays a very important role in the processes of self-purification because the river bed sediments are metabolically active and are responsible for retention, storage and mineralization of organic matter transported by the surface water (Hendricks 1993, Jones & Holmes 1996, Baker et al. 1999, Storey et al. 1999, Fischer et al. 2005). The seemingly well-oxygenated hyporheic zone contains anoxic and hypoxic pockets (“anaerobic microzones”)

associated with irregularities in sediment surfaces, small pore spaces or local deposits of organic matter, creating a ‘mosaic’ structure of various environments, where different microbial populations can live and different microbially mediated processes can occur simultaneously (Baker et al. 1999, Morrice et al. 2000, Fischer et al. 2005). Moreover, hyporheic-surface exchange and subsurface hydrologic flow patterns result in solute gradients that are important in microbial metabolism. Oxidation processes may occur more readily where oxygen is replenished by surface water infiltration, while reduction processes may prevail where surface-water exchange of oxygen is less, and the reduc-

Authors' addresses:

¹ Department of Ecology and Environmental Sciences – Laboratory of Aquatic Microbial Ecology, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, Šlechtitelů 11, CZ-783 71 Olomouc, Czech Republic.

² Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, Czech Republic

* Corresponding author; martin.rulik@upol.cz

ing potential of the environment is greater (Hendricks 1993). As water moves through the hyporheic zone, decomposition of the organic matter consumes oxygen, creating oxygen gradients along the flow path. Thus, compared to marine or lake surface sediments, where numerous studies on O_2 profiles have showed that O_2 concentrations become zero within less than 3 mm from the surface, the hyporheic sediment may be a well-oxygenated habitat even up to a depth of 80 cm (e.g. Bretschko 1981, Holmes et al. 1994). The extent of the oxygen gradient is determined by the interplay between flow path length, water velocity, the ratio of surface to ground water, and the amount and quality of organic matter.

Organic matter decomposition in sediments is an important process in global and local carbon budgets as it ultimately recycles complex organic compounds from terrestrial and aquatic environments to carbon dioxide and methane. Methane is a major component in the carbon cycle of anaerobic aquatic systems, particularly those with low sulphate concentrations. Since a relatively high production of methane has been measured in river sediments (e.g. Schindler & Krabbenhoft 1998, Hlaváčová et al. 2005, Sanders et al. 2007, Wilcock & Sorrell 2008, Sanz et al. 2011), we proposed that river sediments may act as a considerable source of this greenhouse gas which is important in global warming (Hlaváčová et al. 2006). Methane is the second-most abundant gas containing carbon in the atmosphere and has a greenhouse effect some 20 times greater than that of CO_2 , resulting in a significant contribution to the radiation forces of the atmosphere and global climate changes (Houghton et al. 2001, Schimel 2004). Methane (CH_4) is an atmospheric trace gas present at concentrations of about 1.8 ppmv representing about 15% of the anthropogenic greenhouse effect (Forster et al. 2007). The atmospheric CH_4 concentration has increased steadily since the beginning of the industrial revolution (~0.7 ppmv) and has stabilized at ~1.8 ppmv from 1999 to 2005 (Forster et al. 2007). An unexpected increase in the atmospheric growth of CH_4 during the year 2007 has been recently reported (Rigby et al. 2008), indicating that the sources and sinks of atmospheric CH_4 are dynamic, evolving, and not well understood. Freshwater sediments, including wetlands, rice paddies and lakes, are thought to contribute 40 to 50% of the annual atmospheric methane flux (Cicerone & Oremland 1988). However, despite anaerobic metabolism being described in many lake, estuary and wetland sediments, there is still a paucity of information in river ecosystems.

Methane (CH_4) is mostly produced by methanogenic archaea (Garcia et al. 2000, Chaban et al. 2006) as a final product of anaerobic respiration and fermentation, but there is also aerobic methane formation, for example the aerobic degradation of methyl phosphonates (e.g. Karl et al. 2008) or oxidation of ascorbic acid using iron minerals and hydrogen peroxide (Althoff et al. 2010). Methanogenic archaea, which belong to the kingdom Euryarchaeota, are ubiquitous in anoxic environments. Methanogens require an extremely low redox potential to grow. They can be found both in moderate habitats such as rice paddies (Grosskopf et al. 1998a, b), lakes (Jürgens et al. 2000, Keough et al. 2003) and lake sediments (Chan et al. 2005), as well as in the gastrointestinal tract of animals (Lin et al. 1997) and in extreme habitats such as hydrothermal vents (Jeanthon et al. 1999), hypersaline habitats (Mathrani et al. 1988) and permafrost soils (Kobabe et al. 2004, Ganzert et al. 2006). Rates of methane production and consumption in sediments are controlled by the relative availability of substrates for methanogenesis (especially acetate or hydrogen and carbon dioxide). The most important immediate precursors of methanogenesis are acetate and H_2/CO_2 . The acetotrophic methanogens convert acetic acid to CH_4 and CO_2 while the hydrogenotrophic methanogens convert CO_2 with H_2 to CH_4 (Conrad 2007). The degradation pathway of polysaccharides, for example, is such that about two-thirds of the produced CH_4 should be derived from acetate and one-third from H_2/CO_2 if steady state conditions exist (Conrad 1999).

Methane oxidation can occur in both aerobic and anaerobic environments; however, these are completely different processes involving different groups of prokaryotes. Aerobic methane oxidation is carried out by aerobic methane oxidizing bacteria (methanotrophs, MOB), while anaerobic methane oxidizers, discovered recently, thrive under anaerobic conditions and use sulphate or nitrate as electron donors for methane oxidation (e.g. Strous & Jetten 2004). MOB are a physiologically specialized group of methylotrophic bacteria capable of utilizing methane as a sole source of carbon and energy, and they have been recognized as major players in local and global elemental cycling in aerobic environments (Hanson & Hanson 1996, Murrell et al. 1998, Costelo & Lidstrom 1999, Costelo et al. 2002, McDonald et al. 2008). Aerobic MOB have been detected in a variety of environments, and in some they represent significant fractions of total microbial communities (e.g. Henckel et al. 1999, Carini et al. 2005, Trotsenko & Khmelenina 2005, Kalyuzhnaya et al. 2006). However, the data on the diver-

sity and activity of methanotrophic communities from the river ecosystems are fragmentary as yet. MOB are grouped within alpha and gamma subdivisions of the Proteobacteria. The α -methanotrophs include the family Methylocystaceae (genera *Methylosinus* and *Methylocystis*), also known as type II methanotrophs, and acidophilic methanotrophs belonging to the family Beijerinckiaceae (*Methylocella* and *Methylocapsa*). The γ -methanotrophs include the family Methylococcaceae, which consists of type I (*Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylomicrobium*, *Methylosphaera*, *Methylosarcina*, *Methylothermus*) and type X methanotrophs (*Methylococcus* and *Methylocaldum*). Methanotrophs play an important role in the oxidation of methane in the natural environment, oxidizing methane biologically produced in anaerobic environments by the methanogenic archaea and thereby reducing the amount of methane released into the atmosphere. Although methanotrophs can oxidize as much as 100% of methane production (Le Mer & Roger 2001), authors monitoring methanotrophy in riverine ecosystems indicate that CH_4 losses due to microbial consumption are rather less (Zaiss et al. 1982, Lilley et al. 1996).

Estimates of methanogens and methanotrophs abundance in natural samples are based on a number of complementary techniques. Fluorescent in situ hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes has become very useful in studies of microbial ecology, as this method allows target populations to be detected and enumerated directly in their environment

without cultivation. A classical FISH method is based on the direct microscopic identification of single cells after hybridization with 16S rRNA targeted fluorescent dye-labelled oligonucleotide probes. The intensity of probe signal depends on cellular rRNA content, which correlates with the physiological status of the microbial population (Kallistova et al. 2007).

The present results are part of a long-term study of organic carbon dynamics and associated microbial communities in hyporheic sediments in the Sitka Stream, Czech Republic. The main objective of this study was a basic characterization of both methanogenic and methanotrophic populations in different localities along the longitudinal profile of a small lowland stream. We used FISH method for the analysis of microbial community composition and determination of methanogenic and methanotrophic abundance using oligonucleotide probes targeting the 16S rRNA. In addition, total sediment microbial activity was measured simultaneously with potential methane production and oxidation in order to assess whether a relationship between the activity and distribution of the methanogens and methanotrophs could be found.

Material and methods

Study site

The sampling sites are located on the Sitka stream, Czech Republic (Fig. 1). The Sitka is an undisturbed, third-order, 35 km

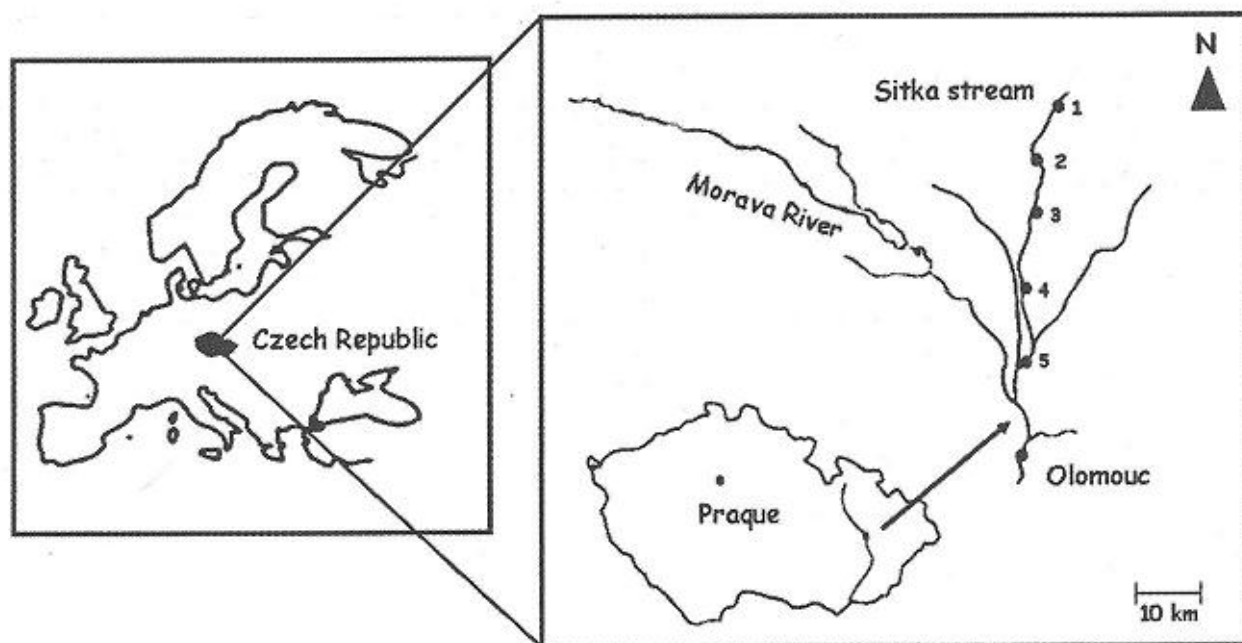


Fig. 1. A map showing the location of the Sitka stream. Black circles represent the study sites (1–5).

long lowland stream originating in the Hrubý Jeseník mountains at 650 m above sea level. The catchment area is 118.81 km², geology being composed mainly of Plio-Pleistocene clastic sediments of lake origin covered by quaternary sediments. The mean annual precipitation of the downstream part of the catchment area varies from 500 to 600 mm. Mean annual discharge is 0.81 m³ s⁻¹. The Sitka stream flows in its upper reach through a forested area with a low intensity of anthropogenic effects, while the lower course of the stream naturally meanders through an intensively managed agricultural landscape. Except for short stretches, the Sitka stream is unregulated with well-established riparian vegetation. River bed sediments are composed of gravels in the upper parts of the stream (median grain size 13 mm) while the lower part, several kilometres away from the confluence, is characterized by finer sediment with a median grain size of 2.8 mm. The Sitka stream confluences with the Oskava stream about 5 km north of Olomouc. More detailed characteristics of the geology, gravel bar, longitudinal physicochemical (e.g. temperature, pH, redox, conductivity, O₂, CH₄, NO₃⁻, SO₄²⁻) patterns in the sediments and a schematic view of the site with sampling point positions have been published previously (Rulík et al. 2000, Rulík & Spáčil 2004). Earlier measurements of a relatively high production of methane, as well as potential methanogenesis, confirmed the suitability of the field sites for the study of methane cycling (Rulík et al. 2000, Hlaváčová et al. 2005, 2006).

Sediment sample collecting and sample processing

Five localities alongside stream profile were chosen for sampling sediment and interstitial water samples based on previous

investigations (Table 1). Hyporheic sediments were collected with a freeze-core using N₂ as a coolant (Bretschko & Klemens 1986) throughout September 2009. At each locality, three cores were taken for subsequent analyses. After sampling two layers, the surface 0–25 cm and 25–50 cm depth were immediately separated and stored at a low temperature whilst being transported to the laboratory. Just after thawing the wet sediment of each layer was sieved. Only particles < 1 mm were considered for microbial and microbial activity measurements as most of the biofilm is associated with this fraction (Leichtfried 1988).

Four randomly selected subsamples (1 mL) were used for extraction of bacterial cells and, consequently, for estimations of bacterial numbers; other sub-samples were used for measurement of microbial activity and respiration, organic matter content determination, etc. Sediment organic matter content was determined by oven-drying at 105 °C to constant weight and subsequent combustion at 550 °C for 5 hours to obtain ash-free dry weight (AFDW). Organic matter values were then converted to carbon equivalents assuming 45% carbon content of organic matter (Meyer et al. 1981). Sediment from another freeze-core was oven-dried at 105 °C and subjected to granulometric analysis. Grain size distribution and descriptive sediment parameters were computed using the database SeDi (Schönbauer & Lewandowski 1999).

Water samples and analysis of methane

Surface water was collected from the river at a depth of 10 cm below the air-water interface in autumn 2009 at each study site. Interstitial water samples were collected using a set of 5–6 minipiezometers (Trulleyová et al. 2003) randomly placed at depths of about 20–50 cm in the sediments at each study site.

Table 1. Selected longitudinal physicochemical patterns (annual means) of the hyporheic interstitial water taken from the depth 25–30 cm. Saturation ratio *R* of methane = measured concentration of the gas in the water divided by the concentration in equilibrium with the atmosphere).

Variable/ Locality	I.	II.	III.	IV.	V.
Geographic coordinates	49° 49' 27.782" N, 17° 18' 47.528" E	49° 45' 53.953" N, 17° 19' 5.141" E	49° 42' 46.109" N, 17° 15' 36.225" E	49° 40' 43.709" N, 17° 14' 49.025" E	49° 38' 7.977" N, 17° 14' 37.068" E
elevation above sea-level [m]	535	330	240	225	215
distance from the spring [km]	6.9	18.2	25.6	30.9	34.9
dominant substrate composition	gravel	gravel	gravel	sand-clay	gravel-sand
grain median size [mm]	12.4	12.9	13.2	0.2	5.4
organic carbon in sediment < 1 mm [%]	0.9	0.7	0.6	1.0	1.2
interstitial dissolved oxygen saturation [%]	63.0	89.3	83.5	62.5	59.3
interstitial water DOC [mg L ⁻¹]	2.05	1.31	2.71	5.76	2.62
interstitial CH ₄ concentration [µg L ⁻¹]	1.34	0.65	10.34	7 260.8	18.38
saturation ratio <i>R</i> of interstitial CH ₄	29.6	11.3	224.6	146 321	402.1

The initial 50–100 mL of water was used as a rinse and discarded. Then two subsamples of interstitial water from each minipiezometer were collected from a continuous column of water with a 100 mL polypropylene syringe connected to a hard PVC tube. The subsamples were injected into separate sterile, clear vials (40 mL) with screw-tops, covered by a polypropylene cap with PTFE silicone septa (for analysis of dissolved gasses) and stored before returning to the laboratory. All samples were taken in the morning between 9 a.m. and 12 noon. All measurements were done at base flow. Interstitial water temperature, dissolved oxygen (mg L^{-1} and percent saturation) and conductivity were measured in the field with a portable Hanna HI 9828pH/ORP/EC/DO meter. Dissolved organic carbon (DOC) was measured by Pt-catalysed high temperature combustion on a TOC FOR-MACS^{HT} analyser.

Concentrations of dissolved methane in the stream and interstitial water were measured directly using a headspace equilibration technique. Dissolved methane was extracted from the water by replacing 10 mL of water with N_2 and then vigorously shaking the vials for 15 seconds (to release the gas from the water to facilitate equilibration between the water and gas phases). All samples were equilibrated with air at laboratory temperature. Methane was analysed from the headspace of the vials by injecting 2 mL of gas sub-sample with a gas-tight syringe into a CHROM 5 gas chromatograph, equipped with the flame ionization detector (CH_4 detection limit = $1 \mu\text{g L}^{-1}$) and with the 1.2 m PORAPAK Q column (i.d. 3 mm), with nitrogen as a carrier gas. Gas concentration in water was calculated using Henry's law. The saturation ratio (R) was calculated as the measured concentration of gas divided by the concentration in equilibrium with the atmosphere at the temperature of the water sample using the solubility data of Wiesenburg & Guinasso (1979), Weiss & Price (1980), and Weiss (1974).

Methanogenic potential and methanotrophic activity

The rate of methane production (methanogenesis) was measured using the PMP method (Scgers 1998). The sediment was sieved and placed into incubation flasks. C-amended solutions (flushed for 5 minutes with N_2) with acetate $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (100 mg C in the incubation flask) were used for the examination of methanogenic potential. The substrate (acetate) was chosen according to our previous results obtained for the same study site which showed that acetate is more important than hydrogen for methanogenesis in the hyporheic sediments (Hlaváčová et al. 2005). All laboratory sediment incubations were performed in 250-mL dark glass flasks, capped with rubber stoppers, using approximately 100 g (wet mass) of sediment (grain size < 1 mm) and 180 mL of amended solution or distilled water. The headspace was maintained at 20 mL. Typically, triplicate live and dead (methanogenesis was inhibited by addition of 1.0 mM chloroform) samples from each depth were stored at 20 °C in the dark and the incubation time was 72 hours; however, subsamples from the headspace atmosphere were taken every 24 hours. Gas production was calculated from the difference between final and initial headspace concentration and volume of the flask; results are expressed per unit wet weight of sediment per one hour ($\text{pM CH}_4 \text{ mL}^{-1} \text{ WW hour}^{-1}$).

Rate of potential methane oxidation (methanotrophy) was measured using a modified method of methane oxidation in soil samples from Hanson (1998). The sediment was sieved and placed into incubation flasks. 50 mL of methane was added by

syringe to the closed incubation flask with the sieved sediment and then the pressure was balanced to atmospheric pressure. All laboratory sediment incubations were performed in 250-mL dark glass flasks, capped with rubber stoppers, using approximately 100 g (wet mass) of sediment (grain size < 2 mm). Typically, triplicate live and dead (samples killed by HgCl_2 to arrest all biological activity) samples from each depth were stored at 20 °C in the dark, and incubation time was 72 hours; however, subsamples from the headspace atmosphere were taken every 24 hours. Potential CH_4 oxidation rates at the different concentrations were obtained from the slope of the CH_4 decrease with time ($r^2 > 0.90$); methane oxidation was calculated from the difference between final and initial headspace concentration and volume of the flask; results are expressed per unit wet weight of sediment per one hour ($\text{nM CH}_4 \text{ mL}^{-1} \text{ WW hour}^{-1}$).

Respiratory – electron transport system (ETS) activity and hydrolytic (esterase) activity

ETS activity was measured using the assay originally proposed by Kenner & Ahmed (1975) and modified by Tóth (1995) and Simčič (2005). Samples of sediment were collected by the freeze-core method and then transported to the laboratory and analysed within 24 hours. The samples (approximately 1 mL of sediment) were gently shaken for 5 minutes (500 rpm; OS Control 10) in 4 mL volume of ice-cold homogenization buffer. After that samples were sonicated (20 seconds, 20% power; Sonopuls 2200) and centrifuged (5 minutes, 3000×g; Rotofix 32A). Then 0.5 mL of supernatant (in triplicate) was incubated in 1.5 mL substrate solution (containing NADH, NADPH) with 0.5 mL reagent solution [2-(*p*-iodophenyl)-3-(*p*-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride, INT] for 30 minutes at *in situ* temperature. Controls with no supernatant were also incubated. After incubation a stopping solution (formalin conc. : H_3PO_4) was added to all samples (including the controls). The formazan production was determined spectrophotometrically against a calibration curve produced by formazan standards. Results are expressed per unit wet weight of sediment per one hour ($\mu\text{M O}_2 \text{ hour}^{-1} \text{ mL}^{-1}$).

Sediment samples for measurement of esterase activity were also collected by the freeze-core method and then transported to the laboratory and analysed within 24 hours. The samples (approximately 1 mL) were placed into sterile tubes. Secondly 5 mL of phosphate buffer, 4 mL of distilled water and 1 mL of FDA solution were added to all samples. Controls were inactivated with HgCl_2 . All samples were gently shaken for 5 minutes (500 rpm; OS Control 10) and after that incubated for 30 minutes at *in situ* temperature. Incubation was stopped with HgCl_2 , the samples were then sonicated (30 seconds, 40% power; Sonopuls 2200) and centrifuged (5 minutes, 3000×g; Rotofix 32A). Absorbance of the supernatant at 490 nm was measured spectrophotometrically against a fluorescein calibration curve. The assay proposed by Battin (1997), modified by Ntougias et al. (2006), was used for measuring hydrolytic activity. Results are expressed per unit wet weight of sediment per one hour ($\mu\text{M FDA hour}^{-1} \text{ mL}^{-1}$).

Abundance of microbial cells and microbial community composition

For measuring microbial parameters, formaldehyde fixed samples (2% final conc.) were first mildly sonicated for 30 seconds at the 15% power (sonotroda MS 73, Sonopuls HD2200,

Sonorex, Germany), followed by incubation for 3 hours under mild agitation with 10 mL of detergent mixture (Tween 20 0.5%, vol/vol, tetrasodium pyrophosphate 0.1 M and distilled water) and density centrifugation (Priemé et al. 1996, Santos Furtado & Casper 2000, Amalfitano & Fazi 2008). For density centrifugation, the non-ionic medium Nycodenz (1.31 g mL⁻¹; Axis-Shield, Oslo, Norway) was used at 4600G for 60 minutes (Rotofix 32A, Hettich, Germany). After the preparation processes, 1 mL of Nycodenz was placed underneath 2 mL of treated slurry using a syringe needle (Fazi et al. 2005). 1 mL of supernatant was then taken for subsequent analysis.

Total cell numbers (TCN)

The supernatant was filtered onto membrane filters (0.2 µm GTTP; Millipore Germany), stained for 10 minutes in cold (4–6 °C) and in the dark with DAPI solution (0.0063 g mL⁻¹; wt vol⁻¹; Sigma, Germany) and gently rinsed in distilled water and 80% ethanol. Filters were air-dried and mounted in immersion oil. Stained cells were enumerated on an epifluorescence microscope (Olympus BX 60) equipped with a camera (Olympus DP 12) and image analysis software (NIS Elements; Laboratory Imaging, Prague, Czech Republic). At least 200 cells within at least 20 microscopic fields were counted in three replicates from each locality. TCN was expressed as bacterial numbers per 1 mL of wet sediments.

Prokaryotes community composition

The methanogenic archaea and methanotrophic bacteria were detected using FISH (Fluorescence in situ hybridization) with 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes labelled with indocarbocyanine dye Cy3 (see Table 2). The prokaryotes were hybridized according to the protocol by Pernthaler et al. (2001). Briefly, the supernatants which were used also for TCN were filtered onto polycarbonate membrane filters (0.2 µm GTTP; Millipore), filters were cut into sections and placed on glass slides. For the hybridization mixtures, 2 µl of probe-working solution was added to 16 µl of hybridization buffer in a microfuge tube. Hybridization mix was added to the samples and the slides with filter sections were incubated at 46 °C for 3 hours. After incubation, the sections were transferred into pre-heated washing buffer (48 °C) and incubated for 15 minutes in a water bath at the same temperature. The filter sections were washed and air-dried. The DAPI staining procedure followed as previously described. Finally, the samples were mounted in a 4:1 mix of Citifluor and Vecta Shield. The methanogens and methanotrophs were counted in three replicates from each locality and the relative proportion of bacteria, archaea, methanogens and methanotrophs to the total number of DAPI stained prokaryotes was then calculated.

Statistics

Data analyses were performed using statistical software R-version 2.6.0 and GLM (General linear models). Analysis of deviance was chosen for the factors cogency. Models with dependent variable (methanogenic potential and methanotrophic activity) were log-transformed ($y = \log[x+1]$) to achieve normality. In the models where the dependent variable was abundance (TCN, FISH), Negative Binomial Model was used. Depending on data distribution Wilcoxon signed rank sum test or paired t-test were used.

Results

General processes

a) Cell counts and in situ hybridization

The total cell number (DAPI-stained cells, TCN) on hyporheic sediments <1 mm revealed from DAPI staining (TCN) varied between $2.06 \pm 1.7 \times 10^6$ and $12.36 \pm 8.7 \times 10^6$ cells mL⁻¹ wet sediment. DAPI-stained prokaryotes showed significantly higher average cell numbers in the middle part of the stream ($p < 0.001$, $n = 120$) (Fig. 2a). Generally, cell numbers were higher in the upper 0–25 cm sediment layer ($7.5 \pm 1.9 \times 10^6$ cells mL⁻¹) than at greater sediment depth of 25–50 cm ($4.6 \pm 1.2 \times 10^6$ cells mL⁻¹). The highest number of cells was found in the 0–25 cm layer at the locality IV where the TCN reached up to 18×10^6 cells mL⁻¹ wet sediment.

The percentage of cells identified with probe EUB338 which targeted members of the domain Bacteria, accounted for 5.1 to 31.3% of the DAPI-stained cells. The average portion of EUB-hybridized bacteria in the upper sediment layer (13.8%) was similar to that in deeper sediments (14.7%) (Table 3). Probe ARCH915 targeting members of the domain archaea resulted in average cell counts of 10.9 to 14.3% of the DAPI-stained cells. The portion of arch-hybridized cells slightly increased with the sediment depth, however no significant difference has been found between both sediment layers (Table 3).

Table 2. Sequences and target organisms of used oligonucleotide-probes.

Probe	Target sequence (5'-3')	Target phylogenetic group	Reference
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Eubacteria	Amann et al. (1990)
My84	CCACTCGTCAGCGCCCGA	Type I methanotrophs	Eller & Frenzel (2001)
My705	CTGGTGTTCCCTTCAGATC	Type I methanotrophs	Eller & Frenzel (2001)
Ma450	ATCCAGGTACCGTCATTATC	Type II methanotrophs	Eller & Frenzel (2001)
ARCH915	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	Archaea	Raskin et al. (1994)
MPB1	CATGCACCWCCTCTCAGC	Methanogen-specific probe	Jupraputtasri et al. (2005)

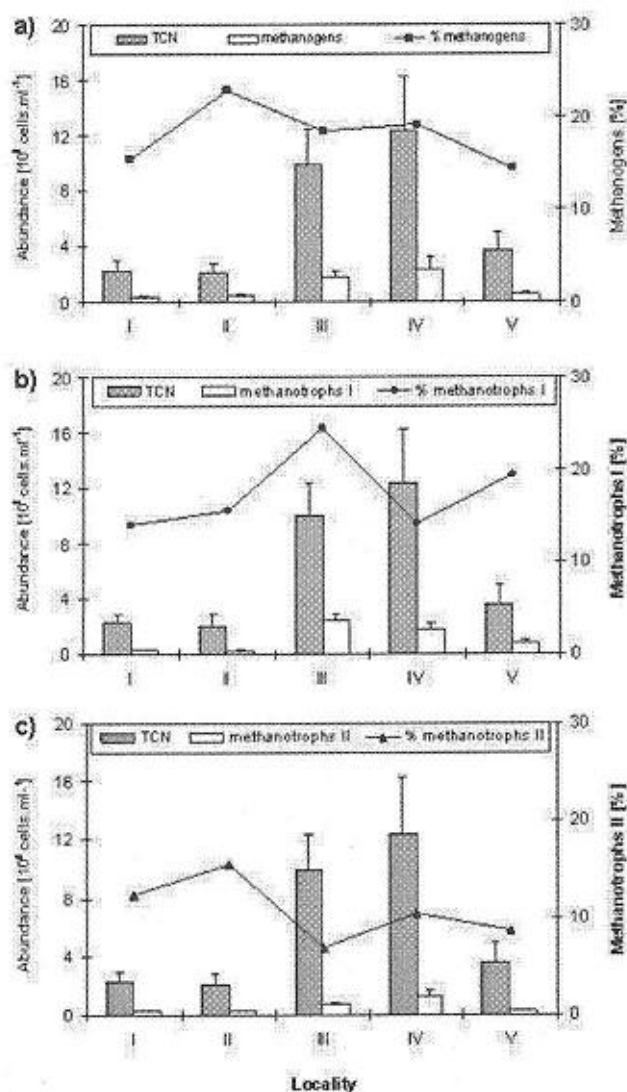


Fig. 2. Total cell numbers (grey bars), methanogens (panel a), type I (b) and II (c) methanotrophs (white bars) at different localities along longitudinal profile of the Sitka stream. The lines indicate the percentage of methanogens or methanotrophs as compared to total bacterial cell numbers. Values are averages for both sediments layers (standard errors are given for bars).

b) ETS and esterase activity

ETS activity measured as INT reduction varied between $0.14\text{--}2.84\ \mu\text{M O}_2\ \text{hour}^{-1}\ \text{mL}^{-1}$ wet weight sediment; however, no differences were found in ETS activity between localities studied. Esterase activity as showed by FDA method was in the range from 0.73 to $16.22\ \mu\text{M FDA}\ \text{hour}^{-1}\ \text{mL}^{-1}$ wet weight sediment and the values were significantly different at various localities ($p < 0.05$, $n = 40$). Both ETS activity and esterase activity exhibited significantly much higher values for the upper sediment layer at all localities (Table 4). These results supported measurements of MP and MA mentioned above and suggest that the majority of metabolic processes occur in the upper $0\text{--}25\ \text{cm}$ of the sediments where input of dissolved oxygen from the surface stream is still sufficient.

Methane related processes

a) Methanogens and MOB numbers

Methanogens-targeting probe MPB1 gave a much higher signal for the deeper sediment layer ($p < 0.05$) (Table 3) and percentage of MPB1-hybridized methanogen was in the range of 4.6 to 31% of the DAPI-stained bacteria. The percentage of DAPI-stained cells hybridizing with methanotroph-specific probes was generally higher for type I than type II, with a pronounced increase in type I towards to the deep sediments (Table 3). Percentage of type I methanotrophs, hybridized with combination of M γ 84 plus M γ 705 probes was in the range 5 to 33.4% of the DAPI-stained cells and clearly tended to be significantly much higher in deeper sediment layers compared to that from the surface ($p < 0.05$) (Table 3). By contrast, type II methanotrophs showed significantly lower percentage of DAPI-stained cells ($2.9\text{--}18.2\%$ of the DAPI) and the portion of their cell count was almost the same in both sediment layers (Table 3).

Table 3. Relative numbers of eubacteria, archaea, methanogens and methanotrophs detected by FISH in relation to the total DAPI counts in different sediment depths of the Sitka stream (average \pm SE, range in parentheses). EUB338 – a probe that targets all bacteria, ARCH915 – a probe that targets archaea; MPB1 – a probe that is specific for methanogens; M γ 84 plus M γ 705 – a probe combination that is specific for type I methanotrophs; M α 450 – a probe that is specific for type II methanotrophs.

Depth [cm]	EUB338 [%]	ARCH915 [%]	MPB1 [%]	M γ 84 + M γ 705 [%]	M α 450 [%]
0–25	13.8 ± 3.8 (5.1–28.5)	10.9 ± 3.5 (3.8–25.2)	12.8 ± 3.7 (4.5–23.4)	13.7 ± 3.6 (5.3–30.9)	8.8 ± 3.7 (2.8–17.6)
25–50	14.7 ± 3.9 (5.6–31.2)	14.3 ± 2.9 (6.5–23.4)	23.4 ± 6.7 (13.6–31.0)	21.4 ± 4.8 (14.8–33.3)	11.9 ± 2.3 (7.9–18.1)

Table 4. Summary of the microbial metabolic activity in the different sediment depths of the Sitka stream (average \pm SE).

Depth [cm]	ETS [μ M O ₂ /mL/hour]	FDA [μ M FDA/mL/hour]	MP [pM CH ₄ /mL/hour]	MA [nM CH ₄ /mL/hour]
0–25	1.59 \pm 0.29	11.4 \pm 1.5	38.9 \pm 30.1	18.47 \pm 6.97
25–50	0.25 \pm 0.13	2.4 \pm 0.3	1.9 \pm 0.36	15.71 \pm 6.48

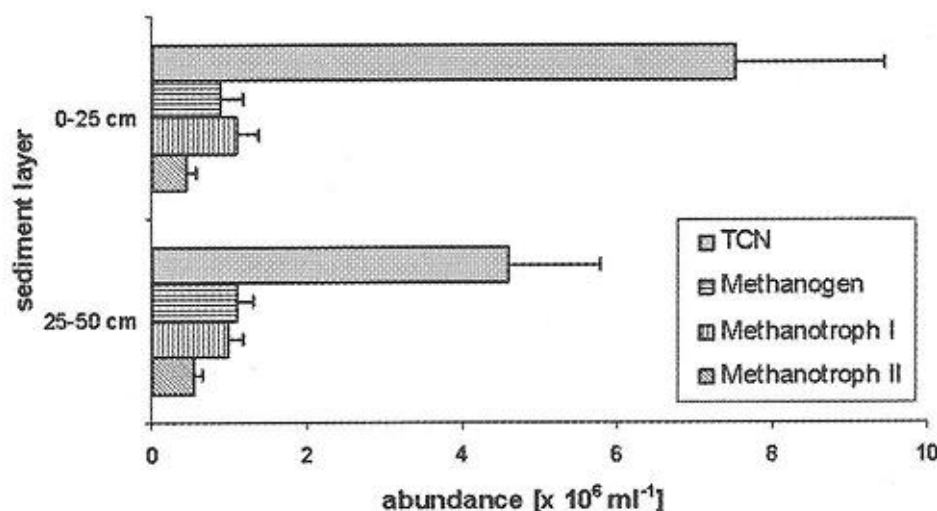
**Fig. 3.** Average total cell numbers, (DAPI-stained, TCN), methanogens, type I and II methanotrophs found in different sediment layers, horizontal bars indicate 1 SE.

Fig. 2 shows the population of methanogenic and methanotrophic communities along a longitudinal profile of the Sitka stream. Cell numbers of methanogens and type I methanotrophs differed among localities ($p < 0.001$, $n = 30$) while type II methanotrophs exhibited less significant difference in the cell numbers among localities ($p = 0.026$, $n = 30$). Generally, both methanogenic archaea and aerobic methanotrophs were found in all samples and at all localities along the longitudinal profile. The proportion of these groups to the TCN was quite consistent and varied only slightly (Fig. 2a–c) along the longitudinal stream profile. The percentage of methanogens to total DAPI counts revealed a maximum (22.9%) at locality II; despite the fact that this locality showed relatively low TCN as well as number of methanogens. Methanotrophs showed similar trends, however they differ in percentage – type I methanotrophs reached the maximum at locality III (24.8%) while II type methanotrophs at locality II (15.5%) (Fig. 2b, c).

All three groups also formed a higher proportion (although non-significant) of the TCN in the deeper sediment layer. Methanogens comprised on average up to 23% of the total ($p = 0.167$, $n = 30$), while type I methanotrophs comprised ~22% ($p = 0.68$, $n = 30$) and type II methanotrophs comprised 12% ($p = 0.795$,

$n = 30$) of the total respectively (Table 3). However, the abundance of methanogens and methanotrophs remained almost unchanged with increasing sediment depth, thus their increase in the proportion to the TCN corresponded mostly to the total bacterial cell count decreasing from $7.53 \pm 1.93 \times 10^6$ cells mL⁻¹ wet sediment in the upper sediment layer to 4.6×10^6 cells mL⁻¹ wet sediment in the deeper sediments (Fig. 3).

The average abundance of methanogens (0.88 ± 0.28 and $1.07 \pm 0.23 \times 10^6$ cells mL⁻¹ in the upper and deeper layer, respectively) and type II methanotrophs ($0.44 \pm 0.14 \times 10^6$ cells mL⁻¹ and $0.56 \pm 0.1 \times 10^6$ cells mL⁻¹) increased slightly with the sediment depth (Fig. 3), while type I methanotrophs had lower average abundance in the deeper layer ($0.98 \pm 0.23 \times 10^6$ cells mL⁻¹) compared to their abundance $1.07 \pm 0.28 \times 10^6$ cells mL⁻¹ in the upper sediment layer (Fig. 3). Increase in the abundance with increasing sediment depth had been expected in the case of methanogens; however, we have no explanation yet for type II methanotrophs.

b) Methanogenic potential (MP) and methanotrophic activity (MA)

Methanogenic potential was significantly higher in the upper sediment layer compared to that from the deeper

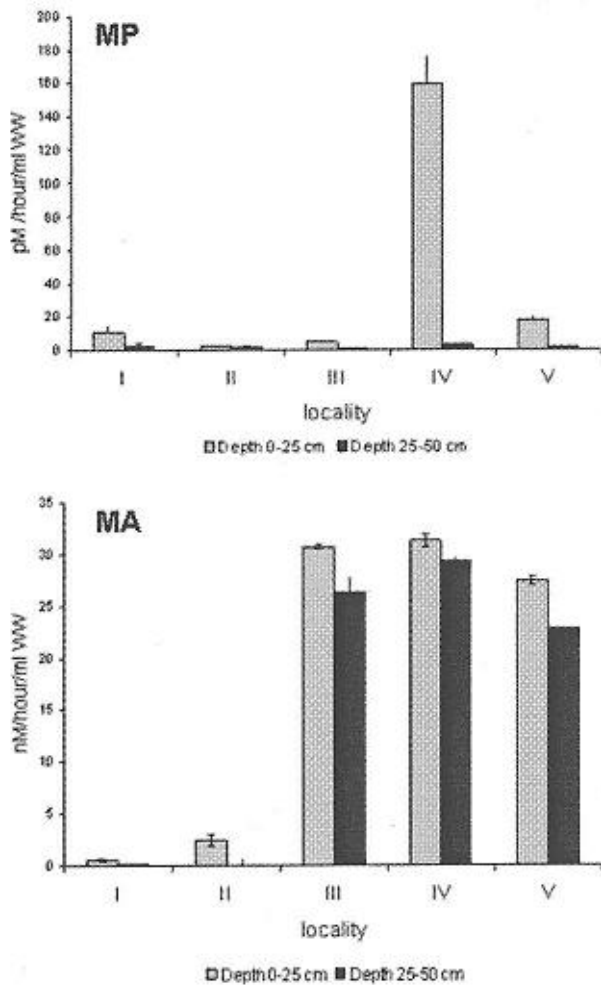


Fig. 4. Methanogenic potential (MP) and methanotrophic activity (MA) along longitudinal profile of the Sitka stream. Vertical bars indicate SE.

sediment layer ($p < 0.001$, $n = 30$) (Table 4). Generally, average MP varied between $0.74\text{--}158.6$ $\text{pM CH}_4 \text{ mL}^{-1} \text{ WW hour}^{-1}$ with the highest values found at site IV located the furthest downstream (Fig. 4a). In the long term, this locality also exhibits both high interstitial methane concentrations and emissions of methane to the atmosphere. Average MA varied between $0.02\text{--}31.3$ $\text{nM CH}_4 \text{ mL}^{-1} \text{ WW hour}^{-1}$ and the highest values were found to be at the downstream localities ($p < 0$, $n = 30$) while sediment from sites located upstream showed much lower or even negative activity (Fig. 4b). Similar to MP, values of MA were significantly higher in sediments from upper layers compared to those from deeper layers ($p < 0.001$, $n = 30$) (Table 4).

Discussion

During this study we found relatively well developed populations of methanogenic archaea at all localities and that all localities also showed positive methanogenic potential. After DAPI staining, the highest microbial density was obtained in the upper sediment layer 0–25 cm and density decreased with depth. This zone corresponded to that of highest metabolic activity, as indicated by the methanogenic potential, methanotrophic activity, INT and FDA profiles whereas the methane profile increased in the deeper sediment. This observation is in strong concordance with some previous studies which suggested that there may be a spatial uncoupling of bacterial production and organic carbon mineralisation in sediments, with growth occurring predominantly in the near-surface aerobic layer whilst the bulk of mineralisation takes place in deeper, anoxic sediment (Wellsbury et al. 1996).

Artificial electron acceptors such as tetrazolium salts are commonly used as an indicator of electron transport system (ETS) activity. Although it is well established that tetrazolium salts (mostly 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride, CTC, triphenyl tetrazolium chloride, TTC and INT) can be used to detect specifically the metabolic activity of aerobic bacteria, some results suggest that tetrazolium salts could potentially be used to detect the metabolic activity of bacteria under some anaerobic conditions (Fukui & Takii 1989, Walsh et al. 1995, Smith & McFeters 1997, Bhupathiraju et al. 1999) and a positive response to the INT test has been found even in strictly anaerobic bacteria in activated sludge (Maurines-Carboneill et al. 1998). Hence, measurement of ETS activity in the Sitka stream sediments should not be affected by the prevalence of an anaerobic metabolism in the deeper sediments (Hlaváčová et al. 2005, 2006) and, moreover, ETS activity can be considered as a measure of the total microbial respiratory potential in the sediments (Simčič & Mori 2007). Though one would expect that freezing and thawing of sediment samples may affect cell numbers and ETS activity we never observed any serious changes. Similarly, activities of extracellular α -glucosidase, β -glucosidase and β -xylosidase that were repeatedly measured in frozen and thawed hyporheic sediments and compared to those from the samples taken by handy shovel showed also no significant difference (Rulík & Spáčil 2004). Hence, number of cells and microbial activities should not be affected by freezing and thawing. On the other hand, results from some experiments revealed that the tetrazolium salt INT is toxic to some groundwater bacteria at concen-

trations normally used for ETS assays, and may thus alter the composition of the microbial community under study. The results also suggest that some viable and actively growing bacteria do not reduce tetrazolium salts and tetrazolium salt assays are likely to dramatically underestimate total ETS activity in groundwater (Hatzinger et al. 2003). Fluorescein diacetate (FDA) is hydrolysed by non-specific esterases and can be considered as a useful indicator of cell activity (Battin 1997). In our study, we have used this method to measure esterase activity of the sediment biofilm. The distribution pattern of both ETS and esterase activity showed the highest values in the upper sediment layer and also reflect to some extent the methanogenic and methanotrophic activities mentioned above. This observation is in accordance with the results of ETS measurements by Vosjan (1982) in sediments of the Wadden Sea and also with our previous study focusing on enzyme activity (Rulík & Spáčil 2004). Surface sediments exhibited significantly higher enzyme activities compared to deeper layers and we had suggested that higher activity in surface sediments could be attributed to the occurrence of biofilm internal DOC cycling mediated by epilithic algae. Under light conditions, autotrophic algae in the biofilm are a possible source of labile compounds that may be used by biofilm bacteria living in close proximity (Rulík & Spáčil 2004).

The method we have used for characterisation of ETS activity did not allow us to determine the number of metabolically active cells. However, if the abundance of metabolically active cells correlates with total cell numbers (Haglund et al. 2002), then we can suppose that sediment microbial community of the upper 0–25 cm layer exhibits a larger proportion of active cells compared to the deeper sediment layer (see Fig. 3).

Methanogenic processes

Measurement of potential methane production could be affected by a different methodological approach, because there is no standardized approach. The MP range is quite broad and may differ up to three orders of magnitude (10^{-2} to $10^1 \mu\text{mol m}^{-3} \text{s}^{-1}$); however, depending on temperature or availability of electron acceptors for methanogens the values of MP may reach up to $10^3 \mu\text{mol m}^{-3} \text{s}^{-1}$ (Segers 1998). Our data from the Sitka stream showed much greater differences with maximum value being 230 times higher compared to the lowest one. Anaerobic incubation of sediment from various depths (0–8 cm) of chalk streams revealed maximum MP in the depth of 6 cm (16.5 CH_4

$\text{nmol g}^{-1} \text{ wet sed h}^{-1}$) with MP decrease with increasing sediment depth (Sanders et al. 2007). This finding corresponds to our own research that methane production in the upper 0–25 cm sediment layer was higher compared to the lower sediment depth.

Methane production was detected in all samples; generally, upper sediment layer 0–25 cm showed much higher potential methane production compared to lower 25–50 cm layer. We have no exact explanation for these findings. In the case of locality IV, where considerable methane production has been found in the upper sediment, we suppose that predominance of clay sediment in deeper layers could be a reason explaining the failure of methanogenesis at this locality. Another suggestion could be better substrate provision in the upper sediment layer (Galand et al. 2002, Kobabe et al. 2004). These authors studied methanogens and their activity in peat bogs or fens and found that most of the degradation of organic matter occurs in the surface layers. The low potential methane production in the deeper layers of the peat can then be explained by the lack of suitable substrate or the presence of less favourable substrate for the methanogens at those depths (Valentine et al. 1994). In their study, Chan et al. (2005) observed that the vertical decrease of methane production rates correlated better with the similar decrease of bacterial rather than archaeal numbers. This assumption is based on the fact that very first steps of organic matter degradation were found to be rate-limiting for methane production and that the decrease in bacterial numbers reflects a similar decrease in methane production (Chan et al. 2005). Indeed, our results show that the total number of microbial cells decreased with depth. However, decrease in total numbers of microorganisms is the rule for stratified lake sediments (Zepp-Falz et al. 1999, Haglund et al. 2003, Koizumi et al. 2003) as fresh substrates are only supplied from above (Schulz & Conrad 1995). Distribution of organic matter in running waters is dependent on many factors such as stream velocity or river bed topography (Rulík 1994). We have found no clear difference in the organic carbon content between different sediment layers, thus the hypothesis of the better substrate provision might be refused. However, much higher microbial cell numbers and both ETS and esterase activity in the upper sediment layer compared to deeper layer (cf. Table 4) would indicate that the 'hot spot' of microbial metabolic activity indeed occurs in the surface sediment layer and can support methanogenic populations living here.

The distribution pattern of all methanogens did not reflect the sediment methanogenesis activity as

it did in the study of Casper et al. (2003). Generally, the number of methanogens increased slightly with increasing depth; however methanogenic potential in deeper sediments remained very low, as has been showed earlier. One reason for such a difference could be adding only acetate as a methanogenic substrate for MP measurements. Our current results of stable carbon isotopic analysis of interstitial methane indicate that hydrogenotrophic methanogenesis predominates in the sediment zones where the most amount of methane is produced (unpublished data). Very recently, however, using the FISH method we found that abundance of methanogens belonging to three selected families reached their maximum in the sediment depth of 20–30 cm and had closely reflected vertical distribution of acetate concentrations. Species of family Methanomicrobiaceae grow only with hydrogen, formate and alcohols (except methanol), Methanosarcinaceae can grow with all methanogenic substrates except formate, and members of Methanosectaceae grow exclusively with acetate as energy source. All three families also showed similar proportion to the DAPI stained cells, ranging from 9.9% (Methanosarcinaceae) to 12.3% (Methanobacteriaceae). Thus, these results indicate that low methanogenic activity within the deeper sediments are unlikely to be caused by the presence of predominantly hydrogenotrophic methanogens which did not grow in the MP assay when amended by acetate.

Generally, the proportion of prokaryotic cells were low in the samples. The factors limiting detection of microbial cells by FISH might be the abundance of ribosomes per cell, accessibility of the rRNA and cell wall permeability (e.g. Cotrell & Kirchmann 2000, Bouvier & del Giorgio 2003). In addition, methanogens seem more abundant than total archaea in hyporheic sediments of the Sitka stream. One reason could be a lack of specificity of the ARCH915 domain probe, which has been shown to hybridize non-specifically to some members of the Bacteria (see e.g. Battin et al. 2001, Simon et al. 2000, Lehours et al. 2005). The observation of the number of methanogens is similar to that made by Kotsyurbenko et al. (2004) in an acidic West-Siberian peat bog who also found a slight increase with depth. The proportion of methanogens (15–28% of total microbial cell numbers) in our study is similar to those found by Casper et al. (2003) and Kobabe et al. (2004), but rather higher than mentioned by other authors (Zepp-Falz et al. 1999, Koizumi et al. 2003, Chan et al. 2005).

One might wonder how methanogenic archaea can occur in the river surface sediments fully saturated

with dissolved oxygen. One possibility could be the existence of hyporheic microbial biofilm attached to the sediment particles where separated layers allow coexistence and growth of various microorganisms (Koutný & Rulík 2007). Although we tried to explain the discordance between the number of methanogens and potential methanogenic production in the vertical profile of the sediment, there is still a question to be answered: why analysis of interstitial water usually showed higher methane concentrations in deeper sediments compared to the upper sediment layers (unpublished data). A possible explanation might be that methane concentrations in the upper sediments are continually lowered by oxidation and consumption by aerobic methanotrophic bacteria. Nevertheless, we should be very careful when comparing sediment methanogenic activity, interstitial water methane concentration and distribution of methanogenic Archaea in the hyporheic sediments. Firstly, river bed sediments are already much more heterogeneous compared to the lake sediments. We must take into account that our data on number of bacterial/archaeal cells are based on numbers obtained from sediment particles smaller than 1 mm; therefore, distribution pattern of microbial cells reflects to some extent the distribution of those particles, which may vary from 2 up to more than 60% of the Sitka stream bulk sediment (unpublished data). Secondly, vertical distribution of organic matter, and particularly dissolved oxygen in the river sediments, is quite different from those in lakes and may change substantially step by step due to unpredictable movement of the interstitial water. Finally, we should also consider that we measured methanogenesis on substrate amended with acetate as has been mentioned above.

Although only a small basis of experimental methods for measurement of potential oxidation of methane are reported, MA may vary in three orders of magnitude (Segers 1998). In Lake Müggelsee, MA depending on the location varied from 0.68 to 10.10 mmol m⁻² day⁻¹ and correlated also with the measured MP (Rolletschek 1997) while Sanders et al. (2007) found values to be 0.145 µmol CH₄ g⁻¹ wet sediment h⁻¹ in a chalk stream. Since oxidation of methane requires both available methane and oxygen, methanotrophic activity is expected to be high at sites where both methane and dissolved oxygen are available. Therefore, high values of the MA were usually found in the upper layers of the sediments (Segers 1998) or at the interface between oxic and anoxic zones. Relatively high methanotrophic activity found in deeper sediments of the localities III–V (Fig. 4b) indicates that

methane oxidation is not restricted only to the surface sediments as is common in lakes but also takes place at greater depths. It seems likely that an oxic zone occurs in a vertical profile of the sediments and that methane diffusing from the deeper layer into the sedimentary aerobic zone is being oxidized by methanotrophs here. Increased methanotrophic activity at this hyporheic oxic-anoxic interface is probably evident also from higher abundance of type II methanotrophs in the same depth layer (Fig. 3). A similar pathway of methane cycling has been observed by Kuivila et al. (1988) in well oxygenated sediments of Lake Washington. Nevertheless, all the above mentioned findings support our previous measurements that coexistence of various metabolic processes in hyporheic sediments is common due to vertical and horizontal mixing of the interstitial water and occurrence of microbial biofilm (Hlaváčová et al. 2005, 2006).

Rather surprisingly we found a relatively high number of methanotroph cells compared to the total number of cells determined by DAPI counting. In our sediments methanotrophs accounted for 10.6 to 25.7% of the total cell numbers while papers focused on peat bog or rice soils mention much lower values (0.8%–4.9%) (Dedysh et al. 2003a, b, Eller & Frenzel 2001). An exception is Kallistova et al. (2007) who found that methanotrophs accounted for about 50% of the total bacterial population. The number of aerobic methanotrophic bacteria in the sediments of three coastal thermal springs of Lake Baikal varied between 10^3 – 10^4 cells mL⁻¹, with the highest number of methanotrophs (10^8 cells mL⁻¹) found in the Sukhaya spring. These values for methanotrophs were much higher than their numbers in the deepwater sediments of Lake Baikal: 10^2 – 10^3 cells mL⁻¹ (Zelenkina et al. 2009). Total methanotrophs in Lake Washington were estimated to be 3.6×10^8 – 7.4×10^8 cells g⁻¹ dry weight sediment (Costello et al. 2002). The total number of type I methanotrophs g⁻¹ dry weight sediment was found to be 3.4×10^8 – 6.7×10^8 , while the total number of type II methanotrophs was found to be 2.3×10^7 – 6.8×10^7 cells g⁻¹ dry weight sediment (Costello et al. 2002).

In soils type II methanotrophs are found more frequently than type I methanotrophs. Type II methanotrophs were dominant in boreal peatland soil, type II methanotrophs were also found to be the dominant methanotrophs in peat bogs, whereas type I methanotrophs seem to prevail in aquatic environments, such as lake water and lake sediments (Henckel et al. 1999). Our data correspond to this premise. Type I methanotrophs were found in higher density and percentage to DAPI stained cells compared to type II methanotrophs.

Similar results were also published by Costello et al. (2002) in Lake Washington sediments and Rahalkar et al. (2009) in Lake Constance sediments. Moreover, methanotrophs of type I also dominated over type II in the studies by Kallistova et al. (2007), Urmann et al. (2009) and Wang et al. (2008).

Several hypotheses have been raised for the ecological differences between Type I and Type II methanotrophs. For example, it has been hypothesized that Type I methanotrophs prefer relatively low CH₄ and high O₂ concentrations, while Type II methanotrophs prefer relatively high CH₄ and low O₂ concentrations (Amaral & Knowles 1995). A test of this hypothesis using Italian rice field soil showed that Type I in contrast to Type II methanotrophs indeed prefer relatively low CH₄ concentrations, but show no preference for high versus low O₂ concentrations (Henckel et al. 2000, Conrad 2007). In the Sitka stream, type I and type II methanotrophs were found at all localities in nearly the same abundance, thus, it is not clear whether any preference for methane concentration or dissolved oxygen exists between both types of methanotrophs. However, higher abundance of the type II methanotrophs (compared to those from upper layer found in the deeper sediment layer 25–50 cm in depth where also high methanotrophic activity has been detected) may suggest that suitable conditions for type II methanotrophs would occur here. However, since methanotrophs are able to survive periods of CH₄ or O₂ deficiency (Roslev & King 1994, Schnell & King 1995), this suggestion is only speculation.

Conclusions

To our knowledge this study is the first analysis of the composition of active methanogenic/methanotrophic communities in river hyporheic sediments. By use of FISH we have shown that both methanogenic archaea and aerobic methanotrophs occur commonly within river sediments, however their distribution only partly reflects potential methane production and consumption rates measured simultaneously. Rather surprising is the detection of type I and II methanotrophs in the deep sediment layer 25–50 cm, indicating that suitable conditions for methane oxidation occur here. Since we have only used oligonucleotide probes to specifically detect all methanogens and type I and II methanotrophs, we cannot show whether a function-structure relationship exists along longitudinal and vertical profile of the Sitka stream sediments. Thus, our future investigations will focus more on FISH population

analysis with family and genus specific probes and phylogenetic analyses conducted by DGGE and sequencing.

Acknowledgements

This work was supported by the Czech Grant Agency grant 526/09/1639 and partly by the Ministry of Education, Youth and Sports grants 1708/G4/2009 and 2135/G4/2009. We would like to thank Mark Sixsmith for his helpful improving of the manuscript and two anonymous reviewers for their valuable comments regarding an earlier version of the paper.

References

- Althoff, F., Jugold, A. & Keppler, F., 2010: Methane formation by oxidation of ascorbic acid using iron minerals and hydrogen peroxide. – *Chemosphere* **80**: 286–292.
- Amalfitano, S. & Fazi, S., 2008: Recovery and quantification of bacterial cells associated with streambed sediments. – *J. Microbiol. Meth.* **75**: 237–243.
- Amann, R. L., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R. & Stahl, D. A., 1990: Combination of 16 S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. – *Appl. Environ. Microb.* **56**: 1919–1925.
- Amaral, J. A. & Knowles, R., 1995: Growth of methanotrophs in methane and oxygen counter gradients. – *FEMS Microbiol. Lett.* **126**: 215–220.
- Baker, M. A., Dahm, C. N. & Vallet, H. M., 1999: Acetate retention and metabolism in the hyporheic zone of a mountain stream. – *Limnol. Oceanogr.* **44**: 1530–1539.
- Battin, T. J., 1997: Assessment of fluorescent diacetate hydrolysis as a measure of total esterase activity in natural stream sediment biofilms. – *Sci. Total. Environ.* **198**: 51–60.
- Battin, T. J., Wille, A., Sattler, B. & Psenner, R., 2001: Biofilms along Environmental Gradients in a Glacial Stream. – *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 799–807.
- Bhupathiraju, V. K., Hernandez, M., Landfear, D. & Alvarez-Cohen, L., 1999: Application of tetrazolium dye as an indicator of viability in anaerobic bacteria. – *J. Microbiol. Meth.* **37**: 231–243.
- Bouvier, T. & del Giorgio, P. A., 2003: Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence in situ hybridization (FISH): A quantitative review of published reports. – *FEMS Microbiol. Ecol.* **44**: 3–15.
- Bretschko, G., 1981: Vertical distribution of zoobenthos in an alpine brook of the RITRODAT-LUNZ study area. – *Verh. Internat. Verein. Limnol.* **21**: 873–876.
- Bretschko, G. & Klemens, W. E., 1986: Quantitative methods and aspects in the study of the interstitial fauna of running waters. – *Stygologia* **2**: 297–316.
- Carini, S., LeClerc, G. & Joye, S. B., 2005: Aerobic methane oxidation and methanotroph community composition during seasonal stratification in Mono Lake, California (USA). – *Environ. Microbiol.* **7**: 1127–1138.
- Casper, P., Chan, O. C., Furtado, A. L. S. & Adams, D. D., 2003: Methane in an acidic bog lake: The influence of peat in the catchment on the biogeochemistry of methane. – *Aquat. Sci.* **65**: 36–46.
- Chaban, B., Ng, S. Y. M. & Jarrell, K. F., 2006: Archaeal habitats – from the extreme to the ordinary. – *Can. J. Microbiol.* **52**: 73–116.
- Chan, O. C., Klaus, P., Casper, P., Ulrich, A., Lueders, T. & Conrad, R., 2005: Vertical distribution of methanogenic archaeal community in Lake Dagow sediment. – *Environ. Microbiol.* **7**: 1139–1149.
- Cicerone, R. J. & Oremland, R. S., 1988: Biogeochemical aspects of atmospheric methane. – *Global Biogeochem. Cy.* **1**: 61–86.
- Conrad, R., 1999: Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. – *FEMS Microbiol. Ecol.* **28**: 193–202.
- Conrad, R., 2007: Microbial ecology of methanogens and methanotrophs. – *Adv. Agron.* **96**: 1–63.
- Costello, A. M., Auman, A. J., Macalady, J. L., Scow, K. M. & Lidstrom, M. E., 2002: Estimation of methanotroph abundance in a freshwater lake sediment. – *Environ. Microbiol.* **4**: 443–450.
- Costello, A. M. & Lidstrom, M. E., 1999: Molecular Characterization of Functional and Phylogenetic Genes from Natural Populations of Methanotrophs in Lake Sediments. – *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5066–5074.
- Cottrell, M. T. & Kirchman, D. L., 2000: Community Composition of Marine Bacterioplankton Determined by 16 S rRNA Gene Clone Libraries and Fluorescence In Situ Hybridization. – *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 5116–5122.
- Dedysh, S. N., Derakshani, M. & Liesack, W., 2003: Detection and enumeration of methanotrophs in acidic *Sphagnum* peat by 16 S rRNA fluorescence in situ hybridization, including the use of newly developed oligonucleotide probes for *Methylocella palustris*. – *Appl. Environ. Microb.* **9**: 4850–4857.
- Dedysh, S. N., Dunfield, P. F., Derakshani, M., Stubner, S., Hezer, J. & Liesack, W., 2003: Differential detection of type II methanotrophic bacteria in acidic peatlands using newly developed 16 S rRNA-targeted fluorescent oligonucleotide probes. – *FEMS Microbiol. Ecol.* **43**: 299–308.
- Eller, G. & Frenzel, P., 2001: Changes in activity and community structure of methane-oxidizing bacteria over the growth period of rice. – *Appl. Environ. Microb.* **67**: 2395–2403.
- Fazi, S., Amalfitano, S., Pernthaler, J. & Puddu, A., 2005: Bacterial communities associated with benthic organic matter in headwater stream microhabitats. – *Environ. Microbiol.* **7**: 1633–1640.
- Fischer, H., Kloep, F., Wilczek, S. & Pusch, M. T., 2005: A river's liver – microbial processes within the hyporheic zone of a large lowland river. – *Biogeochemistry* **76**: 349–371.
- Forster, P., Ramaswamy, V., Artaxo, P., Berntsen, T., Betts, R., Fahey, D. W., Haywood, J., Lean, K., Lowe, D. C., Myhre, G., Nganga, J., Prinn, R., Raga, G., Schulz, M. & Van Dorland, R., 2007: Changes in atmospheric constituents and in radiative forcing. – In: Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K. B., Tignor, M. & Miller, H. L. (eds): *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel in Climate Change.* – Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom/ New York, NY, USA.
- Fukui, M. & Takii, S., 1989: Reduction of tetrazolium salts by sulfate-reducing bacteria. – *FEMS Microbiol. Ecol.* **62**: 13–20.
- Galand, P. E., Saarnio, S., Fritze, H. & Yrjälä, K., 2002: Depth related diversity of methanogen Archaea in Finnish oligotrophic fen. – *FEMS Microbiol. Ecol.* **42**: 441–449.

- Ganzert, L., Jürgens, G., Münster, U. & Wagner, D., 2006: Methanogenic communities in permafrost-affected soils of the Laptev Sea coast, Siberian Arctic, characterized by 16 S rRNA gene fingerprints. – *FEMS Microbiol. Ecol.* **59**: 476–488.
- García, J.-L., Patel, B. K. C. & Ollivier, B., 2000: Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea. – *Anaerobe* **6**: 205–226.
- Großkopf, R., Janssen, P. H. & Liesack, W., 1998: Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16 S rRNA gene sequence retrieval. – *Appl. Environ. Microb.* **64**: 960–969.
- Großkopf, R., Stubner, S. & Liesack, W., 1998: Novel euryarchaeotal lineages detected on rice roots and in the anoxic soil of flooded rice microcosms. – *Appl. Environ. Microb.* **64**: 4983–4989.
- Haglund, A. L., Lantz, P., Törblom, E. & Tranvik, L., 2003: Depth distribution and bacterial activity in lake sediment. – *FEMS Microbiol. Ecol.* **46**: 31–38.
- Haglund, A. L., Törblom, E., Boström, B. & Tranvik, L., 2002: Large differences in the fraction of active bacteria in plankton, sediments, and biofilm. – *Microb. Ecol.* **43**: 232–241.
- Hanson, R. S., 1998: Ecology of Methanotrophic Bacteria. – In: Burlage, R. S., Atlas, R., Stahl, D., Geesey, G. & Saylor G. (eds): *Techniques in Microbial Ecology*. – Oxford University Press New York, pp. 137–162.
- Hanson, R. S. & Hanson, T. E., 1996: Methanotrophic bacteria. – *Microbiol. Rev.* **60**: 439–471.
- Hatzinger, P. B., Palmer, P., Smith, R. L., Peñarrieta, C. T. & Yoahinari, T., 2003: Applicability of tetrazolium salts for the measurement of respiratory activity and viability of ground-water bacteria. – *J. Microbiol. Meth.* **52**: 47–58.
- Henckel, T., Friedrich, M. & Conrad, R., 1999: Molecular analyses of the methane-oxidizing microbial community in rice field soil by targeting the genes of the 16 S rRNA, particulate methane mono-oxygenase, and methanol dehydrogenase. – *Appl. Environ. Microb.* **65**: 1980–1990.
- Henckel, T., Roslev, P. & Conrad, R., 2000: Effects of O₂ and CH₄ on presence and activity of the indigenous methanotrophic community in rice field soil. – *Environ. Microbiol.* **2**: 666–679.
- Hendricks, S. P., 1993: Microbial ecology of the hyporheic zone: a perspective integrating hydrology and biology. – *J. N. Am. Benthol. Soc.* **12**,1: 70–78.
- Hlaváčová, E., Rulík, M. & Čáp, L., 2005: Anaerobic microbial metabolism in hyporheic sediment of a gravel bar in a small lowland stream. – *River Res. Appl.* **21**: 1003–1011.
- Hlaváčová, E., Rulík, M., Čáp, L. & Mach, V., 2006: Greenhouse gases (CO₂, CH₄, N₂O) emissions to the atmosphere from a small lowland stream. – *Arch. Hydrobiol.* **165**: 339–353.
- Holmes, R. M., Fisher, S. G. & Grimm, N. B., 1994: Parafluvial nitrogen dynamics in a desert stream ecosystem. – *J. N. Am. Benthol. Soc.* **13**: 468–478.
- Houghton, J. T., Ding, Y., Griggs, D. J., Noguera, Van der Linden, P. J. & Xiaosu, D. (eds.), 2001: *Climate Change 2001: The Scientific Basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC)*. – Cambridge University Press, UK, pp. 944.
- Jeanthon, C., L'Haridon, S., Reysenbach, A. L., Corre, E., Vernet, M., Messner, P. et al., 1999: *Methanococcus vulcanius* sp. nov., a novel hyperthermophilic methanogen isolated from East Pacific Rise, and identification of *Methanococcus* sp. D., 4213: *Methanococcus fervens* sp. nov. – *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **49**: 583–589.
- Jones, J. B. & Holmes, R. M., 1996: Surface-subsurface interactions in stream ecosystems. – *TREE* **11**,6: 239–242.
- Jupraputtasri, W., Boonapatcharoen, N., Cheevadhanarak, S., Chaiprasert, P., Tanticharoen, M. & Techkarnjanaruk, S., 2005: Use of an alternative Archaea-specific probe for methanogen detection. – *J. Microbiol. Meth.* **61**: 95–104.
- Jürgens, G., Glöckner, F.-O., Amann, R., Saano, A., Montonen, L., Likolampi, M. & Münster, U., 2000: Identification of novel Archaea in bacterioplankton of a boreal forest lake by phylogenetic analysis and fluorescent in situ hybridization. – *FEMS Microbiol. Ecol.* **34**: 45–56.
- Kallistova, A. Yu., Kevbrina, M. V., Nekrasova, V. K., Shnyrev, N. A., Einola, J.-K. M., Kulomaa, M. S., Rintala, J. A. & Nozhevnikova, A. N., 2007: Enumeration of methanotrophic bacteria in the cover soil of an aged municipal landfill. – *Microb. Ecol.* **54**: 637–645.
- Kalyuzhnaya, M. G., Zabinsky, R., Bowerman, S., Baker, D. R., Lidstrom, M. E. & Chistoserdova, L., 2006: Fluorescence in situ hybridization-flow cytometry-cell sorting-based method for separation and enrichment of type I and type II methanotroph populations. – *Appl. Environ. Microb.* **72**: 4293–4301.
- Karl, D. M., Beversdorf, L., Björkman, K. M., Church, M. J., Martinez, A. & DeLong, E. F., 2008: Aerobic production of methane in the sea. – *Nature Geoscience* **1**: 473–478.
- Kenner, R. A. & Ahmed, S. I., 1975: Measurements of electron transport activities in marine phytoplankton. – *Mar. Biol.* **33**: 119–127.
- Keough, B. P., Schmidt, T. M. & Hicks, R. E., 2003: Archaeal nucleic acids in picoplankton from great lakes on three continents. – *Microb. Ecol.* **46**: 238–248.
- Kobabe, S., Wagner, D. & Pfeifer, E. M., 2004: Characterisation of microbial community composition of a Siberian tundra soil by fluorescence in situ hybridization. – *FEMS Microbiol. Ecol.* **50**: 13–23.
- Koizumi, Y., Takii, S., Nishino, M. & Nakajima, T., 2003: Vertical distribution of sulfate-reducing bacteria and methane-producing archaea quantified by oligonucleotide probe hybridization in the profundal sediment of a mesotrophic lake. – *FEMS Microbiol. Ecol.* **44**: 101–108.
- Koutný, J. & Rulík, M., 2007: Hyporheic biofilm particulate organic carbon (BPOC) in a small lowland stream Sitka (Czech Republic): structure and distribution. – *Int. Rev. Hydrobiol.* **92**: 402–412.
- Kotsyurbenko, O. R., Kuk-Jeong Chin, K. J., Glagolev, M. V., Stubner, S., Simankova, M. V., Nozhevnikova, A. N. & Conrad, R., 2004: Acetoclastic and hydrogenotrophic methane production and methanogenic populations in an acidic West-Siberian peat bog. – *Environ. Microbiol.* **6**: 1159–1173.
- Kuivila, K. M., Murray, J. W., Devol, A. H., Lidstrom, M. E. & Reimers, C. E., 1988: Methane cycling in the sediments of Lake Washington. – *Limnol. Oceanogr.* **33**: 571–581.
- Lehours, A.-C., Bardot, C., Thenot, A., Debroas, D., Fonty, G., 2005: Anaerobic Microbial Communities in Lake Pavin, a Unique Meromictic Lake in France. – *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 7389–7400.
- Leichtfried, M., 1988: Bacterial substrates in gravel beds of a second order alpine stream (Project Ritrodal-Lunz, Austria). – *Verh. Internat. Verein. Limnol.* **23**: 1325–1332.

- Le Mer, J. & Roger, P., 2001: Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils. A review. – *Eur. J. Soil Biol.* **37**: 25–50.
- Lilley, M. D., de Angelis, M. A. & Olson, J. E., 1996: Methane concentrations and estimated fluxes from Pacific Northwest rivers. – *Mitt. Internat. Verein. Limnol.* **25**: 187–196.
- Lin, C., Raskin, L. & Stahl, D. A., 1997: Microbial community structure in gastrointestinal tracts of domestic animals: comparative analyses using rRNA-targeted oligonucleotide probes. – *FEMS Microbiol. Ecol.* **22**: 281–294.
- Mathrani, I. M., Boone, D. R., Mah, R. A., Fox, G. E. & Lau, P. P., 1988: *Methanohalophilus zhilinae*, sp. nov., an alkaliphilic, halophilic, methylotrophic methanogen. – *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**: 139–142.
- Maurines-Carboneill, C., Pernelle, J.-J., Morin, L., Sachon, G. & Leblon, G., 1998: Relevance of the INT test response as an indicator of ETS activity in monitoring heterotrophic aerobic bacterial populations in activated sludges. – *Wat. Res.* **32**: 1213–1221.
- McDonald, I. R., Bodrosy, L., Chen, Y. & Murrell, J. C., 2008: Molecular Ecology Techniques for the Study of Aerobic Methanotrophs. – *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 1305–1315.
- Meyer, J. L., Likens, G. E. & Sloane, J., 1981: Phosphorus, nitrogen, and organic carbon flux in a headwater stream. – *Arch. Hydrobiol.* **91**: 28–44.
- Morrice, J. A., Dahm, C. N., Valett, H. M., Unnikrishna, P. & Campana, M. E., 2000: Terminal electron accepting processes in the alluvial sediments of a headwater stream. – *J. N. Am. Bethol. Soc.* **19**: 593–608.
- Murrell, J. C., McDonald, I. R. & Bourne, D. G., 1998: Molecular methods for the study of methanotroph ecology. – *FEMS Microbiol. Ecol.* **27**: 103–114.
- Ntougias, S., Ehaliotis, C., Papadopoulou, K. K. & Zervakis, G., 2006: Application of respiration and FDA hydrolysis measurements for estimating microbial activity during composting processes. – *Biol. Fertil. Soils* **42**: 330–337.
- Pemthaler, J., Glöckner, F. O., Schönhuber, W. & Amann, R., 2001: Fluorescence in situ hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. – *Method Microbiol.* **30**: 207–225.
- Priemé, A., Sitaula, J. I. B., Klemmedtsson, A. K. & Bakken, L. R., 1996: Extraction of methane-oxidizing bacteria from soil particles. – *FEMS Microbiol. Ecol.* **21**: 59–68.
- Rahalkar, M., Deutzmann, J., Schink, B. & Bussmann, I., 2009: Abundance and activity of methanotrophic bacteria in littoral and profundal sediments of lake Constance (Germany). – *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 119–126.
- Raskin, L., Stromley, J. M., Rittman, B. E. & Stahl, D. A., 1994: Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. – *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1232–1240.
- Rigby, M., Prinn, R. G., Fraser, P. J., Simmonds, P. G., Langenfelds, R. L., Huang, J., Cunnold, D. M., Steele, L. P., Krummel, P. B., Weiss, R. F., O'Doherty, S., Salameh, P. K., Wang, H. J., Harth, C. M., Mühle, J. & Porter, L. W., 2008: Renewed growth of atmospheric methane. – *Geophys. Res. Lett.* **35**: L22805.
- Rolletschek, H., 1997: Temporal and spatial variations in methane cycling in Lake Müggelsee. – *Arch. Hydrobiol.* **140**: 195–206.
- Roslev, P. & King, G. M., 1994: Survival and recovery of methanotrophic bacteria starved under oxic and anoxic conditions. – *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2602–2608.
- Rulík, M., 1994: Vertical distribution of coarse particulate organic matter in river bed sediments (Morava River, Czech Republic). – *Regul. Riv.: Res. Manage.* **9**: 65–69.
- Rulík, M., Čáp, L. & Hlaváčová, E., 2000: Methane in the hyporheic zone of a small lowland stream (Sitka, Czech Republic). – *Limnologia* **30**: 359–366.
- Rulík, M. & Spáčil, R., 2004: Extracellular enzyme activity within hyporheic sediments of a small lowland stream. – *Soil Biol. & Biochem.* **36**: 1653–1662.
- Sanders, I. A., Heppell, C. M., Cotton, J. A., Wharton, G., Hildrew, A. G., Flowers, E. J. & Trimmer, M., 2007: Emissions of methane from chalk streams has potential implications for agricultural practices. – *Freshwat. Biol.* **52**: 1176–1186.
- Santos Furtado, A. L. & Casper, P., 2000: Different methods for extracting bacteria from freshwater sediment and simple method to measure bacterial production in sediment samples. – *J. Microbiol. Meth.* **41**: 249–257.
- Sanz, J. L., Rodríguez, N., Díaz, E. E. & Amils, R., 2011: Methanogenesis in the sediments of Rio Tinto, an extreme acidic river. – *Environ. Microbiol.* **13**: 2336–2341.
- Schimel, J., 2004: Playing scales in the methane cycle: From microbial ecology to the globe. – *PNAS* **101**: 12400–12401.
- Schindler, J. E. & Krabbenhoft, D. P., 1998: The hyporheic zone as a source of dissolved organic carbon and carbon gases to a temperate forested stream. – *Biogeochemistry* **43**: 157–174.
- Schnell, S. & King, G. M., 1995: Stability of methane oxidation capacity to variations in methane and nutrient concentrations. – *FEMS Microbiol. Ecol.* **17**: 285–294.
- Schönbauer, B. & Lewandowski, G., 1999: SEDI – a database oriented analysis and evaluation tool for processing sediment parameters. – *J. Biol. Stn. Lunz* **16**: 13–27.
- Schulz, S. & Conrad, R., 1995: Effect of algal deposition on acetate and methane concentrations in the profundal sediment of a deep lake (Lake Constance). – *FEMS Microbiol. Ecol.* **16**: 251–259.
- Segers, R., 1998: Methane production and methane consumption: a review of processes underlying wetland methane fluxes. – *Biogeochemistry* **41**: 23–51.
- Simčič, T., 2005: Respiratory electron transport system (ETS) activity and respiration rate in cold-stenothermal and eurythermal chironomid larvae from high-mountain lakes. – *Arch. Hydrobiol.* **162**: 399–415.
- Simčič, T. & Mori, N., 2007: Intensity of mineralization in the hyporheic zone of the pre-alpine river Bača (West Slovenia). – *Hydrobiologia* **586**: 221–234.
- Simon, H. M., Jeremy, A., Dodsworth, J. A. & Goodman, R. M., 2000: Crenarchaeota colonize terrestrial plant roots. – *Environ. Microbiol.* **2**: 495–505.
- Smith, J. J. & McFeters, G. A., 1997: Mechanisms of INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride) and CTC (5-cyno-2,3-ditolyl tetrazolium chloride) reduction in *Escherichia coli* K-12. – *J. Microbiol. Meth.* **29**: 161–175.
- Storey, R. G., Fulthorpe, R. R. & Williams, D. D., 1999: Perspectives and predictions on the microbial ecology of the hyporheic zone. – *Freshwat. Biol.* **41**: 119–130.
- Strous, M. & Jetten, M. S. M., 2004: Anaerobic oxidation of methane and ammonium. – *Annu. Rev. Microbiol.* **58**: 99–117.
- Tóth, L. G., 1993: Measurement of the terminal electron transport system (ETS) activity of the plankton and sediment – International Training Course. – Balaton Limnological Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences, Hungary.

- Trotsenko, Y. A. & Khmelenina, V. N., 2005: Aerobic methanotrophic bacteria of cold ecosystems. – *FEMS Microbiol. Ecol.* **53**: 15–26.
- Truleyová, Š., Rulík, M. & Popelka, J., 2003: Stream and interstitial water DOC of a gravel bar (Sitka stream, Czech Republic): characteristics, dynamics and presumable origin. – *Arch. Hydrobiol.* **158**: 407–420.
- Urmann, K., Lazzaro, A., Gandolfi, I., Schroth, M. H. & Zeyer, J., 2009: Response of methanotrophic activity and community structure to temperature changes in a diffusive CH_4/O_2 counter-gradient in an unsaturated porous medium. – *FEMS Microbiol. Ecol.* **69**: 202–212.
- Valentine, D. W., Holland, E. A. & Schimel, D. S., 1994: Ecosystem and physiological controls over methane production in northern wetlands. – *J. Geophys. Res.* **99**: 1563–1571.
- Vosjan, J. H., 1982: Respiratory electron transport system activities in marine environments. – *Hydrobiol. Bull.* **16**: 61–68.
- Walsh, S., Lappin-Scott, H. M., Stockdale, H. & Herbert, B. N., 1995: An assessment of the metabolic activity of starved and vegetative bacteria using two redox dyes. – *J. Microbiol. Meth.* **24**: 1–9.
- Wang, Y., Inamori, R., Kong, H., Kaiqin, Xu, K., Yuhei Inamori, Y., Takashi Kondo, T. & Zhang, J., 2008: Influence of plant species and wastewater strength on constructed wetland methane emissions and associated microbial populations. – *Ecological engineering* **32**: 22–29.
- Weiss, R. F., 1974: Carbon dioxide in water and seawater: the solubility of a non-ideal gas. – *Mar. Chem.* **2**: 203–215.
- Weiss, R. F. & Price, B. A., 1980: Nitrous oxide solubility in water and seawater. – *Mar. Chem.* **8**: 347.
- Wellsbury, P., Herbert, R. A. & Parkes, R. J., 1996: Bacterial activity and production in near-surface estuarine and freshwater sediments. – *FEMS Microbiol. Ecol.* **19**: 203–214.
- Wiesenburg, D. A. & Guinasso, N. L., 1979: Equilibrium solubilities of methane, carbon monoxide, and hydrogen in water and sea water. – *J. Chem. Eng. Data* **24**: 356–360.
- Wilcock, R. J. & Sorrell, B. K., 2008: Emissions of greenhouse gases CH_4 and N_2O from low-gradient streams in agriculturally developed catchments. – *Water Air Soil Poll.* **188**: 155–170.
- Zaiss, U., Winter, P. & Kaltwasser, H., 1982: Microbial methane oxidation in the river Saar. – *Z. Allgem. Microbiol.* **22**: 139–148.
- Zelenkina, T. S., Eshimayev, B. T., Dagurova, O. P., Suzina, N. E., Namsarayev, B. B. & Trotsenko, Y. A., 2009: Aerobic methanotrophs from the coastal thermal springs of Lake Baikal. – *Microbiology* **78**: 492–497.
- Zepp-Falz, K., Holliger, C., Grosskopf, R., Liesack, W., Nozhevnikova, A. N., Müller, B., Wehrli, B. & Hahn, D., 1999: Vertical distribution of methanogens in the anoxic sediment of Rotsee (Switzerland). – *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2402–2408.

III. Running waters as important source of methane emissions
to atmosphere: preliminary results from the Sitka stream, Czech
Republic

Martin Rulík, Václav Mach, Jana Cupalová, Lenka Brablcová, Iva Buriánková
Lubomír Čáp

(J Environ Sci Eng 10: 43-52)

Running waters as important source of methane emissions to atmosphere: preliminary results from the Sitka stream, Czech Republic

Martin Rulík^{1,2*}, Václav Mach¹, Jana Cupalová¹, Lenka Brablcová¹,
Iva Buriánková¹, Lubomír Čáp³

¹*Department of Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Science, Palacky University, Šlechtitelů 11, CZ-783 71 Olomouc, Czech Republic*

²*Department of Environmental Science, Hankuk University of Foreign Studies (HUFSS), Mohyeon-myeon, Cheoin-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do, 449-791, Korea*

³*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacky University Tř. Svobody 8, CZ-771 46 Olomouc, Czech Republic*

In order to find whether streams might be the important producers of greenhouse gases into the atmosphere, we focused to determine total emissions of CH₄ from a surface water of the small lowland stream in Czech Republic to the atmosphere. We found that vast majority of annual emissions (90 %) was produced in lower, 7 km long stretch of the stream (localities IV-V), which represent only 1/5 of the total calculated area of the stream. Emissions of the methane to the atmosphere are greatest during the spring and summer period when the water temperature is elevated. Totally, more than half tonne of methane was annually emitted to the atmosphere from the stream water level (~ 0.2 km²). Our findings have also revealed occurrence of methanogen archaea in interstitial water along longitudinal stream profile and that percentual proportion of methanogens to DAPI stained bacterial cells did not correspond always to the methane concentration in the interstitial water. Based on our results from a Sitka stream we suppose that due to their numbers and potential area for emitting, the contribution of streams and rivers to the contribution to total methane annual emissions would not be negligible.

Introduction

The hyporheic zone plays a very important role in the processes of self-purification because the river bed sediments are metabolically active and are responsible for retention, storage and mineralization of organic matter transported by the surface water. Hyporheic sediments are characterized by longitudinal/depth physical and chemical gradients, which enable a broad spectrum of metabolic pathways to occur within small spatial scales and imply important biological consequences for the fate of the transported matter. The seemingly well-oxygenated hyporheic zone contains anoxic and hypoxic pockets associated with irregularities in sediment surfaces, small pore spaces or local deposits of organic matter, creating a 'mosaic' structure of various environments, where different microbial populations can live and different microbially mediated processes can occur simultaneously (Baker *et al.* 1999). The extent of aerobic and anaerobic metabolism in streams is of

* Corresponding author
Tel. 031-328-2825, Fax. 031-330-4529
E-mail: martin.rulik@upol.cz

significance not only for the decomposition dynamics, the chemical form and quantity of many nutrients and trace metals, but also for the increase in atmospheric greenhouse gas concentrations and global warming (Houghton *et al.* 2001; Schimel 2004). Since a relatively high production of methane has been measured in river sediments (e.g. Schindler *et al.* 1998; Hlaváčová *et al.* 2005; Sanders *et al.* 2007; Wilcock *et al.* 2008), we proposed that river sediments may act as a considerable source of greenhouse gases (Hlaváčová *et al.* 2006). Methane is the second-most abundant gas containing carbon in the atmosphere and has a greenhouse effect some 20 times greater than that of CO₂, resulting in a significant contribution to the radiative forcing of the atmosphere and global climate changes (Houghton *et al.* 2001). Atmospheric concentration of CH₄ is estimated to be increasing at a rate of ca. 1% per year (Lloyd *et al.* 1995). Freshwater sediments, including wetlands, rice paddies and lakes, are thought to contribute 40 to 50 % of the annual atmospheric methane flux (Cicerone *et al.* 1988). However, in spite anaerobic metabolism has been described in many lake, estuary and wetland sediments, there is still a paucity of information in river ecosystems.

Organic matter decomposition in sediments is an important process in global and local carbon budgets as it ultimately recycles complex organic compounds from terrestrial and aquatic environments to carbon dioxide and methane. Methane is a major component in the carbon cycle of anaerobic aquatic systems, particularly those with low sulfate concentrations. Complex molecules are converted to methane via the co-operative interaction of cellulolytic, fermenting, syntrophic and methanogenic bacteria – and methane is converted back to carbon dioxide by methanotrophic bacteria, and at small rates also by nitrifying bacteria (Conrad 2007). Methane (CH₄) is produced exclusively by methanogenic archaea (e.g. Chaban *et al.* 2006) as a final product of anaerobic respiration and fermentation. Rates of methane production and consumption in sediments are controlled by the relative availability of substrates for methanogenesis (especially acetate or hydrogen and carbon dioxide). The most important immediate precursors of methanogenesis are acetate and H₂/CO₂. During the acetoclastic pathway, CH₄ is produced primarily from the methyl group of acetate. The degradation pathway of polysaccharides, for example, is such that about 2/3 of the produced CH₄ should be derived from acetate and 1/3 from H₂/CO₂ if steady state conditions exist (Conrad 1999). Nevertheless, the contribution of these two precursors can range between 0 and 100 % depending on which methanogenic system is studied. However, the reason for such a large variability is not always obvious. Although methanotrophs can oxidize as much as 100 % of methane production (Le Mer *et al.* 2001), authors monitoring methanotrophy in the riverine ecosystems indicate that CH₄ loss due to microbial consumption are rather less (Zaiss *et al.* 1982; Lilley *et al.* 1996).

Our previous research focused mainly on carbon cycling within Sitka stream hyporheic sediments revealed some interesting trends, perhaps resembling some of the above-described findings. Firstly, we found that occurrence of precursors of sulfate reduction and methanogenesis like lactate and acetate are common even in high aerobic subsurface water of the hyporheic zone (Rulík *et al.* 1998). Employing oligonucleotide RNA-targeted probes (FISH method) we detected relatively high number of methanogenic archaea within hyporheic sediments. While the abundance of sediment-associated Eubacteria (on average 35 % of DAPI-stained cells) declined with depth, Archaea (on average 8% of DAPI-stained cells) showed no gradient in abundance with increasing depth. Our findings confirm that Archaea may occur commonly within well-oxygenated hyporheic sediments (Cupalová *et al.*

Rulík 2007). Following measurement of terminal electron acceptors concentrations in interstitial water showed that both interstitial and surface water were supersaturated with respect to atmosphere (Rulík *et al.* 2000, Hlaváčová *et al.* 2005). In the latter study, we documented the respiration of oxygen, nitrate, sulfate and methanogenesis may simultaneously coexist within the hyporheic zone and that coupling of anaerobic metabolism and methanogenesis appear to be an important pathway in organic carbon cycling in the Sitka stream sediments. Based on our long-term study, we suggested hyporheic sediments to be viewed as a sink for some nutrients (nitrates), while sources of biodegradable DOC for surface stream and gases that are important in global warming (N_2O , CO_2 , CH_4)(Hlaváčová *et al.* 2006).

In order to find whether streams might be the important producers of greenhouse gases into the atmosphere, we focused to examine total annual emissions of CH_4 from surface water of a small lowland stream to the atmosphere.

Material and methods

Study site

The sampling sites are located on the Sitka stream, Czech Republic. The Sitka is an undisturbed, third-order, 35 km long lowland stream originating in the Hrubý Jeseník mountains at 650 m above sea level. The catchment area is 118.81km^2 , geology being composed mainly of Plio-Pleistocene clastic sediments of lake origin covered by quaternary sediments. The mean annual precipitation of the downstream part of the catchment area varies between 500–600 mm. Mean annual discharge is $0,81\text{ m}^3\cdot\text{s}^{-1}$. Sitka stream flows in its upper reach till Šternberk city through forested area with low intensity of anthropogenic effects, while lower course of the stream is naturally meandering through agriculturally intensive managed landscape. Except for short stretches the Sitka stream is unregulated with well-established riparian vegetation. Bottom sediments are composed of gravels in the stream upper parts (grain median size 13 mm) while lower part, several kilometers far from the confluence is characterised by finer sediment having grain median size 2,8 mm. Sitka stream confluences with Oskava stream ca 5 km far north of Olomouc city. More detailed characteristics of the geology, gravel bar, longitudinal physicochemical (e.g. temperature, pH, redox, conductivity, O_2 , CH_4 , NO_3 , SO_4) patterns in the sediments and a schematic view of the site with sampling point positions have been published previously (RULÍK *et al.* 2000, Rulík *et Spáčil* 2004). Earlier measures of a relatively high production of methane, as well as potential methanogenesis, confirmed the suitability of the field sites for the study of methanogens (Rulík *et al.* 2000; Hlaváčová *et al.* 2005, 2006).

Our research intent was assess an amount of gaseous methane emissions that are released by the stream Sitka annually. For the reliable assessment it was necessary to know spatio-temporal variability in the distribution of the emissions produced. We reached this intent by all-season measurement on five localities alongside stream where concentrations of CH_4 were measured in the both surface and interstitial water and emissions from the surface water to atmosphere were measured using floating traps (see below). In order to assess emissions produced from a total stream area, the stream was divided into five stretches according to the channel width, water velocity and substrate composition. For each stretch we then chosen one representative sampling site (locality I-V)(Figs. 1 and 2) where samples of both stream and interstitial waters and sediments, respectively, were repeatedly taken. Localities were chosen in respect to their character and availability by car and measuring

equipments. Numbering of every locality also corresponds to numbering of every stretch. For calculation of whole-stream methane emissions into the atmosphere, the total stream area was derived from summing of 14 partial stretches. The area of these stretches was calculated from known length and mean channel width (measured by a metal measuring type). Longitudinal distance among the stretches was evaluated by using ArcGIS software and GPS coordinates that have been obtained during the field measurement and from digitalised map of the Sitka stream. The total area of the Sitka stream was estimated to be 181 380 m² or 0.18 km². Stretches have differed in their percentual contribution to this total area and also by their total length.

Sample collecting

Hyporheic sediments were collected with a freeze-core using N₂ as a coolant (Bretschko *et* Klemens, 1986). Usually the maximum sediment depth reached by the cores was 50 cm. Immediately after sampling two sediment layers, surface 0–20 cm and 20–50 cm in depth, were separated. These were stored at low temperature whilst being transported to the laboratory. Just after thawing, wet sediment of each layer was sieved and only particles <1 mm were considered for the following measurements since most of the biofilm is associated with this fraction (Leichtfried 1988). Sediment >1 mm remaining in the sieve was dried at 105 °C and subjected to granulometric analysis. Grain size distribution and descriptive sediment parameters were computed using the database SeDi (Schönbauer *et* Lewandowski 1999).

Sample processing

The sediment samples were homogenized by sieving through a sieve (mesh size 1 mm) and only the size fraction < 1 mm of sediment was analysed further. A few randomly selected subsamples (1 cm³) were used for extraction of bacterial cells and, consequently, for estimations of bacterial numbers; other subsamples were used for organic matter content determination etc. Sediment organic matter content was determined by loss of ignition at 550°C Ash Free Dry Weight (AFDW). Organic matter values will then converted to carbon equivalents assuming 45 % carbon content of organic matter.

Fig. 1. Median (P₅₀) sediment grain size (in mm) at study localities with both upper (P₇₅) and lower (P₂₅) quartiles.

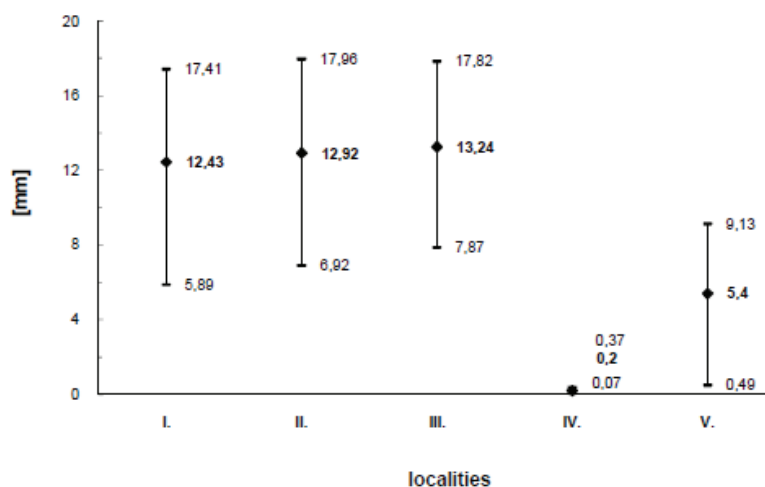
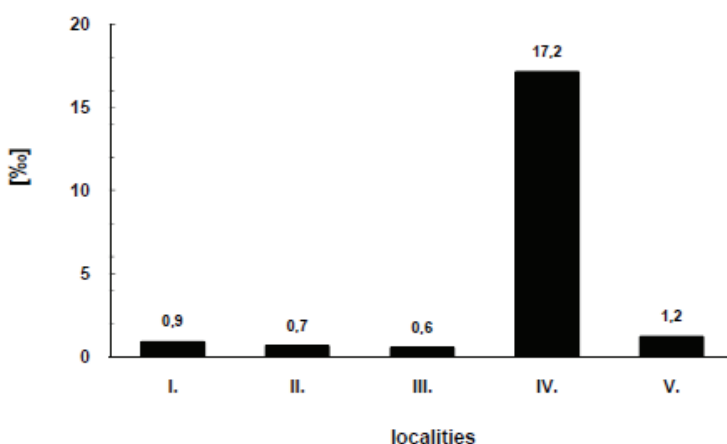


Fig. 2. Concentrations of organic carbon (in ‰) in sediment < 1mm at all study localities



Water samples

Surface water was collected from running water at a depth of 10 cm below the surface level seven times from autumn 2005 to spring 2007 at each study sites. Interstitial water samples were collected using set of 5–6 minipiezometers (Trulleyová *et al.* 2003) placed at a depth of c. 30 cm randomly in sediments two times (spring and summer 2006) at each study sites. The initial 50–100 ml of water was used as a rinse and discarded. Usually, two subsamples of interstitial water from each minipiezometer were collected from a continuous column of water with a 100 ml polypropylene syringe connected to a hard PVC tube, drawn from a minipiezometer and injected into sterile, clear vials (40 ml) with screw-tops, covered by a polypropylene cap with PTFE silicone septa (for analysis of dissolved gasses) and stored before returning to the laboratory. All samples were taken in the morning between 9 a. m. and 14 noon. DOC concentration is measured by Pt-catalysed high temperature combustion on a TOC FORMACSHT analyser. The flow velocity was measured by flowmeter Flomate 200 Masen-McByrney. All measurements were done during the normal discharge levels (i. e. no spates or high flood levels were included).

Measurement of emissions

Gas flux across the air-water interface was determined by the floating chamber method four times during the year period in 2005 – 2006. The open-bottom floating PE chambers (5L cylinders with an area of 0.03 m²) were maintained on the water's surface by a floating body (Styrene) attached to the outside. The chambers (n = 4–5) were allowed to float on the water's surface for a period of 3 hrs. Due to trees on the banks, the chambers at all study sites were continuously in the shade. On each sampling occasion, one ambient air samples were collected for determining the initial background concentrations. Samples of headspace gas were collected through the rubber stopper inserted at the chamber's top, and stored in 100ml PE gas-tight syringes until analysis. Emissions were calculated as the difference between initial background and final concentration in the chamber headspace, and expressed on the 1m² area of the bottom per day according to the formula:

$$F = [(c_I - c_R) * V * 24 / t * 1000] / p \quad (1)$$

where F is a gas flux in $\text{mg}/\text{m}^2/\text{day}$; c_I is a concentration of particular gas in the chamber headspace in $\mu\text{g}/\text{l}$; c_R is a concentration of particular gas in background air; V is volume of the chamber in L ; t is time of incubation in hr ; p is an area of chamber expressed in m^2

Total annual methane emissions were derived from seasonal average, maximum or minimum emissions measured on every locality and extrapolated to the total area of the particular stretch. The total emissions produced by the Sitka stream annually were then calculated according to the following formula:

$$E = (\sum p_i * F_i * 365) / 1\,000\,000 \quad (2)$$

where E is average, maximal or minimal assess of emission of particular gas from the total stream area in kilograms per year; p_i is an area of stretch (in m^2) representing given locality; F_i is average, maximal or minimal assess of emission of methane gas from the given locality, expressed in $\text{mg CH}_4/\text{m}^2/\text{day}$.

Analysis of methane

Concentrations of dissolved trace gases in the stream water were measured directly using a headspace equilibration technique. Dissolved trace gases were extracted from the water by replacing 10 ml of water with synthetic air (N_2) and then vigorously shaking the vials for 15 s (to release the supersaturated gasses from the water to facilitate equilibration between the water and gas phases). All samples were equilibrated with air at laboratory temperature. Methane was analysed from the headspace of the vials by injecting 2ml of air subsample with a gastight syringe into a CHROM 5 gas chromatograph, equipped with the flame ionization detector (CH_4 detection limit = $1\mu\text{g}/\text{l}$) and with the 1.2m PORAPAK Q column (i. d. 3 mm), with nitrogen as a carrier gas. The CO_2 and N_2O subsamples were analysed in the same way using a Becker Gas Chromatograph model 419 equipped with electron capture detector, and with the 2m PORAPAK Q column (i. d. 1.8 mm), with helium as a carrier gas. For gas emission calculation, 2 ml subsamples of headspace air from the static and floating chambers were analysed in the same way as described above. Gas concentration in water was calculated using Henry's law. The saturation ratio, R , was calculated as the measured concentration of gas divided by the concentration in equilibrium with the atmosphere at the temperature of the water sample using the solubility data of Wiesenburg *et* Guinasso (1979), Weiss *et* Price (1980), and Weiss (1974).

Methanogenic potential

Rate of methane production (methanogenesis) was measured using PMP method (Segers 1998). Sediment samples for incubation were collected from I. – IV. study sites at a depth of cca 20-30 cm throughout the March 2007. The sediment was sieved and placed into incubation flasks (incubations started approximately 2 hours after removal of the sediment from the river bed). We used C-amended solutions (flushed for 5 min with N_2) with glucose for the examination of methanogenic potential. All laboratory sediment incubations were performed in 250-ml dark glass flasks, capped with rubber stoppers, using approximately 100 g (wet mass) of

sediment (grain size < 3 mm) and 180 ml of amended solution or distilled water. The headspace was maintained at 20 cm³. Flasks were stored at 20°C in the dark, and incubation time was 72–96 hours; however, subsamples from the headspace atmosphere were taken every 24 hours. Gas production was calculated from the difference between final and initial headspace concentration and volume of the flask; results are expressed per unit dry weight of sediment per day (mg kg⁻¹ DW day⁻¹).

Abundance of bacterial cells and bacterial community composition

For measuring of bacterial parameters, formaldehyde fixed samples (2% final conc.) were firstly mild sonicated for 15 s at power level 2 (sonotroda MS 73, Sonopuls HD2200, Sonorex, Germany), followed by incubation for 30 min under mild agitation with 15 ml of detergent mixture (Tween 20 0,5%, vol/ vol; tetrasodium pyrophosphate 0,1 M; NaCl 9 g.l⁻¹ and distilled water) and density centrifugation. For density centrifugation, the non-ionic medium Nycodenz (1,31 g/ml; Axis- Shield, Oslo, Norway) was used at 4600 G for 60 min (Rotofix 32A, Hettich, Germany). After preparation processes, a 1 ml Nycodenz cushion was placed underneath 1 ml of treated slurry using a syringe needle.

Total bacterial abundance (TBA)

Samples were filtered on membrane filters (0,2 µm GTTP; Millipore Germany), stained for 10 minutes in cold and dark with DAPI solution (0,0063 g/ ml; wt/ vol; Sigma, Germany) and gently rinsed in distilled water and 80% ethanol. Filters were air-dried and fixed in immersion oil. Stained cells were enumerated on an epifluorescence microscope (Olympus BX 60) equipped with a camera (Olympus DP 12) and image analysis software (Lucia 5.0; Laboratory Imaging, Prague, Czech Republic). At least 200 cells within at least 20 microscopic fields were counted in four replicates from each locality. TBAs were expressed as bacterial numbers per 1 g of dry sediments (105°C).

Bacterial community composition

The methanogenic archebacteria were detected using FISH (Fluorescence in situ hybridization) with 16S rRNA – targeted oligonucleotide probe MPB1-methanogen labelled with indocarbocyanine dye (Cy3)(Jupraputtasri *et al.* 2004). The bacteria were hybridized according to the protocol by Pernthaler *et al.* (2001). Briefly, samples were filtered onto polycarbonate membrane filters (0,2 µm GTTP; Millipore), filters were cut into sections and placed on glass slides. For the hybridization mixtures, 2 µl of probe-working solution were added to 16 µl of hybridization buffer in a microfuge tube. Hybridization mix was added to the samples and the slides with filter sections were incubated at 46 ° C for 3 h. After incubation, the sections were transferred into preheated washing buffer (48 °C) and incubated for 15 min in a water bath the same temperature. The filter sections were washed and air-dried. The DAPI staining procedure followed as previously described. Finally, the samples were mounted in a 4:1 mix of Citifluor and Vecta Shield. The methanogens were counted in three replicates from each locality. The relative proportion of methanogens to the total number of DAPI stained bacteria was calculated.

Results

Horizontal patterns of dissolved methane

Highly supersaturated concentrations of methane were found in both surface and interstitial water at every locality along the Sitka stream (Table 1). Average R has usually reflected concentrations of the methane found in both surface and interstitial waters (Table 2). Methane concentrations differed slightly along the longitudinal profile, only exception represents locality IV where huge amount of methane was found, namely in the interstitial water.

Table 1. Comparison of methane concentrations (in $\mu\text{g l}^{-1}$) in surface and interstitial water at various study sites of Sitka. Values are annual means and range; n = number of samples in parenthesis

Locality/Gas	I	II	III	IV	V
Surface CH ₄	1,1 0,5 - 2,44 (n = 5)	0,41 0,18 - 1,04 (n = 5)	1,12 0,4 - 2,11 (n = 7)	11,53 0,22 - 35,47 (n = 6)	9,63 4,66 - 22,3 (n = 6)
Interstitial CH ₄	1,34 0,41 - 2,93 (n = 4)	0,65 0,19 - 1,15 (n = 4)	10,34 0,52 - 69,9 (n = 8)	7260,8 995,31 - 11968,86 (n = 6)	18,38 6,92 - 36,86 (n = 6)

Methane concentrations ranged between 0,18 – 35,47 $\mu\text{g/l}$ in surface water and showed no expected trend of gradual increase from upstream localities to those laying downstream (Table 2). Instead, significant enhancement of CH₄ concentration was found on locality IV and V, respectively. Methane concentrations measured in interstitial water were generally higher compared to those from the surface water, notably at localities IV and V, respectively (Table 1).

Table 2. Saturation ratio R of methane of the Sitka stream (R = measured concentration of the gas in the water divided by the concentration in equilibrium with the atmosphere)

Locality/Location	Saturation ratio R [mean (range)]				
	I	II	III	IV	V
Surface water	17,1 (4,2-47,7)	6,36 (2,6-17,3)	26,7 (5,6-45,9)	267,7 (70,2-797,1)	165,7 (80-312,3)
Interstitial water	29,6 (23,3-35,8)	11,3 (3,3-19,2)	224,6 (16,4-825,5)	146 321 (28 117-194 902)	402,1 (131,3-598,5)

Methanogenic potential

Methanogenic potential varied between 0.55-44.6 $\text{g CH}_4 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ (Tab. 3.) with the highest values found at the 4th site localized the most downstream. These data are comparable to those found in case of either interstitial methane concentrations or methane emissions and indicate that interstitial sediments are able to produce methane.

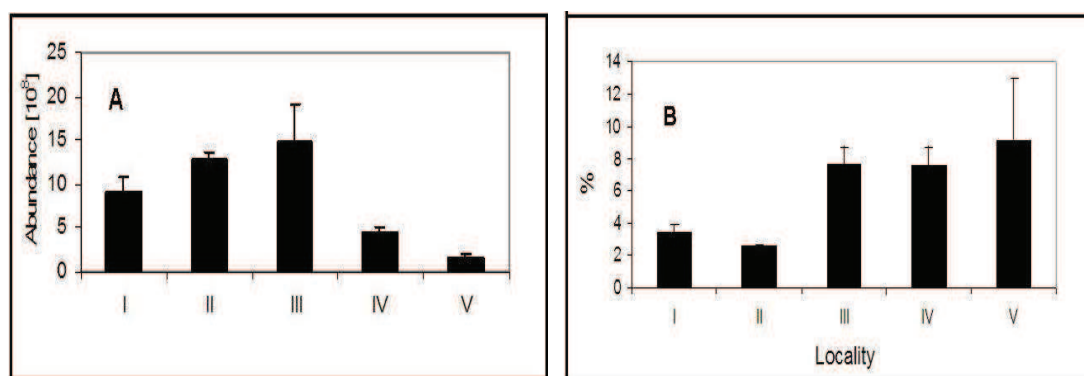
Table 3. Average values of methanogenic potential measured at four localities (n = 3)

Locality	I	II	III	IV
Methanogenic potential ($\mu\text{g CH}_4\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$)	16,6	0,55	44,6	31,7

Total bacterial abundance and proportion of methanogenic archaea to the total bacterial abundance

To support an evidence that methanogenic bacteria may occur in the hyporheic sediments and really contribute to supersaturation of interstitial water with methane at all localities studied we have carried out analyses of hyporheic bacterial communities. The highest bacterial densities were found to be on the locality III ($14,79 \pm 4,38 \cdot 10^8$ cells/ g DW, particles < 1 mm), while the minimum was found on the locality V ($1,63 \pm 0,31 \cdot 10^8$ cells/g DW, particles < 1 mm)(Fig. 3A). Methanogenic archaea have proved right countertendency. Relative proportion of archeal methanogens to the total bacterial counts was found to be the highest on the localities situated downstream with maximum $9,1 \pm 3,8 \%$ being found at locality V (Fig. 3B). However, due to higher total bacterial counts found on the localities from the upper stretch of the Sitka stream, it is clear that number of methanogenic archaea is almost the same at all localities. After recalculation of relative proportion of methanogens to the total bacterial counts, locality III has showed the maximum abundance of methanogens ($1,136 \cdot 10^8$ cells/ gDW, particles < 1 mm).

Fig. 3. The average total bacterial abundance detected by DAPI staining (A), and the relative proportions of methanogen archaea (FISH- targeted cells) to the total bacterial counts found at studied localities (B).



Patterns of emissions

Gaseous methane emissions from surface water to the atmosphere were found at all localities except locality I, where emissions were not measured directly but were calculated lately using a known relationships between concentrations of gases in surface water and their emissions to the atmosphere found at downstream laying localities II-V. Average values of atmospheric concentrations (background) were to some extent similar at all localities and did not vary during the time as well as no clear trend was found along longitudinal profile of the Sitka stream (Table 4).

Table 4. Average values of background atmospheric concentrations for the methane measured at localities II-V. Standard errors and sample size are given in parentheses.

CH ₄ [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	Locality II	Locality III	Locality IV	Locality V
	1,61	1,53	1,48	1,41
	($\pm 0,04$; n = 4)	($\pm 0,12$; n = 4)	($\pm 0,13$; n = 4)	($\pm 0,16$; n = 3)

Methane emissions measured at localities II-V ranged from 0 – 167,35 mg m⁻² day⁻¹ and no gradual increase in downstream end was found in spite of our expectation. However, sharp increase in amount of methane emitted from the surface water was measured at lowermost localities IV and V (Table 5). We found only slight correlation between surface water concentration of methane and measured emissions.

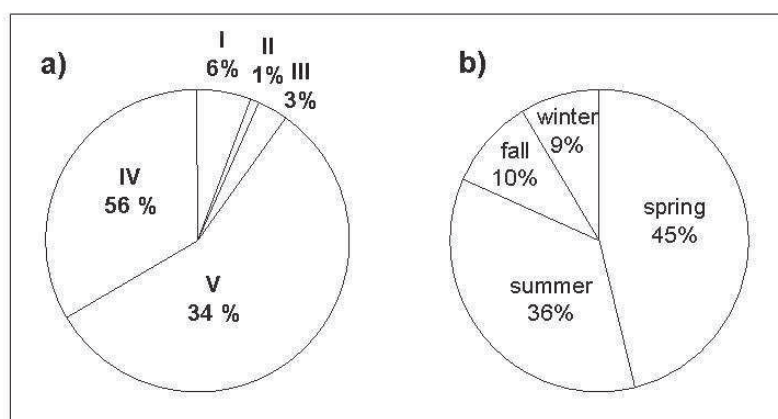
Table 5. Average emissions (CH₄ [$\text{mg/m}^2\text{day}^{-1}$]) to the atmosphere and their range from all localities except locality I. Sample size is in parenthesis. Emissions values for the locality I were calculated using a known relationships between concentrations of gases in surface water and their emissions to the atmosphere found at downstream laying localities II-V

Locality I	Locality II	Locality III	Locality IV	Locality V
	0,25	1,26	32,1	36,27
2,39	0 - 0,6 (n = 9)	0 - 5,01 (n = 10)	7,25 - 87,9 (n = 8)	2,83 - 167,35 (n = 12)

Whole-stream emissions

We estimated that mean annual emission of the methane from the Sitka stream to the atmosphere was 636,7 kg y⁻¹ with minimal and maximal values being 429,6 - 925,1 kg.y⁻¹. A vast majority of annual emissions (90 %) is produced in lower, 7 km long stretch of the stream (localities IV-V; Fig. 4A), which represent only 1/5 of the total estimated area of the stream (= 0.18 km²). Contribution of methane emissions to the total annual methane emissions was found to be the highest during spring-summer period (Fig. 4b).

Fig. 4. Contribution of methane emissions to the atmosphere from different localities (I-V) along the longitudinal profile to the total annual mean emissions of methane gas from the Sitka stream. (a); contribution of methane emissions to the atmosphere from different seasons to the total annual mean emissions of methane gas from the Sitka stream (b)



Discussion

Occurrence of methane in stream water and sediments

In spite of commonly perceived view of streams as well-oxygenated habitats, we found both surface and interstitial water to be supersaturated with methane compared to the atmosphere at all five localities. Emissions of methane from water ecosystems results from complex microbial activity in the carbon cycles (production and consumption processes), which depend upon a large number of environmental parameters such as availability of carbon and terminal electron acceptors, flow velocity and turbulence, water depth. In our previous paper (Hlaváčová *et al.* 2006), we suggested that surface water concentrations, and as a consequence monitored gas emissions resulted from downstream transport of gases by stream water (advection in/out), and moreover, from autochthonous microbial metabolism within the hyporheic zone. If so, surface water is continually saturated by gases produced by hyporheic metabolism, leading to supersaturation of surface water and induced diffusion of these gases out of river water (volatilizing). Moreover, the run-off and drainage of adjacent soils can also contribute greatly to the degree of greenhouse gas supersaturation (De Angelis *et al.* 1987, Kroeze *et al.* 1998; Worrall *et al.* 2005, Wilcock *et al.* 2008). Availability of interstitial habitats for bacteria and archaea carrying out anaerobic processes have been confirmed by our previous and contemporary findings. We found that members of phylogenetic domain Archaea may occur commonly within well-oxygenated hyporheic sediments (Cupalová *et al.* 2007). In addition, during this study we found relatively well developed populations of methanogenic archaea at all localities and all localities also showed positive methanogenic potential (Table 3).

Spatial and temporal distributions of emissions

Our working hypothesis suggested that along with the longitudinal profile of a stream, slope and flow conditions also change together with corresponding settling velocity, sediment composition and organic matter content (Figures 1 and 2). Thus, according to this prediction sediment with prevalence of fine-grained particles containing higher amount of organic matter should dominate at the downstream stretches. Moreover, due to prevalence of anoxic environment, production of methane and its emissions was expected to be also higher here compared to that from upstream stretches. Based on our findings, it seems that this presumption is valid for the methane. However, different situation with high methane concentration in the upstream part with subsequent decline further downstream was reported from USA by Lilley *et al.* (1996).

Flux rates of gaseous emissions into atmosphere depend on partial pressure of particular gas in the atmosphere and its concentration in water, water temperature and further on the water depth and flow velocity. Thus, maximum peak of emissions may be expected during summer period and in well torrential stretch of the river. Distribution of the methane emissions to some extent reflect sediment organic carbon content and interstitial methane concentrations. When consider seasonal distribution of gas emissions, it is clear, in concordance with above mentioned presumption, that majority of methane emissions was released during a warm period of the year (81%). Effect of temperature on methane production was observed in southeastern USA where the most methane released to the atmosphere during warm months (Pulliam 1993). In addition close correlation between methane emissions and temperature was reported also from south part of Baltic Sea; the temperature has been found to be a key factor driving methane emissions (Heyer *et al.* 2000). These findings also

indicate that we should be very careful in making any generalization in total emissions estimation for any given stream or river. Even though some predictions can be made based on gas concentrations measured in the surface or interstitial water, result values may be very different. From this point, noteworthy was locality IV showing highest interstitial methane concentrations. Enormous methane concentrations and saturation ratio R (Table 1 and 2) found in the deep interstitial water were caused probably by very fine, clayed sediment containing high amount of particulate organic carbon, as well as high DOC concentrations. Supersaturation led also to the enrichment of the surface water with methane - such places may be then considered as important methane sources for surface stream and, consequently source of emissions to the atmosphere. On the other hand, high interstitial but low surface water methane concentrations at locality III might be probably explained high oxidation of methane by methanotrophs.

Emissions

Breakdown of organic matter and gas production are both results of well functioned river self-purification. This degrading capacity, however, requires intensive contact of the water with biologically active surfaces. Flow over various morphological features ranging in size from ripples and dunes to meanders and pool-riffle sequences controls such surface-subsurface fluxes. Highly permeable streambeds create opportunities for subsurface retention and long-term storage, and exchange with the surface water is frequent. Thus, study of the methane production within hyporheic zone and its subsequent emission to the atmosphere can be considered as a measure of mineralization of organic matter in the freshwater ecosystem and to used in evaluation of both the health and environmental quality of the rivers studied

Methane released from the sediments into the overlying water column can be consumed by methanotrophs. Although methanotrophs can oxidize as much as 100 % of methane production (Le Mer *et al.* 2001), authors monitored methanotrophy in the riverine ecosystems indicate, that CH₄ loss due to microbial consumption are rather less (Zaiss *et al.* 1982; Lilley *et al.* 1996). According to the season, 13-70 % of methane was consumed in a Hudson River water column (de Angelis *et al.* 1993). For the Sitka stream, unfortunately, similar data are missing so far. High average methane emissions found at the lowermost localities IV and V corresponded to high methane concentrations that had been found in both the interstitial and surface water. Average values of methane emissions on localities IV-V (ca 30 mg CH₄ m² day⁻¹) are similar to values reported for rivers in USA (de Angelis *et al.* 1987, Lilley *et al.* 1995). For example, CH₄ emissions from small streams in Arizona ranged from 1 to 7.6 mg m⁻²d⁻¹ (Jones *et al.* 1995) and calculated CH₄ flux using the large eddy model from Oregon rivers were 1.2– 71 mg m⁻²d⁻¹ (De Angelis *et al.* 1987) and 0–52 mg m⁻²d⁻¹ (Lilley *et al.* 1996). However, our data were on average > 6 times those measured in the Hudson River (de Angelis *et al.* 1993).

Areal view

To our knowledge this is the first attempt focusing on the assessment of whole stream flux of methane emissions to the atmosphere, at least based on a direct measurement of emission fluxes from surface water to the atmosphere. However, the extrapolation of limited data makes it difficult to estimate accurate annual global greenhouse gas emissions to the atmosphere from river ecosystems, particularly due to different methods of measurement used by different authors. For example,

previous data from the the Sitka stream ($\sim 100\text{m}^2$) obtained by the floating chamber method allowed the rough estimation of emissions 0.06, 0.6 and 134.3 kg N_2O , CH_4 and CO_2 per year, respectively, while estimated fluxes across the air-water interface (“large-eddy model”) were 0.5 kg N_2O , 1.4 kg CH_4 and 595 kg CO_2 per year. de Angelis *et* Scranton (1993) reported that a seasonally averaged diffusive flux to the atmosphere from the Hudson River was estimated to be $5.6 \text{ mg } \text{CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, corresponding to an annual flux of $0.76 \times 10^9 \text{ g } \text{CH}_4$. The Hudson River Estuary also releases approximately $0.2 \times 10^9 \text{ g } \text{CH}_4$ annually to nearshore marine waters.

Conclusion

With respect to concern about global warming, we look for possible ways and strategies to mitigate emissions of greenhouse gases, particularly originated from the antropogenic sources (e.g. Milich 1999). However, on the other hand, some natural sources of those gases are totally omitted or as yet we have very scarce information about their role in greenhouse gases production. Extensive effort has been directed towards the identification and quantification of the source strength of greenhouse gas emissions to the atmosphere from a variety of aquatic environments. Running water are not consider to be important source of methane till now, thus, they are not included into the global budget models. However, our results from a Sitka stream suggest that streams and rivers cannot be omitted from those models, even thought they do not reach the values typical for wetlands or rice paddies, for instance. There is worlwide lack in information dealing with methane and other greenhuse gases emissions from the running waters, therefore is not possible to assess their contribution to total greenhouse gases annual emissions. Nevertheless, we can suppose that due to their numbers and potential area for emitting, this contribution would not be negligible. Good example is provided by Sanders *et* al. (2007) who estimated CH_4 emissions from U.K. chalk streams to be in the order of $3.2 \times 10^{-6} \text{ Tg } \text{CH}_4 \text{ year}^{-1}$. Another example comes from much better studied lakes, where one of the assessment suggests the lakes represents 6-16% of the global natural methane emissions and 1,6-9,6% of the total methane emissions (Bastviken *et* al. 2004).

Acknowledgements

This work was supported by Hankuk University of Foreign Studies Research Fund of 2008 and by a grant NPV II 2B06101 (Czech Republic).

References

- Baker, MA, Dahm, CN, Vallet, HM (1999). Acetate retention and metabolism in the hyporheic zone of a mountain stream. *Limnology and Oceanography* 44: 1530 – 1539
- Bastviken, D., Cole, J., Pace, M., Tranvik, L. 2004: Methane emissions from lakes: Dependent of lake characteristics, two regional assessments, and global estimate. *Global Biochem. Cycles*, 18
- Boone DR (1991): Ecology of methanogenes. pp. 57-70. In: Rogers J, Whitman WB (eds.): Microbial production and consumption of greenhouse gases: methane, nitrogen oxides, and halomethanes. American Society for Microbiology, Washington, 298 pp.
- Chaban, B., Ng, S.Y.M., Jarrell, K.F. (2006): Archaeal habitats – from the extreme to the ordinary. *Can. J. Microbiol.* 52: 73-116
- Chanton, J. P., Martens, Ch. S., Kelly, Ch. A. 1989: Gas transport from methane-saturated, tidal freshwater and wetland sediments. *Limnology and Oceanography* 34, 807 – 819.
- Cicerone, R.J., Oremland, R.S. (1988): Biogeochemical aspects of atmospheric methane. *Global Biogeochem. Cycles* 1: 61-86
- Conrad, R. (1999): Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soil and sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28: 193-202
- Conrad, R. (2007): Microbial ecology of methanogens and methanotrophs. pp. 1 – 63. In: *Advances in Agronomy* 96, Elsevier Inc.
- Cupalová, J., Rulík, M. (2007): Bacterial community analysis in river hyporheic sediments – the influence of depth and particle size. *Acta Universitatis Carolinaeana Environmentalica* 21: 47-56
- de Angelis, M. A. et Lilley, M. D. 1987: Methane in surface waters of Oregon eustaries and rivers. *Limnology and Oceanography* 33 (3), 716 – 722
- de Angelis, M. A., Scranton, M. I. (1993): Fate of Methane in the Huson River and Estuary. *Global Biogeochemical Cycles* 7, 509 – 523.
- Heyer, J., Berger, U. (2000): Methane Emissions from the Coastal Area in the Southern Baltic Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 51, 13 – 30
- Hlaváčová, E., Rulík, M., Čáp, L. 2005: Anaerobic microbial metabolism in hyporheic sediment of a gravel bar in a small lowland stream. *River Research and Applications* 21, 1003 – 1011
- Hlaváčová, E., Rulík, M., Čáp, L., Mach, V. 2006: Greenhouse gases (CO₂, CH₄, N₂O) emissions to the atmosphere from a small lowland stream. *Archiv Hydrobiologia* 165, 339 - 353
- Houghton, JT, Ding, Y., Griggs, DJ, Noguer, Van der Linden, PJ and Xiaosu, D. (Eds.) (2001). *Climate Change 2001: The Scientific Basis*. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), J. T. Houghton, Cambridge University Press, UK. pp 944
- Jones, J. B., Holmes, R. M., Fischer, S. G., Grimm, N. B. & Greene, D. M. (1995): Methanogenesis in Arizona, USA dryland streams. – *Biochemistry* 31: 155–173.
- Jones WJ (1991): Diversity and physiology of methanogens. pp. 39 -55. In: Rogers J, Whitman WB (eds.): Microbial production and consumption of greenhouse gases: methane, nitrogen oxides, and halomethanes. American Society for Microbiology, Washington, 298 pp.
- Jupraputtasri W., Cheevadhanarak S., Chaiprasert P., Tanticharoen M., Techkarnjanaruk S. (2004): Use of fluorochrome-labeled rRNA targeted oligonucleotide probe and tyramide signal amplification to improve sensitivity of fluorescence in situ hybridization. *J Microbiol Methods* 61:95-104

- Kroeze, C., Seitzinger, S. P. (1998): The impact of land use on N₂O emissions from watersheds draining into the Northeastern Atlantic Ocean and European Seas. – *Environm. Pollut.* 102: 149–158
- Leichtfried, M. (1988): Bacterial substrates in gravel beds of a second order alpine stream (Project Ritrodat-Lunz, Austria). *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 23: 1325–1332
- Le Mer J., Roger, P. (2001). Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils A review. *Eur. J. Soil. Biol.* 37: 25-50
- Lilley, MD, deAngelis, MA & Olson, JE (1996). Methane concentrations and estimated fluxes from Pacific Northwest rivers. *Mitt Internat Verein Limnol* 25:187-196
- Lloyd, D., Jenkinson, D.S. (1995). The exchange of trace gasses between land and atmosphere. *Trends Ecol. Evol.* 10: 1-3
- Milich L (1999): The role of methane in global warming: where might mitigation strategies be focused? *Global Environmental Change* 9: 179-201
- Pernthaler, J., Glockner, FO, Schnhuber, W. and Amann, R. (2001). Fluorescence in situ hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Methods in Microbiology* 30: 207-225
- Pulliam, W. M. (1993): Carbon dioxide and methane exports from a southeastern floodplain swamp. *Ecol. Monogr.* 63: 29–53
- Rulík, M., Čáp, L., Hlaváčová, E. (2000). Methane in the hyporheic zone of a small lowland stream (Sitka, Czech Republic). *Limnologica* 30: 359 – 366
- Rulík, M., Hekera, P. (1998): Occurrence of both acetic and lactic acids in subsurface water of the bed sediments: comparison of two different localities. pp. 77 - 87. In: Bretschko, G., Helešic, J. (eds.): *Advances in River Bottom Ecology*. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands
- Rulík, M., Spáčil, R. (2004): Extracellular enzyme activity within hyporheic sediments of a small lowland stream.. *Soil Biology & Biochemistry* 36: 1653 – 1662
- Sanders, I.A., Heppell, C.M., Cotton, J.A., Wharton, G., Hildrew, A.G., Flowers, E.J., Trimmer, M. (2007): Emissions of methane from chalk streams has potential implications for agricultural practices. *Freshw. Biol.* 52: 1176-1186
- Segers, R. (1998). Methane production and methane consumption: a review of processes underlying wetland methane fluxes. *Biogeochemistry* 41: 23-51
- Schimel J (2004): Playing scales in the methane cycle: From microbial ecology to the globe. *PNAS* 101,34: 12400-12401
- Schindler, JE, Krabbenhoft, DP (1998). The hyporheic zone as a source of dissolved organic carbon and carbon gases to a temperate forested stream. *Biogeochemistry* 43: 157-174
- Schönbauer, B., Lewandowski, G. (1999): SEDI – a database oriented analysis and evaluation tool for processing sediment parameters. – *J. Biol. Stn. Lunz* 16: 13–27.
- Segers, R. (1998). Methane production and methane consumption: a review of processes underlying wetland methane fluxes. *Biogeochemistry* 41: 23-51
- Truleyová, Š., Rulík, M. & Popelka, J. (2003): Stream and interstitial water DOC of a gravel bar (Sitka stream, Czech Republic): characteristics, dynamics and presumable origin. *Arch. Hydrobiol.* 158: 407–420.
- Tyler SC (1991): The global methane budget. pp. 7-38. In: Rogers J, Whitman WB (eds.): *Microbial production and consumption of greenhouse gases: methane, nitrogen oxides, and halomethanes*. American Society for Microbiology, Washington, 298 pp.
- West JJ, Fiore AM, Horowitz LW, Mauzerall, DL (2006): Global health benefits of mitigating ozone pollution with methane emission controls. *PNAS* 103,11: 3989-3993
- Weiss RF. 1974. Carbon dioxide in water and seawater: the solubility of a non-ideal gas. *Marine Chemistry* 2: 203–215.
- Weiss RF, Price BA. 1980. Nitrous oxide solubility in water and seawater. *Marine Chemistry* 8: 347.

- Wiesenburg DA, Guinasso NL Jr. 1979. Equilibrium solubilities of methane, carbon monoxide, and hydrogen in water and sea water. *Journal of Chemical and Engineering Data* 24: 356–360
- Wilcock, R.J., Sorrell, B.K. (2008): Emissions of greenhouse gases CH₄ and N₂O from low-gradient streams in agriculturally developed catchments. *Water Air Soil Pollut* 188: 155-170
- Worral, F., Lancaster, A. (2005): The release of CO₂ from riverwaters - the contribution of excess CO₂ from groundwater. *Biogeochemistry* 76: 299 317
- Zaiss, U., Winter, P., Kaltwasser, H. (1982). Microbial methane oxidation in the river Saar. *Z. Allgem. Microbiol.* 22: 139-148

IV. Occurrence and diversity of methanogenic archaea detected by FISH and DGGE in stream hyporheic sediment

Lenka Brablcová, Iva Buriánková, Pavlína Badurová, Martin Rulík

(Submitted to *Environ Microbiol*)

Occurrence and diversity of methanogenic archaea detected by FISH and DGGE in stream hyporheic sediment

Lenka Brablcová^{*}, Iva Buriánková, Pavlína Badurová and Martin Rulík

Department of Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Science, Palacky University in Olomouc, Šlechtitelů 11, CZ-783 71 Olomouc, Czech Republic

Summary

The occurrence and diversity of methanogenic archaeal community were analyzed by fluorescence in situ hybridization (FISH) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in hyporheic sediment samples collected from two sediment depths (0-25 cm and 25-50 cm) at five localities along the lowland stream Sitka (Czech Republic). Both methods confirmed the presence of methanogenic archaea at all localities and depths. The proportion of methanogens to the DAPI-stained cells varied among all localities and depths with average value 18.1% (range 4.4 – 31.1%). A total of 19 different bands were observed on the DGGE gel. Cluster analysis of DGGE image showed three main clusters consisting of localities that differed in the amount and similarity of the DGGE bands. Sequencing analysis revealed only two different clones which were affiliated with members of *Methanosarcinales* and *Methanomicrobiales* orders. Our data show that the methanogenic archaea may be important component of hyporheic sediment community and can affect CH₄ cycling in river ecosystem.

Key words: methanogens, hyporheic sediments, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), fluorescence in situ hybridization (FISH), sequencing

^{*} Corresponding author. Mailing address: Department of Ecology and Environmental Sciences - Laboratory of Aquatic Microbial Ecology, Faculty of Science, Palacky University in Olomouc, Šlechtitelů 11, CZ-783 71 Olomouc, Czech Republic. Phone: (420) 585 634 557, Fax: (420) 585 634 553. e-mail: formicula@email.cz

Introduction

The hyporheic zone, volume of saturated sediment beneath and beside streams containing some proportion of water from surface channel, plays a very important role in the processes of self-purification because the river bed sediments are metabolically active and are responsible for retention, storage and mineralization of organic matter (Hendricks, 1993; Jones and Holmes, 1996; Baker et al., 1999; Storey et al., 1999; Fischer et al., 2005). Organic matter decomposition in sediments is an important process in global and local carbon budgets as it ultimately recycles complex organic compounds from terrestrial and aquatic environments to carbon dioxide and methane. Methane is a major component in the carbon cycle of anaerobic aquatic systems. Since a relatively high production of methane has been measured in river sediments (e.g. Schindler and Krabbenhoft, 1998; Hlaváčová et al., 2005; Sanders et al., 2007; Wilcock and Sorrell, 2008), we proposed that river sediments may act as a considerable source of this greenhouse gas which is important in global warming (Hlaváčová et al., 2006).

Methane (CH₄) is produced exclusively by methanogenic archaea as a final product of anaerobic respiration and fermentation (Garcia et al., 2000; Chaban et al., 2006). Methanogenic archaea belonging to the *Euryarchaeota* phylum are divided into five orders: *Methanopyrales*, *Methanococcales*, *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales* and *Methanosarcinales*. Phylogenetic analyses revealed that methanogens can be grouped into two classes. “Class I” methanogens consists of *Methanopyrales*, *Methanobacteriales* and *Methanococcales* orders, and “Class II” is made of *Methanomicrobiales* and *Methanosarcinales* orders (Baptiste et al., 2005).

Methanogens are ubiquitous in anoxic environments and require an extremely low redox potential to grow. They can be found both in moderate habitats such as rice paddies (Grosskopf et al., 1998), soils (Garcia, 1990), lake sediments (Chan et al., 2005), as well as in the gastrointestinal tract of animals (Lin et al., 1997) and in extreme habitats such as hydrothermal vents (Jeanthon et al., 1999) and permafrost soils (Kobabe et al., 2004; Ganzert et al., 2006).

Estimates of methanogens abundance, diversity and phylogenetic composition in natural samples are based on a number of molecular biological techniques. Fluorescence in situ hybridization (FISH) is a powerful technique which allows to detect and identify the community composition directly in environmental samples. FISH is based on the direct microscopic identification of single cells after

hybridization with 16S rRNA targeted fluorescent dye-labelled oligonucleotide probes (Kallistova et al., 2007; Shiraishi et al., 2008).

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) is used to determine the genetic diversity of microbial communities. The procedure is based on electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA fragments in polyacrylamide gels containing a linearly increasing gradient of denaturants. In DGGE, DNA fragments of the same length but with different base-pair sequences can be separated. Separation is based on the electrophoretic mobility of partially melted DNA molecules in a polyacrylamide gel (Fischer and Lerman, 1979; Muyzer et al., 1993).

Based on the previous studies of methane production in Sitka stream (Rulíket al., 2000; Hlaváčová et al., 2005, 2006; Buriánková et al., 2012; Rulík et al., 2012), we have decided to study methanogens occurrence and diversity in two sediment depths (0-25 cm and 25-50 cm sediment layers) at five localities alongside the stream. We have used FISH and DGGE methods for the detection, quantification and assessment of diversity of methanogenic archaea, respectively. In addition, analysis of dissolved methane, potential methane production and other physiochemical parameters (sediment grain size, organic carbon, dissolved oxygen saturation etc.) were measured on studied localities simultaneously. The results presented in this study are a part of a long-term study of organic carbon dynamics and associated microbial communities in hyporheic sediments of Sitka stream, Czech Republic.

Results and discussion

Environmental parameters of the study sites

The interstitial water revealed relatively high dissolved oxygen saturation with the exceptions of localities no. 4 and no. 5, where concentration of dissolved oxygen sharply decreased with the depth, however, never dropped below ~ 10% of the oxygen saturation. Vice versa, these two localities were characterized by much higher concentration of dissolved ferrous iron, dissolved methane concentration and high methanogenic potential compared to those sites located upstream (Table 1). Namely locality no. 4 proved to be a methane pool; methane concentrations in a depth of 40 cm were found to be one order of magnitude greater than those from the depth of 20 cm (Rulík et al., 2012).

Table 1 Selected longitudinal environmental parameters (annual means) of the hyporheic interstitial water and sediment of studied localities

Variable/ Locality	1	2	3	4	5
geographic coordinates	49°49' 27.782" N 17°18' 47.528" E	49°45' 53.953" N 17°19' 5.141" E	49°42' 46.109" N 17°15' 36.225" E	49°40' 43.709" N 17°14' 49.025" E	49°38' 7.977" N 17°14' 37.068" E
dominant substrate composition	gravel	gravel	gravel	sand-clay	gravel-sand
grain median size [mm]	12.4	12.9	13.2	0.2	5.4
organic carbon in sediment < 1 mm [%]	0.9	0.9	0.6	0.8	0.7
interstitial dissolved oxygen saturation [%]	80.5	88.1	82.3	38.5	50.9
ferrous iron [mg /l]	< 1	< 1	1.8	8.1	4.2
interstitial CH ₄ concentration [μg/l]	4.9	0.7	8.1	2 480.2	42.8
methanogenic potential [μg CH ₄ /kg DW/day]	6.6	1.9	2.9	80.7	9.7

Total cell numbers and methanogens proportion

The total cell numbers (DAPI-stained cells, TCNs) of hyporheic sediments < 1 mm varied between $0.3 \pm 0.1 \times 10^6$ and $4.1 \pm 2.2 \times 10^6$ cells per g DW. DAPI-stained cells showed significantly higher average cell numbers in the middle part (localities no. 3 and 4) of the stream ($p < 0.05$). Generally, TCNs were higher in the upper (0 - 25 cm) sediment layer than at greater sediment depth of 25 - 50 cm. The highest TCNs were found in the upper sediment layer at the locality no. 4 (Table 2).

The proportion of methanogens to the DAPI-stained cells was significantly different among all localities ($p < 0.05$). The average proportion of MPB1-hybridized methanogens accounted for 18.1% of the DAPI-stained cells with the range of 4.6 to 31.1 % (Table 2), and much higher signal gave probe MPB1 for the deeper sediment layer ($p < 0.05$).

Table 2 Relative numbers of methanogens detected by FISH and total cell numbers (TCNs) in two sediment depths of studied localities (average \pm SD)

Variable/ Locality	1	2	3	4	5
TCN ^a					
[depth 0-25 cm]	0.8 \pm 0.4	0.5 \pm 0.4	1.9 \pm 1.1	4.1 \pm 2.2	0.6 \pm 0.3
[depth 25-50 cm]	0.3 \pm 0.1	0.4 \pm 0.3	2.2 \pm 0.9	1.6 \pm 0.6	0.8 \pm 0.8
Methanogens ^b					
[depth 0-25 cm]	4.4 \pm 2.2	20.6 \pm 8.2	23.5 \pm 19.4	7.2 \pm 8.1	8.3 \pm 2.7
[depth 25-50 cm]	26.7 \pm 13.5	25.2 \pm 14.2	13.6 \pm 10.3	31.1 \pm 15.5	20.3 \pm 19.9

^a total cell number $\times 10^6$ per g DW

^b percentage [%] of the DAPI-stained cells detected by FISH

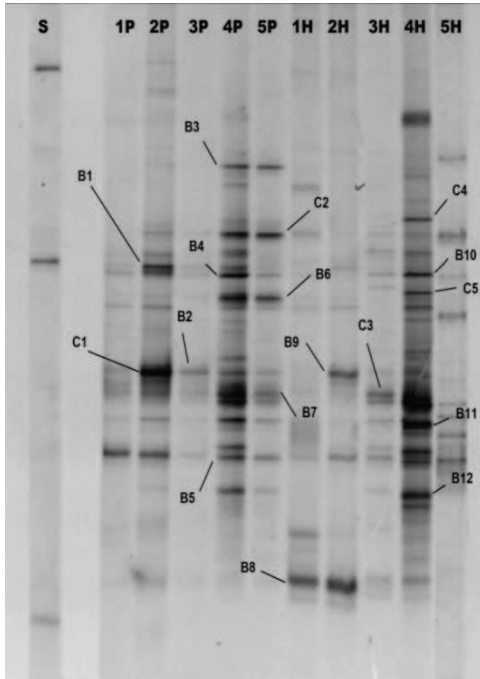
Although the proportion of prokaryotic cells was relatively low in our samples, the number of methanogenic archaea observed in our study is similar to that detected by Kotsyurbenko et al. (2004) in an acidic West-Siberian peat bog. Another studies which revealed the similar methanogens proportion as in our study are presented by Casper et al. (2003) and Kobabe et al. (2004). Rather higher numbers of archaeal cells were mentioned by other authors (Zepp-Falz et al., 1999; Koizumi et al., 2003; Chan et al., 2005).

One might wonder how methanogenic archaea can occur in the river surface sediments fully saturated with dissolved oxygen. One possibility could be the existence of hyporheic microbial biofilm attached to the sediment particles where separated layers allow coexistence and growth of various microorganisms (Koutný and Rulík, 2007). Moreover, river bed sediments are already much more heterogeneous compared to the lake sediments. Environmental characteristics such as distribution of organic matter, and particularly dissolved oxygen may change in the river sediments substantially due to unpredictable movement of the interstitial water. The detailed research of methanogenic archaea detected by FISH analysis is presented in our previous study (Buriánková et al., 2012).

Methanogenic diversity by denaturing gradient gel electrophoresis

Methanogenic archaeal communities associated with hyporheic sediments along the longitudinal stream profile were compared by DGGE analysis either among localities or among different sediment depths. As shown in band pattern (Fig. 1), the presence of DGGE bands in all samples indicates that methanogenic archaea occur at all localities up to 50 cm of the sediment depth. Analysis of DGGE image revealed a total of 73 detectable bands at 19 different positions (Fig. 1). The highest number of bands occurred at locality no. 4 (24 bands), while the lowest number of bands was detected for locality no. 1 (9 bands; Fig. 2A). The highest band richness of locality no. 4 indicates the highest methanogenic diversity at this locality among all localities studied. The relatively high methanogens diversity can be explained likely by most favourable environmental conditions for occurrence of methanogenic archaea at this locality (see Table 1).

Fig. 1 DGGE band pattern obtained from sediment samples of the Sitka stream.

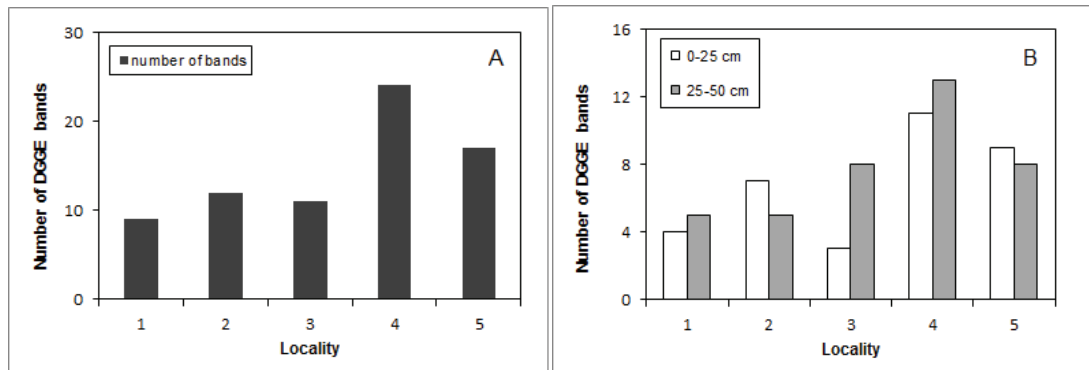


1P – locality 1, layer 0-25 cm; 1H – locality 1, layer 25-50 cm;
2P – locality 2, layer 0-25 cm; 2H – locality 2, layer 25-50 cm;
3P – locality 3, layer 0-25 cm; 3H – locality 3, layer 25-50 cm;
4P – locality 4, layer 0-25 cm; 4H – locality 4, layer 25-50 cm;
5P – locality 5, layer 0-25 cm; 5H – locality 5, layer 25-50 cm;
S – molecular standard
Excised bands are described as C (cloned bands) and B (reamplified bands)

The number of DGGE bands ranged also from 4 to 11 for the samples from upper sediment layer (0 - 25 cm) and from 5 to 13 for the samples from deeper layer (25 - 50 cm), respectively (Fig. 2B). We found no clear trend in the number of DGGE bands with increasing depth (Fig. 2B); in contrast to Huang et al. (2011), who showed that band number of bacterial communities increased with the sediment depth, Pearl River, China.

No one DGGE band appeared in all sediment samples, while unique bands were observed for localities no. 1 (two bands), no. 2 (one band) and locality no. 4 (two bands; Fig. 3). The number of total different bands (i.e. estimated diversity of methanogenic archaeal communities), observed in this study, was comparable with a number of the DGGE bands found in other studies. For example, Ikenaga et al. (2004) found about 15 - 19 DGGE bands in their study of methanogenic archaeal community in rice roots (Japan), Watanabe et al. (2010a) showed 27 bands at different positions in the DGGE band pattern obtained from Japanese paddy field soil and Lee et al. (2012) detected 20 DGGE bands in oxic soil microcosm of paddy field from Japan. Relatively high number of archaeal bands was presented by Bomberg et al. (2011), who detected 35 DGGE bands in mycorrhizal samples of three different trees from boreal forest, Finland.

Fig. 2 Number of DGGE bands associated with hyporheic sediments at two different depths along the longitudinal stream profile. A – Total number of all bands detected at each locality; B – number of bands found at different sediment depths

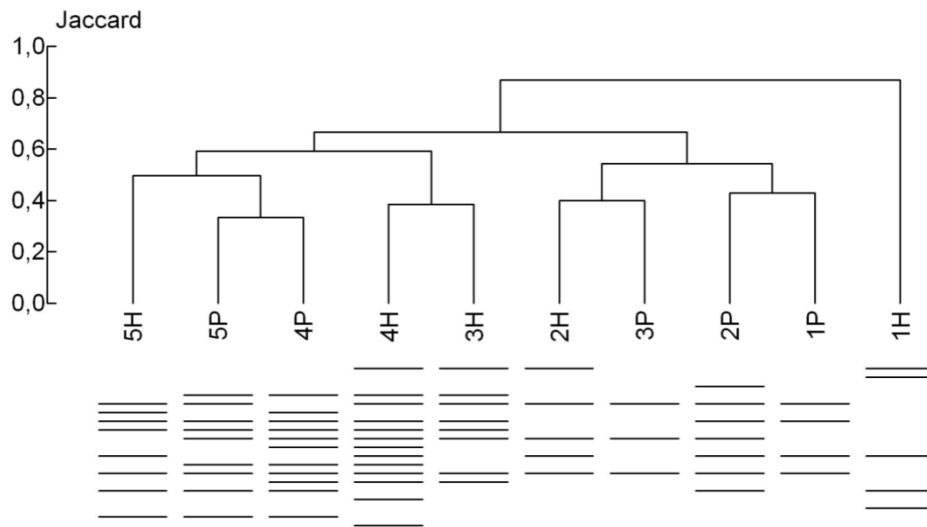


Cluster analysis of DGGE band pattern

Cluster analysis was performed for the DGGE pattern to evaluate the changes in the methanogenic archaeal communities in hyporheic sediments along the longitudinal profile of the Sitka stream. Cluster analysis revealed three main clusters consisting of localities that differ in the amount and similarity of the DGGE bands (Fig. 3). First cluster is composed of localities no. 4 (both sediment layers), no. 5 (both sediment layers) and no. 3 (deeper sediment layer 25 - 50 cm) with notably higher number of DGGE bands (8 - 13); second cluster consists of localities of upper part of the stream - locality no. 1 (upper sediment layer 0 - 25 cm), locality no. 2 (both sediment layers) and locality no. 3 (upper sediment layer 0 - 25 cm); the third cluster is made of the deeper sediment layer of locality no. 1 and stands separately. Both second and third clusters showed less number of bands (3 - 7).

Cluster analysis revealed also the highest Jaccard similarity for upper sediment layers of localities no. 4 and no. 5 among all samples studied. The lowest band sharing to the other sediment samples was detected for the deeper sediment layer of locality no. 1 (Fig. 3).

Fig. 3 Jaccard cluster diagram of DGGE bands from stream hyporheic sediments



In addition, the cluster analysis revealed no depth-specific grouping among all sediment samples, i.e. there is probably no difference in methanogenic diversity between the upper and deeper sediment layer (Fig. 3).

No relationship of sediment depth and methanogenic community is in contrast with study of Watanabe et al. (2010b), who found an archaeal community to be clustered according to two soil depths of paddy fields in Japan.

Analysis of excised bands

In total, 17 excised DGGE bands were sent for sequence analysis (5 cloned bands, 12 reamplified bands). Sequence analysis detected two methanogens affiliated strains belonging to the orders *Methanosarcinales* and *Methanomicrobiales*. Both of the sequences originated from cloned bands (C2 and C4 in Fig. 1).

Although several authors (Watanabe et al., 2004; Ganzert et al., 2006; Bomberg et al., 2011; Lazar et al., 2011; Lee et al., 2012) have used the same method of bands reamplification for obtain the target sequences from excised bands, we received no positive results from sequencing of reamplified bands. These obstacles could be caused by the fact, that the primer pair used did not cover target methanogenic sequences, as did in several studies with research of methanogenic community (Watanabe et al., 2004, 2006, 2007; Ganzert et al., 2006). Moreover, samples originating from locality no. 4 showed no positive affiliation to methanogens, despite the fact, that our previous sequence analysis revealed clones affiliated to

methanogenic archaea (I. Buriánková, unpublished). Another and more probable explanation for negative sequencing results in our study can be the fact, that a single band does not always represent single bacterial strains (Sekiguchi et al., 2001). The authors of the study observed unreadable sequences from repeatedly purified bands. We can confirm their findings, that sequencing analysis failed due to the presence of many ambiguous peaks, although we have repeated DGGE analysis until the desired band appeared to be single.

Even though some of the authors advised the cloning of excised bands (Sun et al., 2011; O'Reilly et al., 2009), the cloning method proved to be not so effective as we expected. A total of 20 selected DGGE bands was cloned into chemically competent *E. coli*. Many of the competent cells with the cloned band fragments did not grow on agar plates, while other clones did not prove specific PCR product; hence only 5 colonies (representing different bands) showed PCR product of desired length and currently particular band position while screened by control DGGE. Only two sequences of the 5 colonies were identified as belonging to particular methanogenic genus or species. The first clone showed 99% similarity to *Methanosarcina* sp. and originated from upper sediment layer of locality no. 5, the second clone was closely related to *Methanosphaerula palustris* (with 93% similarity) and was detected in deeper sediment layer of locality no. 4.

Although *Methanosphaerula palustris* is a member of the order *Methanomicrobiales*, phylogenetic analysis using 16S rRNA and amino acid sequences indicate significant differences from other genera in this order, which has led to the proposition of *Methanosphaerula* as novel genus within *Methanomicrobiales*. Like other members of the order *Methanomicrobiales*, *Methanosphaerula palustris* inhabits peat forming wetlands, more specifically fens and grows only with hydrogen and formate (Cadillo-Quiroz et al., 2009). Contrary *Methanosarcina* sp. (*Methanosarcinales* order) can utilize all methanogenic substrates except formate. The members of genus *Methanosarcina* occur in various types of habitat like freshwater and marine sediments, wetlands, sewage sludge, anaerobic digestors and animal rumens (Whitman et al., 2005).

Our results indicate the presence of both hydrogenotrophic and acetotrophic methanogens in river sediment. This is in accordance with results of our ongoing study on stable carbon isotope signature of methane ($\delta^{13}\text{CH}_4$) originating in hyporheic sediments. We found that both acetoclastic and hydrogenotrophic

pathways take part in the methanogenesis along a vertical profile of the Sitka stream sediments (Rulík et al., 2012).

Overall, the locality no. 4 seems to provide the most favorable conditions prevailing for the methanogens life (lower dissolved oxygen concentration, higher concentration of the ferrous iron, high dissolved methane concentration and a relatively low grain median size; Table 1).

Due to these environmental indicators and previous measurements of methane production (Hlaváčová et al., 2005, 2006; Rulík et al., 2012), currently we have focused our attention to the study of vertical distribution of methanogenic archaea here.

Using fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis with oligonucleotide probes targeting methanogen families *Methanosarcinaceae*, *Methanobacteriaceae* and *Methanosaetaceae* we detected the relatively high abundance of methanogens within the whole vertical sediment profile. The proportion of these groups to the total cell numbers (DAPI counts) varied between 5 - 24% and reached a maximum in the depth of 20 - 30 cm (unpublished data). Although only one methanogens affiliated strain was revealed at this locality by sequencing of DGGE bands, the presence of *Methanomicrobiales* member has been also confirmed by our simultaneous study (I. Buriánková, unpublished). The phylogenetic composition of the methanogenic archaea in hyporheic sediment of locality no. 4 was analyzed by PCR amplification, cloning and sequencing of methyl coenzyme M reductase (*mcrA*) gene and revealed 26 different *mcrA* gene sequences and phylotypes. Though most of the methanogenic sediment community belonged to an uncultured group of methanogens, some of the sequences were related to *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales* and *Methanobacteriales* orders. In addition, more than half of the phylotypes have formed specific river sediment cluster.

In conclusion we confirmed denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to be a powerful tool for detecting methanogens diversity within hyporheic sediments. Combination of DGGE and FISH methods provide us information about methanogenic abundance and composition which may be crucial for an understanding of the methane cycle in stream ecosystems.

Experimental procedures

Study site

The sampling sites are located on the Sitka stream, Czech Republic. The Sitka is an undisturbed, third-order, 35 km long lowland stream originating in the Hrubý Jeseník mountains at 650 m above sea level. The catchment area is 118.81 km², geology being composed mainly of Plio-Pleistocene clastic sediments of lake origin covered by quaternary sediments.

The mean annual precipitation of the downstream part of the catchment area varies from 500 to 600 mm. Mean annual discharge is 0.81 m³/s. The Sitka stream flows in its upper reach through a forested area with a low intensity of anthropogenic effects, while the lower course of the stream naturally meanders through an intensively managed agricultural landscape. River bed sediments are composed of gravels in the upper parts of the stream (grain median size 13 mm) while the lower part is characterized by finer sediment (grain median size 2.8 mm). More detailed characteristics of the study sites are shown in Table 1.

Sample collecting and processing

Five localities (no. 1 – 5) alongside stream profile were chosen for sampling sediment and interstitial water samples. The locality no. 1 is situated in uppermost part of the stream, while locality no. 5 is the most downstream (for the map of the study sites see Buriánková et al., 2012). Hyporheic sediments were collected with a freeze-core using N₂ as a coolant (Bretschko and Klemens, 1986) throughout summer period 2009 and 2010. After sampling, surface sediment layer (0 - 25 cm) and layer of 25 - 50 cm in depth were immediately separated and were stored at a low temperature while being transported to the laboratory. Wet sediment of each layer was sieved and only particles < 1 mm were considered for the following measurements (Leichtfried, 1988). Sediment samples for estimation of total cell numbers and, consequently, for FISH analysis were fixed with paraformaldehyde (2% final conc.). Samples for measurement of organic matter content and determination of methanogenic potential were used immediately and samples for DNA extraction were frozen until used.

Interstitial water samples were collected using a set of 5 - 6 minipiezometers (Trulleyová et al., 2003) randomly placed at depths of about 10 - 50 cm in the sediments at each study site.

Analysis of environmental parameters

The rate of methane production (methanogenic potential) was measured using the PMP method (Segers, 1998). The sediment samples (100 g) with acetate addition were incubated for 72 h at 20°C in the dark. Subsamples were taken every 24 h. Gas production was calculated from the difference between final and initial concentration and expressed per unit dry weight of sediment per day ($\mu\text{g CH}_4/\text{kg DW}/\text{day}$).

Sediment organic matter content was determined by oven-drying at 105°C and subsequent combustion at 550°C for 5 h. Organic matter values were then converted to carbon equivalents and expressed in percentage (protocol by Meyer et al., 1981). Sediment grain size distribution was analyzed from air-dried sediment samples and descriptive parameters were computed using the SeDi database (Schönbauer and Lewandowski, 1999).

Concentrations of dissolved methane in the interstitial water were measured directly using a CHROM 5 gas chromatograph. Gas concentration in water was calculated using Henry's law (protocol by Wiesenburg and Guinasso, 1979; Weiss and Price, 1980; Weiss, 1974). Results were expressed in $\mu\text{g CH}_4$ per liter of water. Dissolved ferrous iron (Fe^{2+}) concentration was measured using absorption spectrophotometry (DR-2000, Hach-Lange, Germany) after reaction with 1,10-phenanthroline. Interstitial dissolved oxygen saturation was measured directly in the field with a portable Hanna HI 9828 pH/ORP/EC/DO multimeter (Fischer Scientific, USA). The detailed protocol of methods described above in Buriánková et al. (2012).

Direct cell counts

For complete removal of cells from the sediment particles, the fixed subsamples were sonicated for 3×30 s at 15% power (sonotroda MS 73, Sonopuls HD 2200, Sonorex, Germany), followed by incubation for 3 h under mild agitation with 10 ml of detergent mixture (Tween 20 0.5%, v/v, 0.1 M tetrasodium pyrophosphate and distilled water) and density centrifugation (protocol by Amalfitano and Fazi, 2008). For density centrifugation, the non-ionic medium Nycodenz (1.31 g/ml, Axis- Shield, Oslo, Norway) was used (Rotofix 32A, Hettich, Germany). 2 ml of Nycodenz was

placed underneath 4 ml of treated sample and centrifuged at 3000 g for 60 min. 2 ml of supernatant was then taken for subsequent analysis.

The supernatants were filtered onto 0.22 µm polycarbonate membrane filters (GTTP, Millipore, France). Filters were then cut into sections and stained for 10 min with DAPI solution (6.3 mg/ml, w/v, Sigma, Germany) in a dark cold place (protocol by Porter and Feig, 1980). After staining the samples were rinsed in distilled water and 80% ethanol, air-dried, mounted onto slides and counted on an epifluorescence microscope (Olympus BX 60, 1 000 × magnification, Olympus corporation, Japan) equipped with a camera (Olympus DP 12). A total of 400 bacterial cells were counted on at least 20 fields in three replicates and expressed per g DW.

Fluorescence in situ hybridization

We have used Cy3-labeled 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe MPB1 5'-CAT GCA CCW CCT CTC AGC-3' (Jupraputtasri et al., 2005) for detection of methanogenic archaea. The cells were hybridized according to the protocol by Pernthaler et al. (2001). The supernatants which were used also for direct counts were filtered onto polycarbonate membrane filters (0.22 µm GTTP, Millipore, France). The filters were then cut into sections and placed on glass slides. For the hybridization mixtures, 2 µl of probe-working solution was added to 16 µl of hybridization buffer into a microtube. Hybridization mix was added to the samples and the slides with filter sections were incubated at 46°C for 3 h. After incubation, the sections were transferred into preheated washing buffer (48°C) and incubated for 15 min in a water bath at the same temperature. The filter sections were washed and air-dried. The DAPI staining procedure followed as previously described. Finally, the samples were mounted in a 4:1 mix of Citifluor and Vecta Shield. The relative proportion of methanogenic archaea to the total number of DAPI stained cells was calculated.

Nucleic acid extraction and PCR reaction

Nucleic acids were extracted from 0.3 g of sieved sediment with a Power Soil DNA isolation kit (MoBio, Carlsbad, USA) according to the manufacturer's instructions. DNA fragments (~350 bp) were amplified by PCR using a primer pair specific for methanogenic archaea. Primer sequences for 16S rDNA fragments are as follows, 0357 F-GC 5'-CCC TAC GGG GCG CAG CAG-3' (GC clamp at 5'-end CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGCGGG GCG GGG GCA CGG GGG G) and 0691 R 5'-

GGA TTA CAR GAT TTC AC-3' (Watanabe et al., 2004). PCR amplification was performed in TC-XP thermal cycler (Bioer Technology, Hangzhou, China) in 50 µl reaction mixture within 0.2 ml, thin walled microtubes. The reaction mixture contained 5 µl of 10 × PCR amplification buffer, 200 µM of each dNTP, 0.8 µM of each primer, 8 µl of template DNA and 5.0 U of FastStart Taq DNA polymerase (Polymerase dNTPack, Roche, Mannheim, Germany). The initial enzyme activation and DNA denaturation were performed for 6 min at 95°C, followed by 35 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 55°C and 2 min at 69°C and a final extension at 69°C for 8 min (protocol by Watanabe et al., 2004). PCR products were visualised by electrophoresis in ethidium bromide stained, 1.5% (w/v) agarose gel.

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

DGGE was performed with an INGENYphorU System (Ingeny, Netherlands). PCR products were loaded onto a 7% (w/v) polyacrylamide gel cast in 1× TAE (40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA, pH 7.4). The polyacrylamide gels (acrylamide: bisacrylamide, 37.5:1) were made with denaturing gradients ranging from 45 to 60%. 100% denaturant contained 7 M urea and 40% formamide. Electrophoresis was initially run at 110V for 10 min at 60°C, and afterwards for 15 h at 85 V. After electrophoresis, the gels were stained for 60 min with SYBR Green I nucleic acid gel stain (1:10 000 dilution, Lonza, Rockland, USA). DGGE gel was then photographed under UV illuminator (Molecular Dynamics). Images were arranged by image analysis software (NIS Elements, Czech Republic) and analyzed by programme Gel2K (University of Bergen, Norway).

Excising the bands

DGGE bands were excised from gel using a sterile scalpel blade. The bands were incubated in 40 µl of molecular grade water overnight at 4°C. The supernatants were then used for reamplification and individual bands were verified by a subsequent DGGE analysis. Isolated bands from second (some of them from the third) DGGE gel were excised and reamplified using the primer pair (0357 F and 0691 R) without a GC-clamp (protocol by Watanabe et al., 2004; Huang et al., 2011). The PCR products were purified (Qia Quick prep kit, Qiagen, Netherlands) and then sent for sequence analysis to Macrogen company (Seoul, Korea).

Alternatively, the DGGE band fragments from prior gel were reamplified and cloned using TOPO TA Cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) following the

manufacturer's instructions. Positive colonies were verified onto second DGGE gel and plasmids were then extracted using UltraClean 6 Minute Plasmid Prep Kit (MoBio, Carlsbad, USA). The obtained clones were determined by sequencing as described above.

Raw sequences obtained after sequencing were analyzed by BLAST software to search for the sequence identity among other methanogen sequences available in the GenBank database.

Statistics

The analyses were performed using statistical software R version 2.6.0. and GLM (General linear models). Total cell numbers (TCNs) and values of methanogens detected by FISH were analyzed by a Negative Binomial Model and Wilcoxon signed rank sum test. All tests were considered significant at probability level $p < 0.05$.

DGGE band pattern was analyzed using Gel2K software (Svein Norland, Dept. of Biology, University of Bergen, Norway) to produce a binary file of banding patterns. A Jaccard similarity tree based on these binary files was constructed using a CLUSTER programme packaged with a Gel2K software.

Acknowledgements

This work was supported by the Czech Grant Agency grant 526/09/1639. We thank Václav Mach for analyses of dissolved methane and methanogenic potential and Jan Šipoš is acknowledged for statistic analysis. Authors confirm, that there is no conflict of interest related to the work described in this study.

References

- Amalfitano, S., and Fazi, S. (2008) Recovery and quantification of bacterial cells associated with streambed sediments. *J Microbiol Methods* 75: 237-243.
- Baker, M.A., Dahm, C.N., and Vallet, H.M. (1999) Acetate retention and metabolism in the hyporheic zone of a mountain stream. *Limnol Oceanogr* 44: 1530-1539.
- Baptiste, E., Brochier, C., and Boucher, Y. (2005) Higher-level classification of the Archaea: evolution of methanogenesis and methanogens. *Archaea* 1: 353-363.
- Bomberg, M., Munster, U., Pumpanen, J., Ilvesniemi, H., and Heinonsalo, J. (2011) Archaeal Communities in Boreal Forest Tree Rhizospheres Respond to Changing Soil Temperatures. *Microb Ecol* 62: 205-217.
- Bretschko, G., and Klemens, W.E. (1986) Quantitative methods and aspects in the study of the interstitial fauna of running waters. *Stygologia* 2: 297-316.
- Buriánková, I., Brablcová, L., Mach, V., Hýblová, A., Badurová, P., Cupalová, J., et al. (2012) Methanogens and methanotrophs distribution in the hyporheic sediments of a small lowland stream. *Fundam Appl Limnol* 181 (2): 87-102, in press.
- Casper, P., Chan, O.C., Furtado, A.L.S., and Adams, D.D. (2003) Methane in an acidic bog lake: The influence of peat in the catchment on the biogeochemistry of methane. *Aquat Sci* 65: 36-46.
- Cadillo-Quiroz, H., Yavitt, J.B., and Zinder S.H. (2009) *Methanosphaerula palustris* gen. nov., sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen isolated from a minerotrophic fen peatland. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 928-935.
- Chaban, B., Ng S.Y.M., and Jarrell, K.F. (2006) Archaeal habitats – from the extreme to the ordinary. *Can J Microbiol* 52: 73-116.
- Chan, O.C., Klaus, P., Casper, P., Ulrich, A., Lueders, T., and Conrad, R. (2005) Vertical distribution of methanogenic archaeal community in Lake Dagow sediment. *Environ Microbiol* 7: 1139-1149.
- Dhillon, A., Lever, M., Lloyd, K.G., Albert, D.B., Sogin, M.L., and Teske, A. (2005) Methanogen Diversity Evidenced by Molecular Characterization of Methyl Coenzyme M Reductase A (*mcrA*) Genes in Hydrothermal Sediments of the Guaymas Basin. *Appl Environ Microbiol* 71: 4592-4601.
- Earl, J., Hall, G., Pickup, R.W., Ritchie, D.A., and Edwards, C. (2003) Analysis of Methanogen Diversity in a Hypereutrophic Lake Using PCR-RFLP Analysis of *mcr* Sequences. *Microb Ecol* 46:270-278.
- Fischer, S.G., and Lerman, L.S. (1979) Length-independent separation of DNA restriction fragments in two dimensional gel electrophoresis. *Cell* 16:191-200.
- Fischer, H., Kloep, F., Wilczek, S., and Pusch, M.T. (2005) A river's liver - microbial processes within the hyporheic zone of a large lowland river. *Biogeochemistry* 76: 349-371.
- Ganzert, L., Jürgens, G., Münster, U., and Wagner, D. (2006) Methanogenic communities in permafrost-affected soils of the Laptev Sea coast, Siberian Arctic, characterized by 16S rRNA gene fingerprints. *FEMS Microbiol Ecol* 59: 476-488.
- Garcia, J.L. (1990) Taxonomy and ecology of methanogens. *FEMS Microbiol Rev* 87: 297-308.

- Garcia, J.L., Patel, B.K.C., and Ollivier, B. (2000) Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe* 6: 205-226.
- Großkopf, R., Janssen, P.H., and Liesack, W. (1998) Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Appl Environ Microbiol* 64: 960-969.
- Hendricks, S.P. (1993) Microbial ecology of the hyporheic zone: a perspective integrating hydrology and biology. *J N Am Benthol Soc* 12 (1): 70-78
- Hlaváčová, E., Rulík, M., and Čáp, L. (2005) Anaerobic microbial metabolism in hyporheic sediment of a gravel bar in a small lowland stream. *River Res Appl* 21: 1003-1011.
- Hlaváčová, E., Rulík, M., Čáp, L., and Mach, V. (2006) Greenhouse gases (CO₂, CH₄, N₂O) emissions to the atmosphere from a small lowland stream. *Arch Hydrobiol* 165: 339-353.
- Huang, S., Chen, C., Wu, Y., Wu, Q., and Zhang, R. (2011) Characterization of depth-related bacterial communities and their relationships with the environmental factors in the river sediments. *World J Microbiol Biotechnol* 27: 2655-2664.
- Ikenaga, M., Asakawa, S., Muraoka, Y., and Kimura, M. (2004) Methanogenic archaeal communities in rice roots grown in flooded soil pots: Estimation by PCR-DGGE and sequence analyses. *Soil Sci Plant Nutr* 50: 701-711.
- Jeanthon, C., L'Haridon, S., Reysenbach, A.L., Corre, E., Vernet, M., and Messner, P. (1999) *Methanococcus vulcanius* sp. nov., a novel hyperthermophilic methanogen isolated from East Pacific Rise, and identification of *Methanococcus* sp. DSM 4213T as *Methanococcus fervens* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 49: 583-589.
- Jones, J.B., and Holmes Jr., R.M. (1996) Surface-subsurface interactions in stream ecosystems. *TREE* 11 (6): 239-242.
- Juprapattasri, W., Boonapatcharoen, N., Cheevadhanarak, S., Chairasert, P., Tanticharoen, M., and Techkarnjanaruk, S. (2005) Use of an alternative Archaea-specific probe for methanogen detection. *J Microbiol Methods* 61: 95-104.
- Kallistova, A.Y., Kevbrina, M.V., Nekrasova, V.K., Shnyrev, N.A., Einola, J.K.M., Kulomaa, M.S., et al. (2007) Enumeration of methanotrophic bacteria in the cover soil of an aged municipal landfill. *Microb Ecol* 54: 637-645.
- Kobabe, S., Wagner, D., and Pfeifer, E.M. (2004) Characterisation of microbial community composition of a Siberian tundra soil by fluorescence in situ hybridization. *FEMS Microbiol Ecol* 50: 13-23.
- Koizumi, Y., Takii, S., Nishino, M., and Nakajima, T. (2003) Vertical distribution of sulfate-reducing bacteria and methane-producing archaea quantified by oligonucleotide probe hybridization in the profundal sediment of a mesotrophic lake. *FEMS Microbiol Ecol* 44: 101-108.
- Kotsyurbenko, O.R., Chin, K.J., Glagolev, M.V., Stubner, S., Simankova, M.V., Nozhevnikova, A.N., and Conrad, R. (2004) Acetoclastic and hydrogenotrophic methane production and methanogenic populations in an acidic West-Siberian peat bog. *Environ Microbiol* 6: 1159-1173.

- Koutný, J., and Rulík, M. (2007) Hyporheic biofilm particulate organic carbon (BPOC) in a small lowland stream Sitka (Czech Republic): structure and distribution. *Int Rev Hydrobiol* 92: 402-412.
- Lazar, C.S., Parkes, R.J., Cragg, B.A., L'Haridon, S., and Toffin, L. (2011) Methanogenic diversity and activity in hypersaline sediments of the centre of the Napoli mud volcano, Eastern Mediterranean Sea. *Environ Microbiol* 13(8): 2078-2091.
- Lee, G.C., Watanabe, T., Murase, J., Asakawa, S., and Kimura, M. (2012) Growth of methanogens in an oxic soil microcosm: Elucidation by a DNA-SIP experiment using ¹³C-labeled dried rice callus. *Appl Soil Ecol* 58: 37-44.
- Leichtfried, M. (1988) Bacterial substrates in gravel beds of a second order alpine stream (Project Ritrodat-Lunz, Austria). *Verh Internat Verein Limnol* 23: 1325-1332.
- Lin, C., Raskin, L., and Stahl, D.A. (1997) Microbial community structure in gastrointestinal tracts of domestic animals: comparative analyses using rRNA-targeted oligonucleotide probes. *FEMS Microbiol Ecol* 22: 281-294.
- Luton, P.E., Wayne, J.M., Sharp, R.J., and Riley, P.W. (2002) The mcrA gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology* 148: 3521-3530.
- Meyer, J.L., Likens, G.E., and Sloane, J. (1981) Phosphorus, nitrogen, and organic carbon flux in a headwater stream. *Arch Hydrobiol* 91: 28-44.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., and Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturant gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59: 695-700.
- O'Reilly, J., Lee, C., Collins, G., Chinalia, F., Mahonony, T., and O'Flaherty, V. (2009) Quantitative and qualitative analysis of methanogenic communities in mesophilically and psychrophilically cultivated anaerobic granular biofilms. *Water Res* 43: 3365-3374.
- Pernthaler, J., Glöckner, F.O., Schönhuber, W., and Amann, R.L. (2001) Fluorescence in situ hybridization. In Paul, J. (ed.) *Methods in Microbiology- Marine Microbiology*. Academic Press Ltd., London, UK, vol. 30.
- Porter, K.G., and Feig, Y.S. (1980) The Use of DAPI for Identifying and Counting Aquatic Microflora. *Limnol Oceanogr* 25: 943-948.
- Ramakrishnan, B., Leuders, T., Dunfield, P.F., Conrad, R., and Friedrich, M.V. (2001) Archaeal community structure in rice soils from different geographical regions before and after initiation of methane production. *FEMS Microbiol Ecol* 37: 175-186.
- Rulík, M., Čáp, L., and Hlaváčová, E. (2000) Methane in the hyporheic zone of a small lowland stream (Sitka, Czech Republic). *Limnologica* 30: 359-366.
- Rulík, M., Bednařík, A., Mach, V., Brablcová, L., Buriánková, I., Badurová, P., and Gratzová, K. (2012) Methanogenic system of a small lowland stream Sitka, Czech Republic. In Matovic, M.D. et al. (eds.). *Biomass/Book 2*, chapter XX (in press).
- Sanders, I.A., Heppell, C.M., Cotton, J.A., Wharton, G., Hildrew, A.G., Flowers, E.J., and Trimmer, M. (2007) Emissions of methane from chalk streams has potential implications for agricultural practices. *Freshwat Biol* 52: 1176-1186.
- Schindler, J. E., and Krabbenhoft, D.P. (1998) The hyporheic zone as a source of dissolved organic carbon and carbon gases to a temperate forested stream. *Biogeochemistry* 43: 157-174.

- Schönbauer, B., and Lewandowski, G. (1999) SEDI – a database oriented analysis and evaluation tool for processing sediment parameters. *J Biol Stn Lunz* 16: 13-27.
- Segers, R. (1998) Methane production and methane consumption: a review of processes underlying wetland methane fluxes. *Biogeochemistry* 41: 23-51.
- Sekiguchi, H., Tomioka, N., Nakahara, T., and Uchiyama, H. (2001) A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Biotechnol Lett* 23: 1205-1208.
- Shiraishi, F., Zippel, B., Neu, T.R., and Arp, G. (2008) In situ detection of bacteria in calcified biofilms using FISH and CARD-FISH. *J Microbiol Methods* 75:103-108.
- Smith, J.M., Castro, H., and Ogram, A. (2007) Structure and Function of Methanogens along a Short-Term Restoration Chronosequence in the Florida Everglades. *Appl Environ Microbiol* 73: 4135-4141.
- Storey, R.G., Fulthorpe, R.R., and Williams, D.D. (1999) Perspectives and predictions on the microbial ecology of the hyporheic zone. *Freshwat Biol* 41: 119-130.
- Sun, F.L., Wang, Y.S., Wu, M.L., Wang, Y.T., and Li, Q.P. (2011) Spatial heterogeneity of bacterial community structure in the sediments of the Pearl River estuary. *Biologia* 66 (4): 574-584.
- Trulleyová, Š., Rulík, M., and Popelka, J. (2003) Stream and interstitial water DOC of a gravel bar (Sitka stream, Czech Republic): characteristics, dynamics and presumable origin. *Arch Hydrobiol* 158: 407-420.
- Watanabe, T., Asakawa, S., Nakamura, A., Nagaoka, N., and Kimura, M. (2004) DGGE method for analyzing 16S rDNA of methanogenic archaeal community in paddy field soil. *FEMS Microbiol Lett* 232: 153-163.
- Watanabe, T., Kimura, M., and Asakawa, S. (2006) Community structure of methanogenic archaea in paddy field soil under double cropping (rice-wheat). *Soil Biol Biochem* 38: 1264-1274.
- Watanabe, T., Kimura, M., and Asakawa, S. (2007) Dynamics of methanogenic archaeal communities based on rRNA analysis and their relation to methanogenic activity in Japanese paddy field soils. *Soil Biol Biochem* 39: 2877-2887.
- Watanabe, T., Hosen, Y., Agbisit, R., Llorca, L., Fujita, D., Asakawa, S. and Kimura, M. (2010a) Changes in community structure and transcriptional activity of methanogenic archaea in a paddy field soil brought about by a water-saving practice – Estimation by PCR -DGGE and qPCR of 16S rDNA and 16S rRNA. In 19th World Congress of Soil Solutions for a Changing World. Brisbane, Australia, pp. 5-8.
- Watanabe, T., Wang, G., Taki, K., Ohashi, Y., Kimura, M., and Asakawa, S. (2010b) Vertical changes in bacterial and archaeal communities with soil depth in Japanese paddy fields. *Soil Sci Plant Nutr* 56: 705-715.
- Weiss, R.F. (1974) Carbon dioxide in water and seawater: the solubility of a non-ideal gas. *Mar Chem* 2: 203-215.
- Weiss, R.F., and Price, B.A. (1980) Nitrous oxide solubility in water and seawater. *Mar Chem* 8: 347.
- Whitman, W.B., Bowen, T.L., and Boone D.R. (2005) The Methanogenic Bacteria. In *The Prokaryotes: Vol. 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*. In Dworkin, M. et al. (eds.). New York, USA: Springer-Verlag, pp. 165–208.

- Wiesenburg, D.A., and Guinasso Jr., N.L. (1979) Equilibrium solubilities of methane, carbon monoxide, and hydrogen in water and sea water. *J Chem Eng Data* 24: 356-360.
- Wilcock, R.J., and Sorrell, B.K. (2008) Emissions of greenhouse gases CH₄ and N₂O from low-gradient streams in agriculturally developed catchments. *Water Air Soil Pollut* 188: 155-170.
- Zepp-Falz, K., Holliger, C., Grosskopf, R., Liesack, W., Nozhevnikova, A. N., Müller, B., Wehrli, B., and Hahn, D. (1999) Vertical distribution of methanogens in the anoxic sediment of Rotsee (Switzerland). *Appl Environ Microbiol* 65: 2402-2408.

V. Mikrobiální biofilmy tekoucích vod

Lenka Brablcová, Iva Buriánková, Martin Rulík

(Zborník prednášok a posterov, Konferencie Mikrobiológia vody 2009; pp. 42-49)

Mikrobiální biofilmy tekoucích vod

Lenka Brablcová, Iva Buriánková, Martin Rulík

Katedra ekologie a životního prostředí, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 11, Olomouc, 783 71, Česká republika; formicula@email.cz, ivaburiankova@seznam.cz

Úvod

Bakteriální společenstva v tekoucích i stojatých sladkých vodách jsou v posledních letech stále častějším předmětem mikrobiálně-ekologických studií na celém světě. Pozornost se však od volné a průlinové vody obrací zejména ke společenstvům biofilmu, tj. takovým, které tvoří povlaky částic sedimentů, kamenů, kořenů a různých jiných předmětů, vyskytujících se ve vodním prostředí. Tato biofilmová kultura se také vyskytuje na povrchích částic (agregátů), které jsou unášeny vodou a nemají tak statický charakter jako již výše zmíněné typy biofilmu. Částice jsou jak „útočištěm“ tak i primárním „dopravním prostředkem“ pro svou mikrobiální komunitu a můžeme tedy říci, že se jedná o tzv. *mobilní typ biofilmu* (Grossart et al. 2003).

Existuje celá řada definicí biofilmu, obecně jej lze charakterizovat jako mikrobiální přisedlé společenstvo (bakterií, řas, hub, prvoků), tvořené buňkami ireverzibilně přichycenými k substrátu nebo k sobě vzájemně. Jsou ukotveny v základu, tzv. extracelulární matrix, tvořené extracelulárními polymery- produkty metabolismu mikrobiálních organismů (Donlan et Costerton 2000).

Důvodů, proč je vedle biofilmů humánních (na endoprotézách, povrchu zubů, apod.) velká pozornost věnována právě biofilmům vodního prostředí, je několik, tím nejzávažnějším je znehodnocování vodních zdrojů nežádoucími a toxickými látkami a rostoucí tlak na vývoj účinnějších metod jejich dekontaminace.

Na Univerzitě Palackého v Olomouci se mikrobiální výzkum vod začal zaměřovat zejména na biofilmová společenstva sedimentů. Až později byl výzkum rozšířen i na říční a jezerní agregáty s mobilní formou biofilmu a biofilmu na plavených kořenech stromů a kamenů.

Z konkrétních analýz jsme se zaměřili především na využití fluorescenčních barviv, a to jak pro účely stanovení celkového bakteriálního oživení (DAPI), tak pro zjištění taxonomického složení biofilmových společenstev (barvivo Cy3 při fluorescenční hybridizaci - FISH). Dále nás zajímala problematika hydrolytické a respirační aktivity mikrobiálního společenstva. K určení metabolických aktivit jsme použili metodu využívající absorpční vzorků k vyjádření množství produktu, který vznikl činností enzymů bakterií rozkládajících daný substrát. Jako substrát byl pro enzymatickou aktivitu zvolen FDA a u respirační aktivity INT. U všech typů biofilmu a filtrátu bylo také sledováno množství chl *a*.

Informace získané při tomto výzkumu nám pomohou lépe porozumět procesům, které v biofilmu jako centru mineralizace probíhají. Srovnání různých typů biofilmových společenstev a volné vody může být zase vodítkem při vysvětlení některých shodných či naopak odlišných parametrů a procesů, jež tato prostředí charakterizují.

Metodika

Na lokalitě řeky Bystřice, v blízkosti Domašova nad Bystřicí, byly odebrány vzorky

sedimentu, kamenů, plavených kořenů stromů a říční vody, z níž byly analyzovány agregáty s formou mobilního biofilmu a bakterie volně rozptýlené ve vodním sloupci. Vzorky říční vody byly filtrovány pro potřebu oddělení agregátů od volných bakterií. Část filtrů i filtrátů byla ihned použita pro stanovení hydrolytické a respirační aktivity pomocí FDA a INT, druhá část byla fixována a následně v ní byla stanovena celková bakteriální abundance (DAPI) a fylogenetické složení bakteriálního společenstva fluorescenční hybridizací in situ (FISH).

Stejně jako u filtrů a filtrátů byla u první části sedimentu a kamenů stanovena hydrolytická a respirační aktivita a druhá část byla opět fixována a užita k pozdější analýze bakteriální abundance a fylogenetického složení bakteriálního společenstva.

Kořeny stromů s biofilmovými společenstvy na povrchu byly nejprve nařezány na přiměřeně velké kousky (cca 1 cm) a u nich provedeny všechny výše uvedené analýzy

Pro kvantifikaci autotrofní složky byla použita metoda extrakce chlorofylu *a* do extrakční směsi a následné vyhodnocení ve spektrofotometru (Pechar 1987).

U většiny typů biofilmu bylo nezbytné zařadit před aplikací vlastních detekčních látek minimálně sonifikaci (tj. přiměřené působení ultrazvuku) a následně hustotní centrifugaci (s hustotním médiem Nycodenz), tedy metody, které oddělí partikule od bakterií.

Barvení DAPI je poměrně rychlé, barvivo působí pouze po dobu 10 min v chladu a temnu, následně je vymyto destilovanou vodou a ethanolem, filtr je usušen a imerzním olejem ukotven na sklíčku. DAPI má modrou fluorescenci a váže se na DNA (postup dle Porter et Feig 1980)

FISH má dvě základní fáze, v první jsou buňky s roztokem próby hybridizovány při teplotě 46°C po dobu 3 hodin v tzv. hybridizační peci a následně je nenavázaná nebo nespecificky navázaná próba vymyta „pracím“ pufrem. Tato část zajistí spojení prób, tedy uměle syntetizovaných sekvencí oligonukleotidů značených fluorescenčním barvivem Cy3, s komplementárními cílovými úseky. Tyto cílové úseky jsou přitom vybrány tak, aby představovaly specifickou část genomu určitého taxonu, tudíž platí co próba, to jiný taxon. Ve druhé fázi je na vzorky, které prošly barvením próbami, aplikováno ještě DAPI, jehož použití je v případě metody FISH nezbytné pro určení podílu buněk označených próbou na jejich celkovém počtu (dle Cotrell et Kirchman 2003). Cílem naší detekce bylo 7 fylogenetických skupin a to pro domény *Eubacteria* (EUB), *Archaea* (ARCH) a skupiny alfa(α)-, beta(β)-, gama (γ)-, delta (δ)-*proteobacteria* a skupinu *Cytofaga-Flavobacterium* (CF).

K určení hydrolytické aktivity se osvědčila metoda využívající absorbanci vzorků k vyjádření množství produktu, který vzniká díky činnosti bakteriálních enzymů. Jako substrát zde byl zvolen fluorescein-diacetát (FDA), což je původně nefluoreskující, nepolární derivát, který snadno proniká buněčnou membránou. Po vstupu do buňky je hydrolyzován nespecifickými enzymy (esterázami), které štěpí esterovou vazbu FDA a uvolňují z něj fluorescein, který emituje světlo při vystavení UV- záření. Zjištěné hodnoty absorbance byly porovnány s kalibrační křivkou fluoresceinu a ze zjištěných hodnot byla poté vypočtena hydrolytická aktivita (dle Battin 1997).

Pro vyjádření respirační (ETS) aktivity jsme použili analogickou metodu jako u aktivity hydrolytické, ovšem před samotnou aplikací substrátu (INT- iodo-nitro-tetrazolium chlorid) bylo třeba aplikovat roztok s elektronovými přenašeči (NADH, NADPH), které usnadňují probíhající reakci. INT je bezbarvá látka, která má schopnost prostupovat membránou a produkuje červeně fluoreskující produkt (formazán), pokud je redukována elektron-transportním systémem bakteriální buňky. Redukce INT je použita jako indikátor aktivity dehydrogenáz. Respirační aktivita byla stejně jako u hydrolytické aktivity vypočtena ze vzniklých hodnot produktu - formazánu. Nutno dodat, že ETS představuje potenciální respiraci organismů, ne aktuální spotřebu kyslíku, jak je tomu u přímé respirace. Indikuje množství spotřebovaného kyslíku, který je vytvořen, pokud všechny enzymy fungují maximálně. ETS aktivita vyjádřena ve spotřebě kyslíku by tedy měla být větší než skutečná

respirace (postup dle G.-Tótha 1993).

Výsledky a diskuze

Na lokalitě byly měřeny základní fyzikálně-chemické charakteristiky jako množství O_2 , teplota, vodivost, dále bylo stanoveno množství dusičnanů, fosforečnanů a org. uhlíku (viz Tab. 1).

Tab. 1: Základní fyzikálně-chemické charakteristiky

Měřené parametry	Hodnoty
O_2	8 - 10,98 mg/l
pH	6,25 - 6,99
teplota	9,44 - 12,9°C
vodivost	172 - 251 μ S
NO_3^-	0,12 - 0,19 mg/l
PO_4^{3-}	0,12 - 0,17 mg/l
org. C	1,13 - 1,14 %

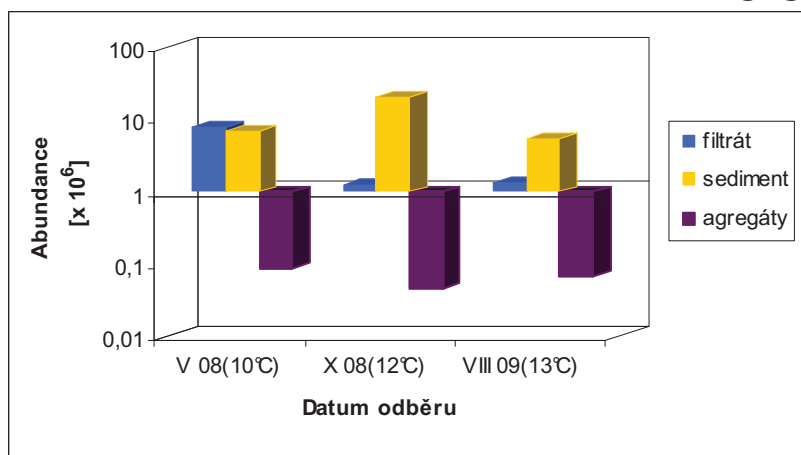
Jelikož jsme se při srovnání většiny měřených veličin potýkali s problémem odlišných jednotek, nebylo možné srovnat všechny typy biofilmu a vody vzájemně mezi sebou. Srovnáváme proto ve většině případů mezi sebou sediment, filtrát a agregáty (na jednotku objemu -ml) a kořeny s kameny (na jednotku plochy - cm^2).

Celková bakteriální abundance

Při srovnání sedimentu, filtrátu a agregátů vykazoval nejvyšší průměrnou hodnotu bakteriální abundance sediment a to $11,06 \cdot 10^6$ bakterií. ml^{-1} (rozmezí $5,4-21 \cdot 10^6$), nejméně bakterií v ml se pak nacházelo u agregátů ($0,065 \cdot 10^6$ bakterií. ml^{-1} ; rozmezí $0,046-0,084 \cdot 10^6$); průměrná abundance u filtrátu dosáhla hodnoty $3,49 \cdot 10^6$ bakterií. ml^{-1} s rozmezím ($1,24-7,9 \cdot 10^6$).

Relativně malé zastoupení bakteriálních buněk u říčních agregátů (ve srovnání s agregáty z jiného prostředí) by mohlo být ovlivněno charakterem říčního dna, u něhož má velké zastoupení kamenitá a šterkovitá frakce a tudíž zde neočekáváme vyšší podíl agregátů, na než bakterie přisedají (viz Graf 1, z důvodu relativně velkých rozdílů mezi hodnotami abundance byla zlogaritmována stupnice hodnot osy z).

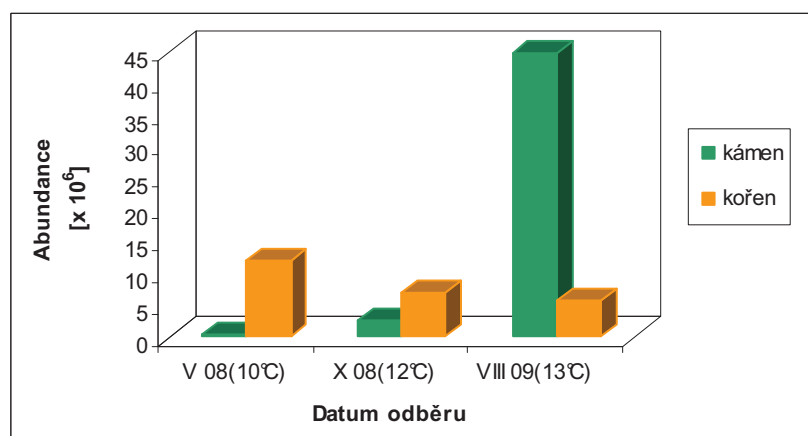
Graf 1: Celková bakteriální abundance u sedimentu, agregátů a filtrátu



Celková bakteriální abundance byla překvapivě vyšší u kamenů než u kořenů. Hodnota průměrné abundance u kamenů byla $16,01 \cdot 10^6$ bakterií. cm^{-2} s rozmezím ($0,52-45 \cdot 10^6$), u kořenů průměrná hodnota abundance činila $8,26 \cdot 10^6$ bakterií. cm^{-2} , rozmezí ($5,8-12 \cdot 10^6$).

Vzhledem k produkci exudátů (kořenové výměšky rostlin, obsahující velké množství organických látek), které by mohly sloužit jako přídatný zdroj potravy pro bakteriální nárost na kořenech, bychom mohli očekávat spíše opačný trend. Je dost pravděpodobné, že u bakteriálních počtů na pevných substrátech došlo k podhodnocení a to díky použití separačních technik (detergenty, sonifikace, ev. filtrace), během kterých zřejmě dochází k určitým ztrátám bakterií (viz Graf 2).

Graf 2: Celková bakteriální abundance u kamenů a kořenů



Množství chlorofylu *a* (chl *a*)

Množství chl *a*, jakožto kvantitativního ukazatele přítomnosti řas, bylo nejnižší u vody a nejvyšší u sedimentu. Hodnota chl *a* u sedimentu je překvapivě vysoká, ale jelikož byl odebrán sediment z horních 15 cm, kde je ještě relativně dobrý přístup kyslíku i světla, mohlo zde být obsaženo i větší množství benthických řas.

Hodnota množství chl *a* při srovnání kořenů a kamenů byla zhruba 2x vyšší u kamenů než u kořenů. Vzhledem k tomu, že množství sluneční energie dopadající na plochu toku není ve všech místech stejné, není tento nepoměr nikterak překvapující. Kameny v korytě jsou mnohem více exponovány, než kořeny u břehů, stíněného většinou dne stromy (viz Tab. 2).

Tab. 2: Množství chl *a* jednotlivých typů biofilmu a filtrátu

Substrát	Hodnota [$\mu\text{g chl. } a/ \text{ ml}$]
filtrát	0,0009 + 0,0004
agregáty	0,0135 + 0,010
sediment	20,33 + 16,35
Substrát	Hodnota [$\mu\text{g chl. } a/ \text{ cm}^2$]
kámen	10,37 + 9,58
kořen	4,76 + 1,20

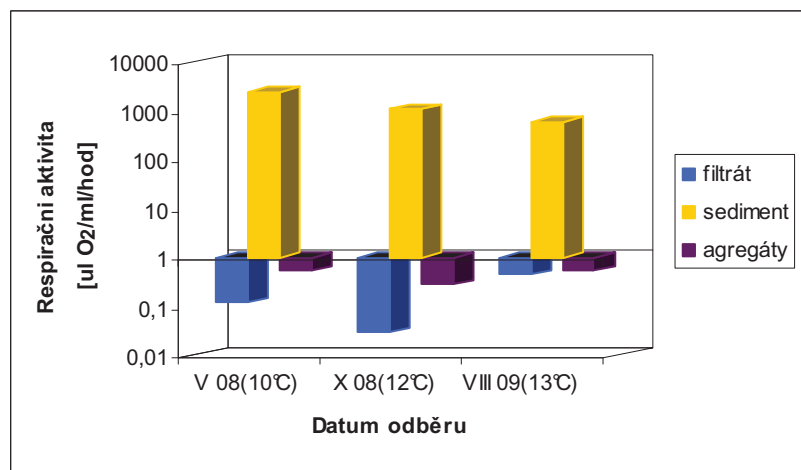
Respirační (ETS) aktivita

Respirační aktivita mikrobiálního společenstva filtrátu a agregátů byla ve srovnání

s aktivitou v sedimentu velice nízká (opět zlogaritmována stupnice hodnot osy z). Průměrná hodnota aktivity u filtrátu byla $0,20 \pm 0,12 \mu\text{l O}_2 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{hod}^{-1}$, rozmezí (0,030-0,455), bakteriální aktivita u agregátů byla o něco vyšší s průměrnou hodnotou $0,46 \pm 0,08 \mu\text{l O}_2 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{hod}^{-1}$ a rozmezím (0,279-0,526).

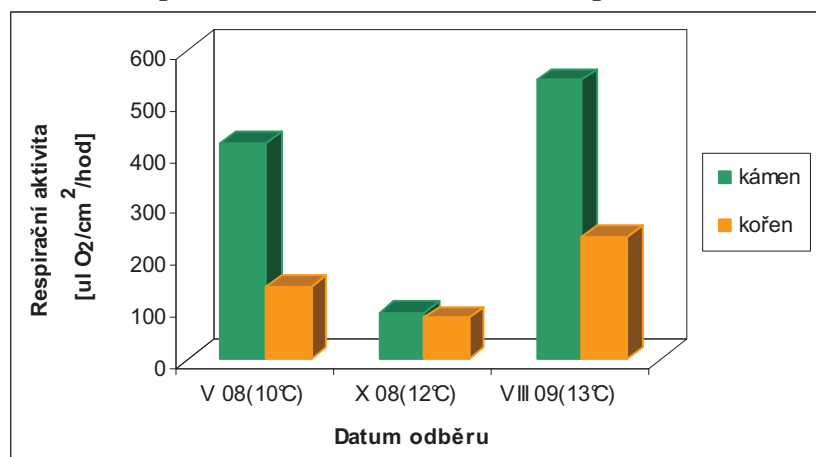
Průměrná respirační aktivita v sedimentu byla $1\,388,6 \pm 554,39 \mu\text{l O}_2 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{hod}^{-1}$; rozmezí hodnot (600 - 2 465). Přestože by měla být respirační aktivita závislá na teplotě, hodnoty u žádného typu substrátu tomu neodpovídají. Nejvyšší hodnotu aktivity při nejvyšší teplotě však vykazoval filtrát (viz Graf 3).

Graf 3: Respirační aktivita mikrobiálního společenstva sedimentu, agregátů a filtrátu



Při srovnání kamenů a kořenů byla respirační aktivita vyšší u sledovaných kamenů. Průměrná hodnota byla $351,52 \pm 135,35 \mu\text{l O}_2 \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{hod}^{-1}$, rozmezí (90,5-542,97). Respirační aktivita mikrobiálního společenstva kořenů byla o něco nižší s průměrnou hodnotou $153,88 \pm 46,28 \mu\text{l O}_2 \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{hod}^{-1}$ a rozmezím (80,53-239,45). U kamenů i kořenů byla aktivita nejvyšší při nejvyšší dosažené teplotě vody, ovšem při nejnižší teplotě nebylo dosaženo nejnižších hodnot aktivity (viz Graf 4).

Graf 4: Respirační aktivita mikrobiálního společenstva kamenů a kořenů

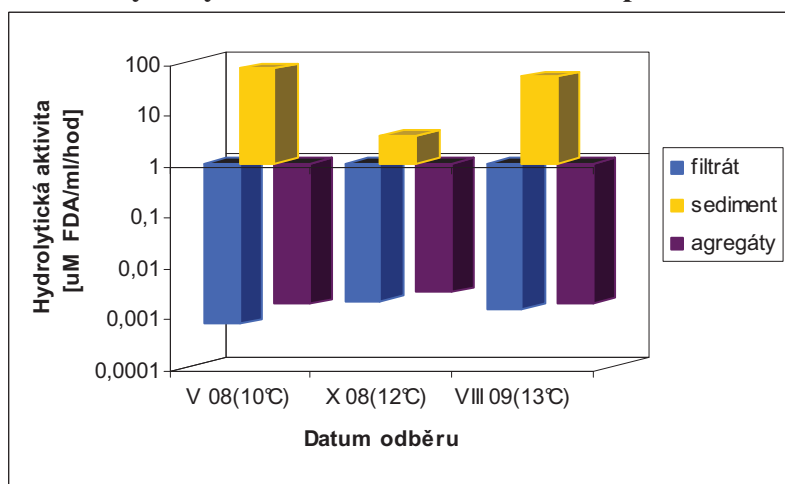


Vzhledem k tomu, že rozdíly v teplotě vody během měření nejsou příliš markantní, jako hlavní faktor by se dala uvažovat sezonalita. Nejnižší hodnoty (kromě sedimentu) respirační aktivity byly naměřeny v říjnu, nejvyšší pak v srpnu. U agregátů také korelovala respirační aktivita s celkovou abundancí bakterií.

Hydrolytická aktivita

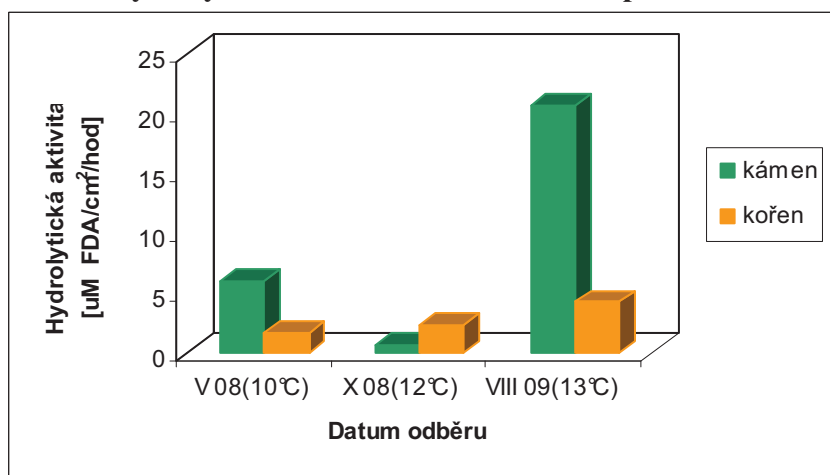
Hydrolytická aktivita u agregátů a filtrátu byla stejně jako u aktivity respirační ve srovnání s aktivitou v sedimentu velice nízká (zlogaritmována stupnice hodnot osy z). Průměrná hodnota aktivity u filtrátu byla $0,0014 \pm 0,0003 \mu\text{M FDA} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{hod}^{-1}$, rozmezí (0,0007-0,002), bakteriální aktivita u agregátů byla o něco vyšší s průměrnou hodnotou $0,0022 \pm 0,0004 \mu\text{M FDA} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{hod}^{-1}$ a rozmezím (0,0017-0,003). Průměrná hydrolytická aktivita v sedimentu byla $42,42 \pm 20,48 \mu\text{M FDA} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{hod}^{-1}$; rozmezí hodnot (3,58-73,15). Stejně jako u respirační aktivity ani hodnoty hydrolytické aktivity u sedimentu nekorelují s teplotou. Při nejnižší dosažené teplotě bylo ale dosaženo nejnižších hodnot aktivity jak u filtrátu, tak u agregátů (viz Graf 5).

Graf 5: Hydrolytická aktivita mikrobiálního společenstva sedimentu, agregátů a filtrátu



Hydrolytická aktivita u kamenů a kořenů byla stejně jako respirační aktivita vyšší u kamenů. Průměrná hodnota dosáhla $9,10 \pm 5,99 \mu\text{M FDA} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{hod}^{-1}$, rozmezí (0,64-20,69). Hydrolytická aktivita mikrobiálního společenstva kořenů byla o něco nižší, s průměrnou hodnotou $2,75 \pm 0,75 \mu\text{M FDA} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{hod}^{-1}$ a rozmezím (1,68-4,21). Stejně jako u aktivity respirační byla hydrolytická aktivita u kamenů a kořenů nejvyšší při nejvyšší dosažené teplotě vody, ovšem při nejnižší teplotě byla dosažena nejnižší hodnota pouze u kořenů (viz Graf 6).

Graf 6: Hydrolytická aktivita mikrobiálního společenstva kamenů a kořenů



U hydrolytické aktivity nebyl (až na kámen) prokázán tak výrazný trend sezonality, obzvláště u agregátů a filtrátu je trend téměř opačný. Možnou příčinou by mohla být rychlejší reakce na přísun potravy u mobilní formy biofilmu, oproti stacionárním biofilmům s výrazněji vyvinutou vnitřní strukturou. Vztah hydrolytické aktivity a celkové abundance bakterií, nebyl prokázán u žádného typu substrátu.

Fylogenetická *in situ* hybridizace (FISH)

Cílem naší detekce bylo sedm fylogenetických skupin: doména eubacteria (próba EUB338), α - proteobacteria (próba ALF1b), β - proteobacteria (próba BET42a), γ - proteobacteria (próba GAM42a), δ - proteobacteria (próba DELTA495a), CF-bacterium (próba CF319a+b), doména archaea (ARCH915).

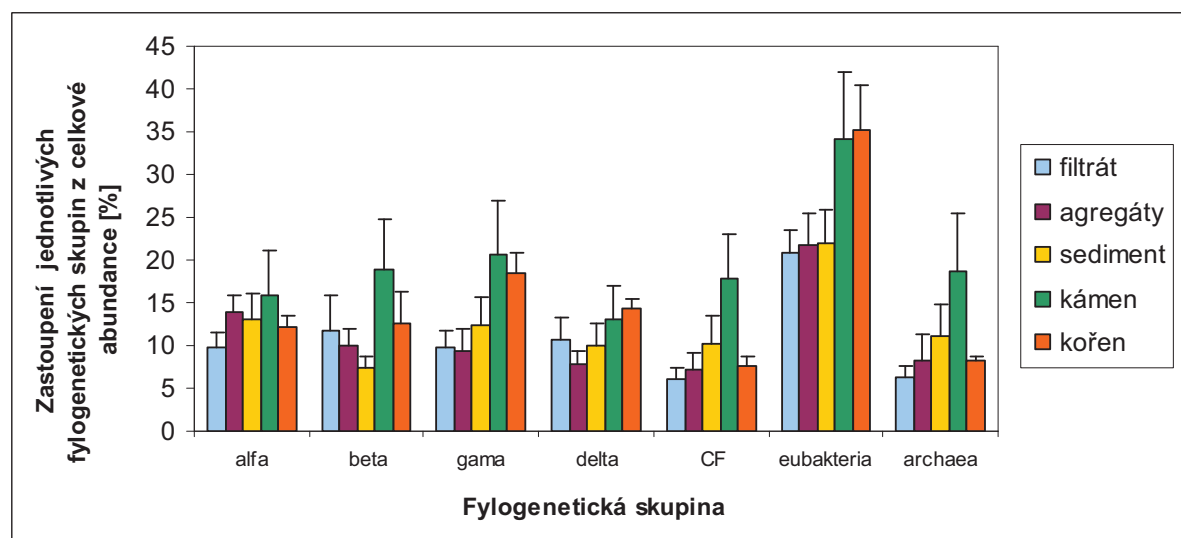
Při srovnání fylogenetických skupin byla u všech typů substrátu nejhojněji zastoupena doména Eubacteria, průměrná hodnota byla 26,80 % s rozmezím 20,94-35,21 %, což je v souladu s obecně známými fakty o hojnosti domény Eubacteria v rámci přírodních biofilmů. Nejvyšší hodnoty bylo dosaženo u kořene a nejnižší u filtrátu.

Nejnižší průměrnou hodnotu vykazovala skupina CF a to 9,77 % s rozmezím hodnot 6,09-18,18 %, nejhojněji se tato skupina vyskytovala u kamene a nejméně u filtrátu.

Doména Archaea byla průměrně zastoupena 10,68 % (rozmezí 6,41-18,79), přičemž nejnižší hodnota byla opět u filtrátu a nejvyšší u kamene. Tato skutečnost je poměrně překvapivá, vzhledem k našemu předpokladu, že doména Archaea by měla dominovat spíše v sedimentu.

U podskupin proteobakterií převažovala skupina γ - proteobacteria s průměrnou hodnotou 14,09 % a rozmezím 9,43 % (agregáty)-20,62 % (kámen). Nejméně byla zastoupena skupina δ - proteobacteria, průměrná hodnota byla 11,23 %, s nejnižší hodnotou 7,91 % u agregátů a nejvyšší 14,38 % u kořene. Průměrná hodnota zbylých dvou skupin byla téměř totožná, přičemž hodnota skupiny α - proteobacteria byla o něco vyšší s hodnotou 12,89 % a rozmezím 9,8 % (filtrát)-15,78 % (kámen). β - proteobacteria byla zastoupena 12,14 % s nejnižší hodnotou u sedimentu (7,46 %) a nejvyšší u kamene (18,94 %) viz Graf 7.

Graf 7: Zastoupení bakterií v jednotlivých fylogenetických skupinách u všech typů substrátu



Závěr

Závěrem lze říci, že naměřené hodnoty pouze částečně potvrdily naše předpoklady. Totální bakteriální počty odpovídají jednotlivým typům substrátů a jsou v souladu s výsledky předchozích výzkumů. Enzymatické aktivity však nekorelují se zjištěnými bakteriálními počty a nebyla prokázána ani závislost na teplotě (rozdíly teploty vody během měření však nejsou příliš výrazné). V případě respirační aktivity se však projevil trend závislosti na sezonalitě prostředí (a tedy na přísunu potravy). V rámci měření koncentrace chlorofylu *a*, nás zaujala poměrně vysoká hodnota u sedimentu, nevymyká se však dříve zjištěným údajům. Fylogenetickou analýzou bakteriálních společenstev byla potvrzena přítomnost všech sledovaných skupin na všech typech substrátů, překvapením byl poměrně vysoký podíl domény Archea u kamenů, oproti sedimentu.

Jen pro představu, z hlediska bakteriálních počtů bychom mohli říci, že (podle výsledků našeho výzkumu) odpovídá počet bakterií v 100 ml říční vody (filtrát + agregáty) 35 ml sedimentu, 24 cm² epilimnického nárůstu na kamenech a 46 cm² epilytického nárůstu na zaplavených kořenech.

Literatura

- Battin T.J., 1997. Assesment of fluorescent diacetate hydrolysis as a measure of total esterase activity in natural stream sediment biofilms. *The Science of the Total Environment* 198: 51-60.
- Cottrell, M. t., Kirchman, D., L., 2003: Contribution of major bacterial groups to bacterial biomass production (thymidine and leucine incorporaton) in the Delaware estuary. *Limnol. Oceanogr.*, Volume 48, pp. 168-178///
- Donland R.-M., Costerton J.-W., 2002. Biofilms: Survival Mechanisms of clinically Relevant Microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15,2: 167-193.
- Grossart H.P., Kiorboe T., Tang K., Ploug H., 2003. Bacterial colonization of particles: Growth and interactions. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 6: 3500-3509.
- Pechar L., 1987. Use of acethon – methanol mixture for extraction and spectrophotometric determination of chlorophyll a in phytoplankton. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 78 (Algological Studies 46) : 99 - 117
- Porter J., Feig Y., 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25, 5: 943-947.
- Tóth L.G., 1993. Measurement of the terminal electron transport system (ETS) activity of the plankton and sediment – International Training Course. Balaton Limnological Res. Inst. of the Hong.Acad.Sci. Hungary.

VI. Srovnání mikrobiálního osídlení tří velikostních frakcí říčního sedimentu

Martin Rulík, Pavlína Badurová, Lenka Brablcová, Iva Buriánková, Kristýna
Gratzová, Václav Mach, Adam Bednařík

(Zborník príspevkov, Konferencie Mikrobiológia vody a životného prostredia 2012; pp. 115-122)

Srovnání mikrobiálního osídlení tří velikostních frakcí říčního sedimentu

Martin Rulík, Pavlína Badurová, Lenka Brablcová, Iva Buriánková, Kristýna Gratzová,
Václav Mach & Adam Bednařík

*Katedra ekologie a životního prostředí PřF UP, Laboratoř mikrobiální ekologie vod,
Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, Česká republika, e-mail: martin.rulik@upol.cz, tel.: + 42
58563 4569*

Abstrakt

Úvod

Bentické a hyporheické mikrobiální biofilmy jsou významným centrem metabolismu říčního toku, kde dochází k retenci, absorpci, ukládání a transformaci látek a živin (např. Edwards et al. 1990; Dahm et al. 1998; Storey et al. 1999). Biofilmy tak přispívají k samočisticím procesům, ale zároveň akumulují nejrůznější polutanty, které mohou dále přecházet do vyšších trofických stupňů. Tyto biofilmy obvykle koncentrují většinu mikrobiálních buněk intersticiálního prostředí (srv. Harvey et al. 1984; Griebler et al. 2002) a nachází se na povrchu sedimentů. Ve srovnání s relativně homogenními sedimenty stojatých vod (jezer) však představují dnové (hyporheické) sedimenty tekoucích vod značně heterogenní prostředí, které může ovlivňovat jak abundanci, tak i metabolickou aktivitu přisedlých bakterií. Heterogenita prostředí se navíc může měnit jak v časovém (např. zvýšené průtoky při jarním tání sněhu), tak prostorovém měřítku (např. v podélném profilu toku či s rostoucí hloubkou sedimentu). Z praktického hlediska představuje tato heterogenita problém spojený především se vzorkováním a analýzou reprezentativních vzorků. Mezi abundancí přisedlých bakterií a velikostí zrn sedimentu totiž byla zjištěna signifikantní negativní korelace. Inverzní vztah mezi počtem bakterií a velikostí zrn je dán vztahem mezi objemem a plochou dané částice, to znamená, že na menších zrnech se nachází obvykle vyšší abundance prokaryot. Tento vztah byl opakovaně potvrzen v mořských (Hargrave 1972), estuarinních (Almeida & Alcântara 1992), intertidálních (Dale 1974; DeFlaun & Mayer 1980), jezerních (Tsernoglou & Anthony 1971) a říčních (Leichtfried 1985, 1988; Bott & Kaplan 1985; Bärlocher & Murdoch 1989; Griebler et al. 2001; Santmire & Leff 2007) sedimentech a také v podzemních vodách (Holm et al. 1992; Albrechtsen 1994). Povrch částic (zejména tzv. kolonizovatelný povrch) je významným habitatem pro mikroorganismy obývající sediment; otázkou však zůstává, jaká je abundance těchto menších zrn v celkovém (tj. neporušeném) vzorku sedimentu, resp. jaká velikost zrn je ideální pro rutinní analýzy mikrobiálních počtů a aktivit. Protože většina biomasy biofilmu a celkového organického uhlíku (TOC) byla v tekoucích vodách zjištěna na zrnech < 1mm, Leichtfried (1988, 1991) doporučila, aby se pro mikrobiální analýzy potoků a řek používala pouze tato frakce. V toku Sitka se frakce zrn < 1mm podílí cca 60 % na obsahu TOC v celkovém sedimentu, proto jsme předpokládali, že většina hyporheického organického uhlíku a biofilmu bude vázána na tuto frakci, ačkoliv její podíl v celkové hmotnosti sedimentu je pouze 20% (Koutný & Rulík 2007).

V předložené studii jsme zjišťovali, zda existují rozdíly mezi třemi velikostními frakcemi sedimentu, odebraného na různých místech v podélném profilu toku Sitka, z hlediska jejich kvalitativních charakteristik a zda se liší celková abundance prokaryotických buněk, abundance vybraných taxonomických skupin (metanogenní archea, metanotrofní bakterie skupin I a II) a indikátory metabolické aktivity a růstu měřené na těchto třech frakcích.

Zvolené taxonomické skupiny byly vybrány na základě našich předchozích studií, které prokázaly, že tyto skupiny se běžně nacházejí v podélném profilu toku a tvoří nezanedbatelnou část mikrobiálního společenstva. Tyto taxony se také liší ve svých odezvách na environmentální podmínky prostředí, proto nás zajímalo, zda se budou lišit i jejich abundance na různých velikostních frakcích zrn.

Materiál a metody

Výzkum byl proveden na toku Sitka v ČR. Sitka je dosud zachovalý tok 3. řádu o délce 35 km, který pramení v Hrubém Jeseníku a vlévá se do Oskavy a poté do řeky Moravy cca 5 km severně od Olomouce. Na tomto toku probíhají dlouhodobá měření a sledování dynamiky metanu v hyporheických sedimentech, podrobná charakteristika toku včetně změn základních fyz-chem. parametrů povrchové i intersticiální vody v podélném profilu je uvedena v našich předchozích pracích (např. Rulík & Spáčil 2004; Hlaváčová et al. 2005, 2006; Buriánková et al. 2012; Rulík et al. 2012). V podélném profilu toku bylo na základě předchozích analýz vybráno pět lokalit, kde proběhly odběry vzorků hyporheických (do hloubky 50 cm) a povrchových sedimentů (do hloubky 10 cm) a intersticiální vody. Replikáty (n=3) hyporheických sedimentů byly odebrány pomocí freeze-core metody s tekutým dusíkem (Bretschko & Klemens 1986), replikáty (n = 5) heterogenních, povrchových vzorků byly náhodně odebrány na každé lokalitě pomocí lopatky a poté byly transportovány v chladu do laboratoře. Zde byly vzorky ve vlhkém stavu opatrně prosety přes sérii sít a pouze frakce <1 mm, 1-3 mm a 3-5.6 mm byly použity pro další analýzu. V podvzorcích byly měřeny následující fyzikálně-chemické a mikrobiální parametry, jejichž přehled je uveden v následující tabulce č. 1 a metody stanovení s výjimkou stanovení dusíku a fosforu jsou popsány detailně v práci Rulík & Spáčil (2004), Buriánková et al. (2012) a Rulík et al. (2012). Pro analýzu dusíku byla použita metoda dle Dumase (Dumatherm, Gerhardt Analytical Systems, Germany), fosfor byl stanoven metodou ICP-OES (emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem).

Tab. 1. Přehled měřených parametrů ve zvolených frakcích sedimentů

	Měřené parametry
Vlastnosti sedimentů	granulometrie, Průměr mediánu velikosti zrna (Q_{50}) a obsah zrn < 1mm, obsah organického uhlíku, obsah celkového dusíku a fosforu
Mikrobiální charakteristiky	abundance mikrobiálních buněk (DAPI), % zastoupení a abundance buněk domény Archaea, metanogenních archea, obsah extracelulárních polymerních sacharidů, respirační aktivita, hydrolytická aktivita, CTC a % CTC aktivních buněk, biovolum, biomasa

Výsledky a diskuze

Vlastnosti sedimentů

Sediment ze všech pěti lokalit vykazoval značně široké rozpětí zrn (Tab. 1), nicméně v průměru vykazovalo relativní množství zájmových frakcí podobné hodnoty (Tab. 4). S výjimkou lokality II se medián velikosti zrna (Q_{50}) snižoval s rostoucí hloubkou sedimentu, což naznačuje kumulaci jemných sedimentů v hlubší vrstvě sedimentů. Mezi lokalitami vykazovala velmi nízký medián velikosti zrna lokalita č. IV, která je charakteristická dominancí zrn < 1mm. Relativní množství zrn menších než 1 mm se pohybovalo mezi 3.96 až 49,843 % v rámci všech lokalit a obvykle vykazovalo tendenci se rapidně zvyšovat s rostoucí hloubkou – viz lokality IV a V (Tab.1). Zbylé dvě frakce 1-3 a 3-5,6 mm vykazovaly podobné

trendy s hloubkou, avšak nárůst jejich relativního množství v celkovém sedimentu byl méně zřejmý ve srovnání s velikostní frakcí < 1 mm. (srv. Tab.1).

Tabulka 1. Průměr mediánu velikosti zrna (Q_{50}) a procentuálního podílu studovaných frakcí v celkovém sedimentu, odebraném na různých místech v podélném profilu toku Sitka metodou freeze-core s tekutým dusíkem do hloubky 50 cm

Lokalita/ hloubka	Q_{50}		% celkového sedimentu					
			Frakce < 1 mm		Frakce 1-3 mm		Frakce 3-5,6 mm	
	0-25 cm	25-50 cm	0-25 cm	25-50 cm	0-25 cm	25-50 cm	0-25 cm	25-50 cm
I	8,57	2,74	8,99	13,24	9,54	15,25	14,43	24,6
II	5,91	12,41	10,88	4,13	11,97	4,01	20,89	9,33
III	13,59	11,0	3,96	13,02	5,24	7,26	1,65	8,4
IV	0,94	0,48	37,43	49,8	17,7	20,44	21,97	15,9
V	7,45	0,81	10,87	48,98	5,95	16,39	13,96	16,52

Obsah organického uhlíku značně kolísal mezi jednotlivými frakcemi a lokalitami (Tab.2), ale v průměru vykazovala nejmenší frakce < 1mm jeho největší procentuální podíl (Tab.3). Podobný trend lze vysledovat i u celkového dusíku a poměru uhlík:dusík, jejichž hodnoty rovněž s rostoucí velikostí zrn klesaly, naopak z tohoto schématu vybočují hodnoty fosforu (Tab. 3).

Tabulka 2. Procento organického uhlíku \pm SE vzorků z každé lokality

Lokalita	Procento organického uhlíku \pm SE		
	Velikostní frakce < 1 mm	Velikostní frakce 1-3 mm	Velikostní frakce 3-5.6 mm
	I	1.40 \pm 0.04	1.37 \pm 0.02
II	1.29 \pm 0.06	1.08 \pm 0.03	0.92 \pm 0.05
III	0.91 \pm 0.05	0.82 \pm 0.04	0.88 \pm 0.02
IV	0.84 \pm 0.03	0.92 \pm 0.08	0.86 \pm 0.03
V	0.67 \pm 0.06	0.51 \pm 0.06	0.42 \pm 0.06

Poměr C/N je často používanou charakteristikou kvality potravy pro konzumenty (Russell-Hunter 1970, Taylor & Roff 1984). Nízký poměr (tj. C/N < 16) je považován za indikátor vysokého obsahu proteinů a proto dobré dostupnosti energie obsažené v potravě (Cummins & Klug 1979, Naiman & Sedell 1979). Na sledovaných velikostních frakcích sedimentu kolísal poměr C/N mezi 15.7-16.8 (Tab. 3), což je méně než v naší předchozí studii (Rulík 2000), naopak je v souladu s hodnotami poměru C/N 9-18 uváděnými Lechtfried (1995). Taylor & Roff (1984) zjistili signifikantně nižší hodnoty poměru C/N v sedimentech dolního úseku toku (15-16) ve srovnání s hodnotami v pramenném úseku toku (22.5-25.2). Z hlediska „nutriční hodnoty“ tedy nebyl zjištěn zcela konzistentní vztah mezi velikostí zrna a měřeným parametrem nutriční hodnoty. Tuto skutečnost popisuje u mořského sedimentu rovněž např. Cammen (1982), který doporučuje opatrné používání generalizace vztahu mezi bakteriální koncentrací a velikostí zrn. Vyšší abundance bakterií byly často zjištěny u větších zrn a kolísání v množství uhlíku na zrnech je podle něj důležitější než velikost částic (Cammen 1982). Naopak dobrou korelaci mezi obsahem organického uhlíku a celkového dusíku a velikostí zrn uvádějí Hargrave (1972), Dale (1974) a Bergamaschi et al. (1997).

Tabulka 3. Procentuální podíl (\pm SD) organického uhlíku, celkového dusíku, fosforu a poměru uhlík : dusík na zrnech různé velikosti

Frakce (mm)	% organic. C	% N	% P	Poměr C/N
< 1 mm	1.02 \pm 0.12	0.07 \pm 0.03	0.06	17.1
-3 mm	0.94 \pm 0.13	0.06 \pm 0.01	0.07	15.7
3-5,6 mm	0.84 \pm 0.1	0.05 \pm 0.01	0.07	16.8

Abundance přisedlých bakterií vs velikost zrna

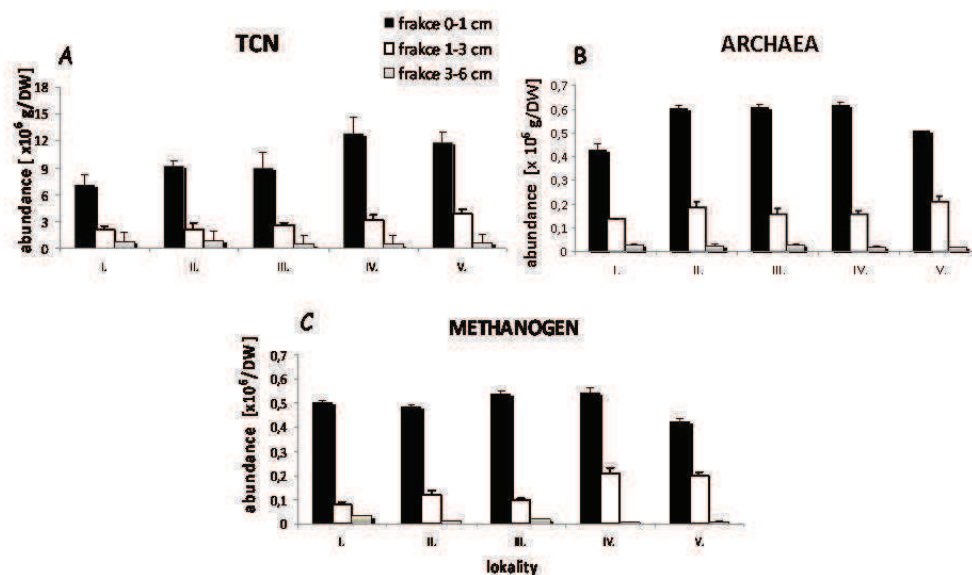
Mezi celkovou abundancí bakterií (DAPI) a vzůstající velikostí zrn byl dle očekávání zjištěn signifikantní negativní vztah. Ačkoliv relativní množství všech tří frakcí v celkové suché hmotnosti sedimentu se v průměru téměř nelišilo, většina detekovaných mikrobiálních buněk se nacházela na nejmenší frakci < 1 mm (Tab. 4).

Tabulka 4. Průměrná distribuce zrn sedimentu a abundance přisedlých prokaryot na třech velikostních frakcích

Frakce zrn (mm)	Relativní množství zrn (% celkové hmotnosti)*	Abundance prokaryot (% celkové populace)
< 1	14.43 \pm 5.89	74.36 \pm 1.29
1-3	10.08 \pm 2.26	20.57 \pm 1.15
3-5.6	14.58 \pm 3.62	5.07 \pm 0.95

* Průměr a SE byly počítány pro 5 vzorků odebraných na různých lokalitách v podélném profilu toku Sitka

Negativní vztah mezi velikostí zrn a abundancí byl zjištěn rovněž u vybraných taxonomických skupin (archea a metanogenní archaea)(Tab. 5) Tento trend se striktně vyskytoval na všech lokalitách, přestože se celková abundance prokaryontních buněk obarvených DAPI a abundance taxonomických skupin vzájemně lišila (Obr. 1 - v současné době nejsou ještě k dispozici statistické výsledky).



Obr. 1. Srovnání abundance prokaryot na pěti studovaných lokalitách. (A) celkové epifluorescenční počty po obarvení DAPI, (B) FISH se specifickou sondou pro doménu Archaea a (C) FISH se specifickou sondou pro metanogenní archaea. Úsečka značí SE.

Sacharidy a mikrobiální aktivita

Polysacharidy jsou důležitou strukturní jednotkou mikrobiálních biofilmů a jejich množství ve vzorku proto může odrážet biomasu přítomného biofilmu. Množství sacharidů v celkovém biofilmu bylo největší ve velikostní frakci < 1 mm, což naznačuje největší rozvoj biofilmů na této frakci. Vyšší hodnoty polysacharidů i proteinů (srv. Tab.3) na menších zrnech uvádějí z hyperheických sedimentů rovněž Rulík & Spáčil (2004). Podobná je i distribuce metabolické aktivity buněk (Tab. 5). Procentuální podíl CTC aktivních buněk v jednotlivých frakcích byl spíše vyšší (srv. Søndergaard et Danielsen 2001). Abundance CTC aktivních buněk bývá obvykle korelována s dostupností organického substrátu; zdá se tedy, že procentuální podíly aktivních buněk z celkového počtu buněk označených DAPI korespondují s naměřenými nutričními hodnotami. Podle del Giorgio et al. (1997) počty aktivních buněk rovněž dobře korelují s bakteriální produkcí. V našich analýzách jsme neměřili rychlost mikrobiálního růstu, ale respirační a hydrolytickou aktivitu mikroorganismů. Oba dva parametry vykazovaly dobrou shodu jak s hodnotami celkových počtů, tak abundancí CTC aktivních buněk (Tab. 5), tj. ve všech případech byla zjištěna jejich dominance na zrnech velikosti < 1 mm.

Tabulka 5. Mikrobiální charakteristiky tří velikostních frakcí sedimentu. Hodnoty jsou průměry ± SE

Proměnná	Velikostní frakce (mm)		
	< 1	1-3	3-5.6
DAPI (buňky x 10 ⁶ g ⁻¹ sušiny)	9.94 ± 1.04	2.75 ± 0.33	0.63 ± 0.07
Archaea (buňky x 10 ⁶ g ⁻¹ sušiny)	0.55 ± 0.03	0.17 ± 0.03	0.02 ± 0.002
Methanogení achea (buňky x 10 ⁶ g ⁻¹ sušiny)	0.50 ± 0.02	0.14 ± 0.03	0.01 ± 0.005
Sacharidy (mg C g ⁻¹ sušiny)	0.52 ± 0.12	0.11 ± 0.01	0.07 ± 0.01
Respirační aktivita (μl O ₂ g ⁻¹ sušiny h ⁻¹)	5.46 ± 1.77	1.52 ± 0.64	2.64 ± 1.03
Hydrolytická aktivita (μM FDA g ⁻¹ sušiny h ⁻¹)	10.00 ± 1.74	2.88 ± 0.83	3.98 ± 0.90
CTC (abundance x 10 ⁶ /g sušiny)	2.23 ± 0,56	0,61 ± 0.14	0,1 ± 0.03
% CTC aktivních buněk z DAPI	25.78 ± 5.03	21.27 ± 2.15	14.21 ± 3.63
Biovolum (μm ³ buňku ⁻¹)	0.12 ± 0.2	0.13 ± 0.02	0.2 ± 0.02
Biomasa (μg C g ⁻¹ sušiny)	0.23 ± 0.04	0.06 ± 0.01	0.02 ± 0.00

Biovolum, biomasa vs velikost zrna

Biovolum a jeho konverze na biomasu umožňují odhadnout potenciální příspěvek mikrobiálních buněk do potravního řetězce. Pro přepočítání biovolumu na biomasu se používají různé konverzní faktory (viz Posch et al. 2001), v našich analýzách používáme tradičně faktor navržený Norlandem (Norland 1993). Ve srovnání s ostatními parametry vykazoval biovolum zcela opačný trend, největší průměrné hodnoty byly zjištěné na největší frakci sedimentu. Tento fakt byl potvrzen rovněž na většině lokalit v podélném profilu toku Sitka. S tímto zjištěním nekorespondují výsledky, které naměřili Kuwae & Hosokawa (1999), kteří uvádí, že největší biovolum buněk (rozpětí 0.17-0.22 μm³) byl zjištěn u nejjemnějšího sedimentu. Zjištěné rozpětí hodnot pro biovolum mikrobiálních buněk se shoduje s údaji, které publikovali pro jemný sediment Koutný & Rulík (2007), Brablčová et al. (2012) či ze zahraničí Buesing & Gessner (2002), Eggert & Wallace (2007) a Bertoni et al. (2010). Protože biomasa je závislá na celkové abundanci mikrobiálních buněk ve vzorku, není překvapivé, že největší hodnota biomasy byla zjištěna na nejmenší frakce sedimentu.

Závěr

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že v rámci tří studovaných zrnitostních frakcí byly jak mikroorganismy, tak i další mikrobiální parametry mnohem více asociovány s částicemi menšími než 1 mm. Toto zjištění podporuje jednak závěry předchozích studií, provedených zejména v mořském prostředí, jednak naznačuje, že pro další, rutinní mikrobiologické analýzy hyporheických sedimentů je třeba zabezpečit odběr dostatečného množství jemných sedimentů.

Poděkování

Tento výzkum byl finančně podpořen projekty GAČR 526/09/1639 a IGA 453104081/31

Použitá literatura

- Albrechtsen HJ (1994): Distribution of bacteria, estimated by a viable count method, and heterotrophic activity in different size fractions of aquifer sediments. *Geomicrobiol J* **12**: 253-264
- Almeida MA, Alcântara F (1992): Bacterial colonization of seston particles in brackish waters (Ria de Aveiro, Portugal). *Mar Ecol Prog Ser* **89**: 165-173
- Bärlocher F, Murdoch JH (1989): Hyporheic biofilms – a potential food source for interstitial animals. *Hydrobiologia* **184**: 61-67
- Bergamaschi BA, Tsamakis E, Keil RG, Eglinton TI, Montluçon DB, Hedges JI (1997): The effect of grain size and surface area on organic matter, lignin and carbohydrate concentration, and molecular compositions in Peru Margin sediments. *Geochim Cosmochim Acta* **61**: 1247-1260
- Bertoni R, Callieri C, Corno G, Rasconi S, Caravati E, Contesini M (2010): Long term trends of epilimnetic and hypolimnetic bacteria and organic carbon in a deep holo-oligomictic lake. *Hydrobiologia* **644**: 279-287
- Bott TL, Kaplan LA (1985): Bacterial biomass, metabolic state, and activity in stream sediments: relation to environmental variables and multiple assay comparison. *Appl Environ Microbiol* **50**: 508-522
- Brablcová L, Buriánková I, Badurová P, Rulík M (2012): The phylogenetic structure of microbial biofilms and free-living bacteria in a small stream. *Folia Microbiol*
- Bretschko G, Klemens W (1986): Quantitative methods and aspects in the study of the interstitial fauna of running waters. *Stygologia* **2**: 297–316
- Buesing N, Gessner MO (2002): Comparison of detachment procedures for direct counts of bacteria associated with sediment particles, plant litter and epiphytic biofilms. *Aquat Microb Ecol* **27**: 29-36
- Buriánková I, Brablcová L, Mach V, Hýblová A, Badurová P, Cupalová J, Čáp L, Rulík M (2012): Methanogens and methanotrophs distribution in the hyporheic sediments of a small lowland stream. *Fund Appl Limnol* **181**: 87-102
- Cammen LM (1982): Effect of particle size on organic content and microbial abundance within four marine sediments. *Mar Ecol Prog Ser* **9**: 273-280
- Cummins KW, Klug MJ (1979): Feeding ecology of stream invertebrates. *Ann Rev Ecol Syst* **10**: 147-172
- Dahm CN, Grimm NB, Marmonier P, Valett HM, Vervier P (1998): Nutrient dynamics at the interface between surface waters and groundwaters. *Freshwat Biol* **40**: 427–451
- Dale NG (1974): Bacteria in intertidal sediments: Factors related to their distribution. *Limnol Oceanogr* **19**: 509-518
- DeFlaun M, Mayer LM (1983): Relationships between bacteria and grain surfaces in intertidal sediments. *Limnol Oceanogr* **28**: 873-881
- del Giorgio PA, Prairie YT, Bird DF (1997): Coupling between rates of bacterial production and the abundance of metabolically active bacteria in lakes, enumerated using CTC reduction and flow cytometry. *Microb Ecol* **34**:144–154

- Edwards RT, Meyer JL, Findlay SEG (1990): The relative contribution of benthic and suspended bacteria to system biomass, production, and metabolism in a low-gradient blackwater river. *J N Am Benthol Soc* **9**: 216-228
- Eggert SL, Wallace JB (2007): Wood biofilm as a food resource for stream detritivores. *Limnol Oceanogr* **52**: 1239-1245
- Griebler C, Mindl B, Slezak D (2001): Combining DAPI and SYBR Green II for the enumeration of total bacterial numbers in aquatic sediments. *Internat Rev Hydrobiol* **86**: 453-465
- Griebler C, Mindl B, Slezak D, Geiger-Kaiser M (2002): Distribution patterns of attached and suspended bacteria in pristine and contaminated shallow aquifers studied with an in situ sediment exposure microcosm. *Aquat Microb Ecol* **28**: 117-129
- Hargrave BT (1972): Aerobic decomposition of sediment and detritus as a function of particle surface area and organic content. *Limnol Oceanogr* **17**: 583-596
- Harvey RW, Smith RL, George L (1984): Effect of organic contamination upon microbial distributions and heterotrophic uptake in a Cape Cod, Mass., aquifer. *Appl Environ Microbiol* **48**: 1197-1202
- Hlaváčová E, Rulík M, Čáp L (2005): Anaerobic microbial metabolism in hyporheic sediment of a gravel bar in a small lowland stream. *River Res Appl* **21**: 1003 – 1011
- Hlaváčová E, Rulík M, Čáp L, Mach V (2006): Greenhouse gases (CO₂, CH₄, N₂O) emissions to the atmosphere from a small lowland stream. *Arch Hydrobiol* **165**: 339 – 353
- Holm PE, Nielsen PH, Albrechtsen HJ, Christensen TH (1992): Importance of unattached bacteria and bacteria attached to sediment in determining potentials for degradation of xenobiotic organic contaminants in an aerobic aquifer. *Appl Environ Microbiol* **58**: 3020-3026
- Koutný J, Rulík M (2007): Hyporheic biofilm particulate organic carbon in a small lowland stream (Sitka, Czech Republic): Structure and distribution. *Internat Rev Hydrobiol* **92**: 402-412
- Kuwaie T, Hosokawa Y (1999): Determination of abundance and biovolume of bacteria in sediments by dual staining with 4,6-diamidino-2-phenylindole and acridine orange: relationship to dispersion treatment and sediment characteristics. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3407-3412
- Leichtfried M (1985): Organic matter in gravel stream (Project Ritrodat-Lunz). *Verh Internat Verein Limnol* **22**: 2058-2062
- Leichtfried M (1988): Bacterial substrates in gravel beds of a second order alpine stream (Project Ritrodat-Lunz, Austria). *Verh Internat Verein Limnol* **23**: 1325–1332
- Leichtfried M (1991): POM in bed sediments of a gravel stream (Ritrodat-Lunz study area), Austria). *Verh Internat Verein Limnol* **24**: 1921-1925
- Leichtfried M (1995): Organic matter in bedsediments – an energy source for lotic ecosystems (A compilation of a long term study). *Folia Fac Sci Nat Univ Masaryk Brunen, Biologia* **91**: 77-93
- Naiman RJ, Sedell JR (1979): Benthic organic matter as a function of stream order in Oregon. *Arch Hydrobiol* **87**: 404-422
- Norland S (1993): *The relationship between biomass and volume of bacteria*. pp 303–307. In: Kemp PF, Sherr BF, Sherr EB, Cole JJ (eds.): Hand-book of methods in aquatic microbial ecology. Lewis Publishers, New Jersey
- Posch T, Loferer-Kröbächer M, Gao G, Alfreider A, Pernthaler J, Psenner R (2001): Precision of bacterioplankton biomass determination: a comparison of two fluorescent dyes, and of allometric and linear volume-to-carbon conversion factors. *Aquat Microb Ecol* **25**: 55-63
- Rulík M (2000): Distribution of organic carbon (TOC) and organic nitrogen (TON) in small grain size mobile hyporheic sediments (Sitka stream, Czech Republic). *Pol Arch Hydrobiol* **47**: 305-313
- Rulík M, Bednařík A, Mach V, Brablcová L, Buriánková I, Badurová P, Gratzová K (in press): *Methanogenic system of a small lowland stream Sitka, Czech Republic*. In: Matovic MD (ed.): "Biomass / Book 2", ISBN 980-953-307-506-3
- Rulík M, Čáp L, Hlaváčová E (2000): Methane in the hyporheic zone of a small lowland stream (Sitka, Czech Republic). *Limnologica* **30**: 359 – 366
- Rulík M, Spáčil R (2004): Extracellular enzyme activity within hyporheic sediments of a small lowland stream. *Soil Biol Biochem* **36**: 1653–1662
- Russel-Hunter WD (1970): *Aquatic productivity: an introduction to some basic aspects of biological oceanography and limnology*. London, MacMillan and Company, Ltd.

- Santmire JA, Leff LG (2007): The influence of stream sediment particle size on bacterial abundance and community composition. *Aquat Ecol* **41**: 153-160
- Søndergaard M, Danielsen M (2001): Active bacteria (CT+) in temperate lakes: temporal and cross-system variation. *J Plankton Res* **23**: 1195-1206
- Storey RG, Fulthorpe RR, Williams DD (1999): Perspectives and predictions on the microbial ecology of the hyporheic zone. *Freshwat Biol* **41**: 119-130
- Taylor BR, Roff JC (1984): Use of ATP and carbon:nitrogen ratio as indicators of food quality of stream detritus. *Freshwat Biol* **14**: 195-201
- Tsernoglou D, Anthony EH (1971): Particle size, water stable aggregates, and bacterial populations in lake sediments. *Can. J Microbiol* **17**: 217-227

VII. PUBLIKAČNÍ ČINNOST

PUBLIKACE

Brablcová L, Rulík M (2007) The comparison of abundance of attached and free-living bacteria in water column of two gravel-sand pit lakes. *Acta Universitatis Carolinae-Environmentalica* (21): 31-34.

Rulík M, Mach V, Cupalová J, **Brablcová L**, Buriánková I, Čáp L (2008) Running waters as an important source of methane emissions to atmosphere: preliminary results from the Sitka stream, Czech Republic. *J Environ Sci Eng* (10):43-52.

Brablcová L, Buriánková I, Badurová P, Rulík M (2012) The phylogenetic structure of microbial biofilms and free-living bacteria in a small stream, *Folia Microbiol*, DOI 10.1007/s12223-012-0201-y (in press)

Buriánková I, **Brablcová L**, Mach V, Hýblová A, Badurová P, Cupalová J, Čáp L, Rulík M (2012) Methanogens and methanotrophs distribution in the hyporheic sediments of a small lowland stream. *Fundam Appl Limnol* (17): 87-102

Rulík M, Bednařík A, Mach V, **Brablcová L**, Buriánková I, Badurová P, Gratzová K (2012) Methanogenic system of a small lowland stream Sitka, Czech Republic. In: Biomass / Book 2 (MD Matovic et al., eds.), chapter XX (in press).

Buriánková I, **Brablcová L**, Mach V, Dvořák P, Rulík M (2012) Identification of methanogenic archaea involved in a methane stream cycle by targeting methyl-coenzyme M reductase (*mcrA*) gene. *Submitted to PloS One*

Brablcová L, Buriánková I, Badurová P, Rulík M (2012) Occurrence and diversity of methanogenic archaea detected by FISH and DGGE in stream hyporheic sediment. *Submitted to Environ Microbiol* (EMI-2012-1185)

KONFERENCE

Brablcová L, Buriánková I, Rulík M (2008) Microbial biofilm: applied methods of ecological laboratory UP. Fresh Blood for Fresh Water, Lunz am See, Austria, 16-18 May 2008 - POSTER

Rulík M, Mach V, **Brablcová L**, Buriánková I, Cupalová J (2009) Linking organic carbon cycling within hyporheic zone of a small lowland river and green house gases emissions (abstract). NABS 57th Annual Meeting, Grand Rapids, Michigan, 17-22 May 2009 - POSTER

Brablcová L, Buriánková I, Lee SH, Kim DH, Cupalová J, Rulík M (2009) Fylogenetická analýza metanogenních archeí a metanotrofních bakterií v hyporheickém sedimentu pomocí klonování a sekvenace genů *mcrA* a 16S rRNA genů (abstrakt). In: Sborník příspěvků (L Kröpfelová, J Šulcová, eds.), pp. 31-32. XV. konference České limnologické společnosti a Slovenskej limnologickej spoločnosti, Třeboň, 22.-26.6. 2009 - POSTER

Mach V, Cupalová J, **Brablcová L**, Buriánková I, Čáp L, Rulík M (2009) Odpovídá metanogenní a metanotrofní aktivita hyporheických sedimentů malého nížinného toku Sitka složení bakteriálního společenstva? (abstrakt). In: Sborník příspěvků (L Kröpfelová, J Šulcová,

eds.), pp. 173-174. XV. konference České limnologické společnosti a Slovenskej limnologickej spoločnosti, Třeboň, 22.-26.6. 2009 - POSTER

Brablcová L, Buriánková I, Rulík M (2009) Mikrobiální biofilmy tekoucích vod (abstrakt). In: Zborník prednášok a posterov (M Prokšová, M Seman, eds.), pp. 42-49. Konference ČSSM - Mikrobiológia vody 2009, Poprad, 30.9.-2.10. 2009 - PŘEDNÁŠKA

Buriánková I, **Brablcová L**, Cupalová J, Mach V, Rulík M (2009) Využití moderních molekulárních metod pro detekci metanogenů a metanotrofních bakterií ze sedimentů tekoucích vod (abstrakt). In: Zborník prednášok a posterov (M Prokšová, M Seman, eds.), pp. 120-127. Konference ČSSM - Mikrobiológia vody 2009, Poprad, 30.9.- 2.10. 2009 - PŘEDNÁŠKA

Buriánková I, Mach V, **Brablcová L**, Hýblová A, Badurová P, Rulík M (2010) Linking biogeochemistry of methane and molecular detection of methanogens and methanotrophs in river sediments. Fresh Blood for Fresh Water, Lunz am See, Austria, 2-4 July 2010 - POSTER

Brablcová L, Buriánková I, Cupalová J, Mach V, Hýblová A, Badurová P, Rulík M (2010) Activity and structure of microbial biofilm in river sediments with focus on methane production (abstract) In: Conference Handbook, pp. 54. Biofilms 4th International Conference, Winchester, UK, 1-3 September 2010 - POSTER

Brablcová L, Buriánková I, Hýblová A, Badurová P, Cupalová J, Mach V, Bednařík A, Rulík M (2010) Struktura a distribuce mikrobiálního společenstva hyporheického biofilmu ve vztahu k procesům metanogeneze a metanotrofie (abstrakt). In: Sborník abstraktů a příspěvků, pp. 3. Symposium Říční dno VII, Šlapanice u Brna, 2.-4.11. 2010 - PŘEDNÁŠKA

Rulík M, **Brablcová L**, Buriánková I, Cupalová J, Mach V, Hýblová A, Badurová P, Bednařík A, Vašková M, Čáp L (2010) Hyporheický biotop a jeho význam pro fungování toku: stav našeho poznání v roce 2010 (abstrakt). In: Sborník abstraktů a příspěvků, pp. 48. Symposium Říční dno VII, Šlapanice u Brna, 2.-4.11. 2010- PŘEDNÁŠKA

Badurová P, Buriánková I, **Brablcová L**, Bednařík A, Mach V, Rulík M (2011) Detekce a vertikální distribuce metanogenních archeí v říčním sedimentu toku Sitka (abstrakt). In: Sborník referátů (D Baudišová ed.), pp. 3-5. Mikrobiologie vody a prostředí 2011, Tupadly - Kokořínsko, 17.-19.10. 2011 - PŘEDNÁŠKA

Brablcová L, Buriánková I, Badurová P, Rulík M (2011) Stručný přehled metod pro analýzu společenstva metanogenů v hyporheických sedimentech říčního toku (abstrakt). In: Sborník referátů (D Baudišová ed.), pp. 10-12. Mikrobiologie vody a prostředí 2011, Tupadly - Kokořínsko, 17.-19.10. 2011 - PŘEDNÁŠKA

Buriánková I, **Brablcová L**, Rulík M (2011): Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE) a její využití ve výzkumu metanogenních archeí (abstrakt). In: Sborník referátů (D Baudišová ed.), pp. 13-16. Mikrobiologie vody a prostředí 2011, Tupadly - Kokořínsko, 17.-19.10. 2011 - PŘEDNÁŠKA

Brablcová L, Buriánková I., Badurová P, Rulík M (2012) Využití denaturační gradientové gelové elektroforézy (DGGE) k analýze společenstva metanogenů (abstrakt) In: Zborník príspevkov (Z Čiamporová-Zaťovičová, E Štefková, eds.), pp. 181. XVI. Konferencia České limnologické společnosti a Slovenskej limnologickej spoločnosti, Jasná - Nízké Tatry, 25.-29.6. 2012 - POSTER

Buriánková I, **Brabcová L**, Badurová P, Bednařík A, Mach V, Rulík M (2012) Diverzita metanogenních archeí v hyporheickém sedimentu říčky Sitky (abstrakt). In: Zborník príspevkov (Z Čiamporová-Zaťovičová, E Štefková, eds.), pp. 182. XVI. Konferencia České limnologické společnosti a Slovenskej limnologickej spoločnosti, Jasná - Nízke Tatry, 25.-29.6. 2012 - POSTER

Rulík M, Badurová P, **Brabcová L**, Buriánková I, Gratzová K, Mach V, Bednařík A (2012) Srovnání mikrobiálního osídlení tří velikostních frakcí říčního sedimentu (abstrakt). In: Zborník príspevkov (M Prokšová, ed.), pp. 115-122. Konferencie ČSSM - Mikrobiológia vody a životného prostredia, Nový Smokovec - Vysoké Tatry, 12.-14. 9. 2012

MINISKRIPTA

Brabcová L, Buriánková I (2009) Vybrané molekulární metody v mikrobiální ekologii vod - Pracovní texty a protokoly vybraných metod, pp. 43. Za podpory *FRVŠ 2135/2009* - Obohacení výuky studentů v oblasti aplikace vybraných molekulárních metod na pozadí problematiky přírodních biofilmů.

Buriánková I, **Brabcová L** (2010) Technologie klonování genů: princip, aplikace a využití v mikrobiální ekologii vody - Pracovní text a protokoly, pp. 16. Za podpory *FRVŠ 2874/2010* - Obohacení vzdělání studentů v oblasti technologií klonování a sekvenace DNA na pozadí problematiky přírodních biofilmů.

Badurová P, **Brabcová L**, Buriánková I (2011) Metody detekce životaschopnosti a aktivity mikrobiálního společenstva - Pracovní text vybraných metod včetně metodických postupů, pp. 17. Za podpory *FRVŠ 3113/2011* - Inovace předmětů mikrobiální ekologie se zaměřením na metabolickou aktivitu a životaschopnost bakterií v říčním sedimentu.

VIII. ŽIVOTOPIS

ŽIVOTOPIS



Mgr. Lenka BRABLCOVÁ
U Obory 1159
Mutěnice, 696 11

Narozena 26.1. 1983 v Hodoníně
Národnost: česká
E-mail: formicula@email.cz
Telefon: 608 833 023

VZDĚLÁNÍ

<i>Od r. 2007</i>	<i>Katedra ekologie a životního prostředí, PřF UP v Olomouci, obor Ekologie Student doktorského studijního programu</i>
<i>2002 / 2007</i>	<i>Katedra ekologie a životního prostředí, PřF UP v Olomouci, obor Ochrana a tvorba životního prostředí Studium ukončeno státní magisterskou zkouškou s vyznamenáním</i>
<i>1996 / 2002</i>	<i>Gymnázium Hodonín Studium ukončeno maturitní zkouškou s vyznamenáním</i>

PRACOVNÍ ZKUŠENOSTI

<i>Od června 2012</i>	<i>Lektor a věcný manažer (PřF UP v Olomouci)</i>
<i>březen – květen 2012</i>	<i>Operátor vymáhání pohledávek (Česká spořitelna, Ostrava)</i>
<i>říjen 2009 – listopad 2011</i>	<i>Vědecký pracovník biologických oborů (PřF UP v Olomouci)</i>

ZAHRANIČNÍ ZKUŠENOSTI

<i>březen – květen 2009</i>	<i>Zahraniční studijní pobyt, Hankuk University of Foreign studies, Soul, Korea</i>
-----------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------

JINÉ AKTIVITY V OBORU

<i>Od r. 2006</i>	<i>Členka ČLS (Česká limnologická společnost)</i>
-------------------	---------------------------------------------------

VÝZKUMNÉ A VZDĚLÁVACÍ PROJEKTY

<i>2011</i>	<i>FRVŠ 3113/2011 – spoluřešitel</i>
<i>2010</i>	<i>FRVŠ 2874/2010 – spoluřešitel</i>
<i>2009</i>	<i>FRVŠ 2135/2009 – spoluřešitel</i>
<i>2008</i>	<i>FRVŠ 2432/2008 – hlavní řešitel</i>
<i>2008 - 2012</i>	<i>GAČR 526/09/1639 – člen řešitelského týmu</i>

OSTATNÍ

Jazyky: anglický jazyk - vyšší pokročilá
Práce s počítačem: Word, Excel, Power Point, internet
Ostatní: řidičský průkaz sk. B
Zájmy: cestování, snowboarding, četba, horská turistika

V Olomouci 19.12. 2012

Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Katedra ekologie a životního prostředí



MIKROBIÁLNÍ BIOFILMY TEKOUČÍCH VOD A JEJICH VÝZNAM PRO METANOGENEZI

Lenka Brablcová

Autoreferát disertační práce

Olomouc 2013

Brablcová L (2013) Mikrobiální biofilmy tekoucích vod a jejich význam pro metanogenezi. Doktorská disertační práce, Katedra ekologie a životního prostředí, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

Studijní program Ekologie a ochrana prostředí, obor Ekologie

Autorka: **Lenka Brablcová**
Katedra ekologie a životního prostředí
PřF UP v Olomouci

Školitel: **doc. RNDr. Martin Rulík, Ph.D.**
Katedra ekologie a životního prostředí
PřF UP v Olomouci

Oponenti:
.....
.....

.....
.....
.....

Obhajoba disertační práce se koná dne v hodin v učebně BII na Katedře ekologie a životního prostředí PřF UP v Olomouci, Tř. Svobody 26, 771 46, Olomouc.

S disertační prací je možné se seznámit na Děkanátě PřF UP v Olomouci, tř. 17. listopadu 12, 771 46, Olomouc.

ABSTRAKT

Mikrobiální biofilmy hrají ve vodních ekosystémech významnou roli v procesu degradace organických látek, jsou centrem metabolické aktivity a umožňují existenci širokého spektra mikrobiálních společenstev. V tekoucích vodách se biofilmové nárosty vyskytují nejčastěji na ponořených substrátech, jako jsou kameny, kořeny stromů, vodní makrofyta, makroskopické agregáty, ale také bentický a hyporheický sediment. Přestože sedimenty tekoucích vod bývají považovány za aerobní prostředí, zdá se, že mohou obsahovat nepravidelně uskupené anoxické a hypoxické kapsy, jež vytváří v sedimentu mozaiku různých typů prostředí. Tato různá prostředí podmiňují existenci rozmanitých mikrobiálních společenstev, jimiž zprostředkované odlišné mikrobiální procesy mohou v tomto prostředí probíhat současně. Aerobní i anaerobní metabolické procesy jsou významné nejen pro odbourávání organických látek a dynamiku dekompozice, ale také pro základní tok energie a koloběh elementárních prvků v celém ekosystému. Rozklad organické hmoty je klíčovým procesem v lokálním i globálním koloběhu uhlíku, kdy dochází k uvolňování potenciálních skleníkových plynů (metan, oxid uhličitý). Proto mají procesy, probíhající v biofilmu sedimentů význam i z hlediska zvyšování obsahu skleníkových plynů v atmosféře a globálním oteplování.

Tato disertační práce se zabývá analýzou společenstva mikroorganismů, jež se vyskytují v biofilmovém konsorciu a podílí se na procesech metanogeneze. Abychom lépe pochopili roli mikroorganismů v environmentálních procesech, je prvním krokem k pochopení funkce společenstva jeho detekce a identifikace. V této práci jsme pro analýzu mikrobiálních společenstev použili široké spektrum detekčních metod, se zaměřením na metody molekulární. Molekulární biologické techniky nabízí nové možnosti detekce, analýzy diverzity a složení mikrobiálního společenstva. Výstupy těchto metod a jejich vzájemné propojení nám mohou poskytnout obraz o vztazích a fungování společenstva v přírodních ekosystémech.

Klíčová slova: biofilm, hyporheický sediment, metan, tekoucí vody

ABSTRACT

Microbial biofilms play a fundamental role in organic matter decomposition, they are hot spots of microbial activity and allow coexistence of a great diversity of microbial communities. Microbial biofilms are formed in rivers on submerged surfaces such as stones, plants, roots, macroscopic aggregates and also benthic and hyporheic sediments. The seemingly well-oxygenated river sediments contain anoxic and hypoxic pockets associated with irregularities in sediment surfaces and creating a mosaic structure of various environments, where different microbial populations can live and different microbially mediated processes can occur simultaneously. Aerobic and anaerobic metabolic processes are important not only for decomposition dynamics, but also for energy and nutrient cycling within a whole ecosystem.

Moreover, organic matter decomposition in sediments is an important process in global and local carbon budgets as it ultimately recycles complex organic compounds from environments to carbon dioxide and methane. Thus the river sediment biofilms may act as a considerable source of these greenhouse gases which are important in global warming.

The aim of this Ph.D. thesis is to analyse microbial community occurring in biofilm structure and influencing the processes of methanogenesis. An important first step towards understanding the role of microorganisms in environmental processes is their detection and determination. We have used a variety of molecular biological techniques for microbial community analysis, with focus on detection, microbial diversity and community structure determination. The application of these methods and their combination can help us in understanding the microbial processes and their impact on whole ecosystem.

Key words: biofilm, hyporheic sediment, methane, running waters

OBSAH

Struktura disertační práce	6
Úvod	7
Mikrobiální biofilmy	7
Přírodní biofilmy ve vodních ekosystémech	8
Hyporheický biofilm a produkce metanu	9
Mikroorganismy v procesu metanogeneze	10
Cíle disertační práce	11
Studované lokality	11
Vybrané detekční metody	12
Shrnutí výsledků	13
Literatura	15
Abstrakty publikací a příspěvků zahrnutých v disertační práci	18
Publikační činnost	21

STRUKTURA DISERTAČNÍ PRÁCE

Disertační práci tvoří publikace nebo manuskripty, jenž jsou označeny římskými číslicemi I. – VI.

I.

Brablcová L, Buriánková I, Badurová P, Rulík M (2012) The phylogenetic structure of microbial biofilms and free-living bacteria in a small stream, *Folia Microbiol*, DOI 10.1007/s12223-012-0201-y (in press)

II.

Buriánková I, Brablcová L, Mach V, Hýblová A, Badurová P, Cupalová J, Čáp L, Rulík M (2012) Methanogens and methanotrophs distribution in the hyporheic sediments of a small lowland stream. *Fundam Appl Limnol* (17): 87-102

III.

Rulík M, Mach V, Cupalová J, Brablcová L, Buriánková I, Čáp L (2008) Running waters as an important source of methane emissions to atmosphere: preliminary results from the Sitka stream, Czech Republic. *J Environ Sci Eng* (10): 43-52.

IV.

Brablcová L, Buriánková I, Badurová P, Rulík M (2012) Occurrence and diversity of methanogenic archaea detected by FISH and DGGE in stream hyporheic sediment. *Submitted to Environ Microbiol*

V.

Brablcová L, Buriánková I, Rulík M (2009) Mikrobiální biofilmy tekoucích vod. In: *Zborník prednášok a posterov* (M Prokšová, M Seman, eds.), pp. 42-49. Konferencie ČSSM - Mikrobiológia vody 2009

VI.

Rulík M, Badurová P, Brablcová L, Buriánková I, Gratzová K, Mach V, Bednařík A (2012) Srovnání mikrobiálního osídlení tří velikostních frakcí říčního sedimentu. In: *Zborník příspěvků* (M Prokšová, ed.), pp. 115-122. Konferencie ČSSM - Mikrobiológia vody a životného prostredia 2012

ÚVOD

Mikrobiální biofilmy

Mikrobiální společenstva se ve vodním prostředí vyskytují buď ve formě planktonních mikroorganismů nebo jako přisedlá biofilmová komunita (Van Horn et al. 2011). Odhaduje se, že 99% bakterií, vyskytujících se v přírodním prostředí, žije v biofilmu nebo alespoň přetrvává na nějakém povrchu (Costerton et al. 1987).

Existuje celá řada definic biofilmu, obecně jej lze charakterizovat jako komplexní soustavu mikroorganismů (bakterií, archeí, sinic, hub, řas a prvoků), které produkují extracelulární polymerní produkty a vytváří tak na podkladu funkční mikrobiální konsorcium ukotvené v rozsáhlé polymerní matici (Lock et al. 1984, Costerton et al. 1987, Neu et Lawrence 1997, Fried et al. 2000). Jedna z nejaktuálnějších definic popisuje biofilm jako „přisedlé společenstvo mikroorganismů, charakterizované tím, že buňky, které jsou ireverzibilně přichyceny k podkladu nebo k sobě navzájem, jsou zanořeny v matici svých extracelulárních produktů a vykazují odlišný fenotyp s ohledem na rychlost růstu a transkripci genů“ (Donlan et Costerton 2002).

Mikroorganismy žijí v biofilmu z mnoha důvodů, polysacharidová matrice je nejen místem akumulace živin, ale slouží také jako bariéra, jež chrání mikrobiální společenstvo před predátory, patogeny, extrémními podmínkami prostředí jako pH, teplota, UV-záření, vysychání nebo působení toxických látek a antibiotik (Lock 1994, Paerl et Pinckney 1996, Boureau et al. 2003, Hall-Stoodley et al. 2004).

Další výhodou biofilmu je koexistence více mikrobiálních druhů, kdy jeden druh mikroorganismu využívá produkty metabolismu jiného druhu, což umožňuje přežívání „obyvatel“ biofilmu i v prostředí chudém na živiny (Korber et al. 1995). Biofilmová společenstva také umožňují mikroorganismům přetrvat v tomto výhodném prostředí a nebyť odplaveny vodním proudem (Johnson 2008).

Biofilm nalezneme prakticky všude, kde je relativní dostatek vody, živin, přiměřená výměna plynů a jakýkoli povrch. Kromě přírodního prostředí se biofilmy vyskytují i v četných průmyslových odvětvích (vodárenství, čistírenství) či humánní medicíně.

Přírodní biofilmy ve vodních ekosystémech

V tekoucích vodách kolonizuje biofilmové společenstvo ponořené substráty, jako jsou kameny, kořeny stromů, vodní makrofyta, ale také bentický a hyporheický sediment a makroskopické agregáty (Romaní et al. 2004, Grossart et Ploug 2000, Eggert et Wallace 2007, Hempel et al. 2008)

Jak už bylo řečeno, ne všechny mikroorganismy, vyskytující se ve vodních ekosystémech, žijí v biofilmu. Bakterie, které žádný povrch nekolonizují, jsou dispergovány ve vodním sloupci a jsou velmi často označovány jako tzv. free-living, tedy volně žijící bakterie. I když planktonní buňky sdílejí s buňkami žijícími v biofilmu stejné funkce zpracování živin, jsou „obyvatelé“ biofilmu mnohem aktivnější než planktonní mikroorganismy. Důvodem může být skutečnost, že metabolismus planktonních mikroorganismů je ovlivňován pouze dostupností alochtonních zdrojů (živiny z okolního prostředí) a top-down efektem predátorů a jsou zde téměř zanedbatelné synergické a kooperativní vazby (Dufour et Torrétou 1996, Thelaus et al. 2008). Protože je biofilm vysoce strukturovaným společenstvem vzájemně kooperujících mikroorganismů, využívají buňky v biofilmu nejen alochtonní zdroje živin z okolí, ale také živiny vznikající přímo uvnitř biofilmu (autochtonní zdroje živin), jež produkují především sinice a řasy (Sobczak 1996, Pohlen et al. 2010, Romaní 2010). Většina dostupných živin se však nachází ve formě vysokomolekulárních látek a není proto pro mikroorganismy přímo využitelná. Tyto látky musí projít procesem degradace, na níž se podílí široká škála extracelulárních enzymů. Hlavními producenty těchto extracelulárních enzymů jsou především bakterie, v menší míře také houby a řasy (Romaní 2010).

Díky této degradační schopnosti tak hrají biofilmy ve vodních ekosystémech klíčovou roli v odbourávání organických látek a uvolňování živin do okolního prostředí (Chróst et Overbeck 1990, Meyer 1994). Protože jsou biofilmy nejen centrem transformace látek z prostředí, ale také místem jejich akumulace a imobilizace, má biofilm ve vodních ekosystémech významnou funkci nejen jako biondikátor znečištění, ale i jako „zpracovatel“ vodních polutantů, čímž významně přispívá k samočištění vodních toků (Mickelburg et al. 1984, Fried et al. 2000, Froehner 2012, Rulík 2012). Mikroorganismy biofilmu jsou také součástí potravních řetězců a prostřednictvím tzv. mikrobiální smyčky slouží jako potravní zdroje pro organismy na vyšších trofických úrovních (Azam et al. 1983)

Hyporheický biofilm a produkce metanu

Bentické sedimenty tekoucích vod poskytují vysokou aktivní plochu pro přichycení a vývoj mikrobiálního společenstva. Biofilmové společenstvo se však nevyskytuje pouze na povrchu sedimentu, ale kolonizuje také sedimenty pod povrchem říčního dna. Biotop, jenž se nachází pod povrchem říčního dna, se nazývá hyporheická zóna (Arnon et al. 2010, Wong a Williams 2010) a je definována jako intersticiální (porézní) oblast pod povrchem říčního dna, zásobovaná částečně vodou z koryta a částečně vodou podzemní. Hyporheická zóna je centrum vysoké metabolické aktivity a hraje proto významnou roli v procesu samočištění, akumulace, mineralizace a přeměny živin (Hendricks 1993, White 1993, Jones et Holmes 1996, Storey et al. 1999, Fischer et al. 2005).

Zdánlivě dobře okysličená hyporheická zóna obsahuje anoxická a hypoxická místa, tzv. anaerobní mikrohabitaty, a vytváří tak mozaikovitou strukturu environmentálně odlišných prostředí, jež poskytují optimální podmínky pro existenci širokého spektra mikrobiálních populací (Baker et al. 1999, Storey et al. 1999, Morrice et al. 2000, Fischer et al. 2005). Protože je degradace organické hmoty závislá na enzymatické aktivitě těchto mikrobiálních populací, dochází v hyporeálu k odbourávání organické hmoty jak za oxických, tak za anoxických podmínek. V hyporheické zóně se vyskytuje široká škála anaerobně respiračních procesů, jako je např. respirace nitrátu, železa, sulfátu či metanogenní respirace (Storey et al. 1999). Většina těchto procesů je řízena aktivitou vzájemně kooperujícího biofilmového společenstva, kdy např. metanogenní archea využívají produkty metabolismu některých jiných „obyvatel“ biofilmu (fermentačních a acidogenních bakterií), za vzniku finálního produktu – metanu (Dolfing 1988, Ferry 1993, Hornibrook et al. 2000). Metanogeneze je striktně anaerobním procesem, v biofilmu k ní dochází buď za předpokladu, že se biofilmové společenstvo nachází v anaerobním prostředí, anebo v případě, že má biofilmová vrstva dostatečnou tloušťku a umožňuje tak vznik anoxického prostředí v hlubších vrstvách biofilmu (Damgaard et al. 2001).

Metan (CH_4) je významným komponentem v geochemickém cyklu uhlíku ve vodních ekosystémech, a protože v mnohých říčních sedimentech byla naměřena jeho vysoká koncentrace (Schindler et Krabbenhoft 1998, Hlaváčová et al. 2005, Sanders et al. 2007, Wilcock et Sorrell 2008), můžeme říční sedimenty považovat za významný zdroj tohoto

skleníkového plynu, jenž se podílí na globálních klimatických změnách (Hlaváčová et al. 2006).

Mikroorganismy v procesu metanogeneze

Metan je produkován výhradně prostřednictvím metanogenních archeí, jakožto finální produkt anaerobní respirace (Garcia et al. 2000, Chaban et al. 2006). Metanogenní archea, náležící do kmene *Euryarchaeota*, se dělí na 5 řádů: *Methanopyrales*, *Methanococcales*, *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales* a *Methanosarcinales*. Fylogenetické analýzy odhalily, že metanogeny mohou být také rozděleny do dvou tříd. Metanogenní „třída I“ sdružuje řády *Methanopyrales*, *Methanobacteriales* a *Methanococcales*, zatímco „třída II“ je tvořena dvěma zbývajících řády: *Methanomicrobiales* a *Methanosarcinales* (Baptiste et al., 2005). Metanogeny se vyskytují zejména v anoxických prostředích s extrémně nízkým redoxním potenciálem. Míra produkce metanu je ve vodních sedimentech kontrolována především dostupností prekurzorů metanogeneze - acetátu a H_2/CO_2 (Conrad 2007).

V přírodních sladkovodních ekosystémech dochází přirozeně vedle produkce metanu také k jeho odbourávání. Ke spotřebě metanu může docházet jak za aerobních, tak za anaerobních podmínek. Aerobní oxidace metanu je častějším jevem a zodpovídají za ni metan-oxidující bakterie, neboli metanotrofy. Metanotrofní bakterie patří do kmene *Proteobacteria* a stejně jako metanogeny se dělí na dvě základní skupiny. Metanotrofy „typu I“ taxonomicky náleží do třídy *Gammaproteobacteria* a do čeledi *Methylococcaceae*, jež sdružuje ještě další dvě podskupiny; druhou skupinu tvoří metanotrofy „typu II“, jež patří do třídy *Alphaproteobacteria* a sdružují čeledě *Methylocystaceae* a *Beijerinckiaceae* (Bowman 2006, Semrau et al. 2010). Metanotrofy jsou specializovanou skupinou metylotrofních bakterií, které využívají metan jakožto zdroj uhlíku a donor elektronů, přičemž elektronovým akceptorem je zde O_2 . Oxidace metanu proto přímo závisí na dostupnosti těchto dvou zdrojů (Hanson et Hanson 1996). Protože jsou metanotrofní bakterie závislé na činnosti metanogenních archeí, hrají tyto dvě skupiny mikroorganismů významnou roli v procesu vzniku/spotřeby metanu a výrazně tak ovlivňují koloběh uhlíku ve vodních ekosystémech.

CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem disertační práce bylo analyzovat společenstvo mikroorganismů, vyskytující se v biofilmovém konsorciu a podílející se na procesech metanogeneze v přirozeném prostředí vodního toku.

V disertační práci byly sledovány dva hlavní cíle:

Charakterizovat a porovnat biofilmové společenstvo mikroorganismů, kolonizující různé typy substrátu a společenstvo planktonních mikroorganismů pomocí determinace

- fylogenetické struktury planktonního a biofilmového společenstva
- buněčné biomasy planktonního a biofilmového společenstva
- enzymatické aktivity planktonního a biofilmového společenstva

Detekovat a popsat společenstva mikroorganismů zapojených do metanogenního cyklu v biofilmu hyporheického sedimentu se zaměřením na

- distribuci společenstva metanogenních archeí a metanotrofních bakterií
- diverzitu společenstva metanogenních archeí

STUDOVANÉ LOKALITY

Bystřice je 53.9 km dlouhá řeka 2. řádu, pramenící v Nížkém Jeseníku v nadmořské výšce 600m. Je levostranným přítokem řeky Moravy, do níž se vlévá v Olomouci. Plocha povodí je 267.4 km² a průměrný průtok činí 1.88 m³/s.

Bystřice je neregulovaným tokem s bohatou ripariální vegetací. Studovaná lokalita (49°44'N, 17°26'E) se nachází v Přírodním parku Údolí Bystřice, kde řeka vytváří hluboké skalnaté údolí s kaňony, na nichž se prosadily kvalitní lesní porosty místy připomínající prales.

Sitka je 35 km dlouhá řeka 3. řádu, pramenící v Hrubém Jeseníku v nadmořské výšce 650 m. Plocha povodí je 118.81 km² a průměrný průtok činí 0.81 m³/s. Sitka se vlévá do řeky Oskavy asi 5 km severně od Olomouce.

V horním úseku toku řeka protéká zalesněným územím s minimálním antropogenním vlivem, zatímco ve své dolní části řeka přirozeně meandruje zemědělsky intenzivně využívanou krajinou. Až na malé úseky je Sitka převážně neregulovaným tokem s bohatou ripariální vegetací.

VYBRANÉ DETEKČNÍ METODY

V současné době se k detekci, identifikaci a charakteristice společenstva mikroorganismů používá široká škála detekčních metod. V minulosti hojně rozšířená metoda kultivace mikroorganismů dnes již zvolna ustupuje moderním molekulárním technikám, jež jsou schopny detekovat i nekultivovatelné mikroorganismy. Molekulární biologické techniky nabízí nové možnosti detekce a analýzy diverzity a složení mikrobiálního společenstva (Muyzer et al. 1993, Amann et al. 1995, Araya et al. 2003). Mezi nejčastěji používané metody detekce patří vizualizace mikroorganismů prostřednictvím molekulárně vázaných fluorochromů, jež se používají nejen k určení *celkové abundance a biomasy* mikroorganismů (nejčastěji pomocí fluorochromu DAPI), ale také k identifikaci jejich *fylogenetických vztahů*, prostorové distribuci ve vzorku a relativní abundanci (metoda fluorescenční *in situ* hybridizace - FISH)(Porter et Feig 1980, Pernthaler et al. 2001).

Další molekulární metody slouží např. k odhalení mikrobiální diverzity daného společenstva. K určení *taxonomické diverzity*, hrubého odhadu druhové bohatosti společenstva a vizualizaci převládajících (dominantních) druhů se používá metoda denaturační gradientové gelové elektroforézy (DGGE), založená na separaci molekul DNA v polyakrylamidovém gelu (Tabatabaei et al. 2009).

Neméně hodnotné výsledky poskytují také metody, jež slouží k detekci metabolické aktivity mikrobiálního společenstva. Ke zjištění intenzity metabolických procesů mikrobiálního společenstva se používají metody založené na detekci *enzymatické aktivity*, kdy je po aplikaci substrátu (např. INT, FDA) sledováno množství vzniklého produktu (Tóth 1993, Battin 1997).

Použití metod, které nás informují o výskytu, složení, diverzitě a aktivitě mikrobiálních společenstev a jejich vzájemné propojení, nám může poskytnout obraz o fungování mikrobiálních společenstev v tekoucích vodách a přispět tak ke zvýšení informovanosti v oblasti biodegradability polutantů, znečištění vodních toků a procesů hrajících klíčovou roli v problematice klimatických změn (Neufeld et Mohn 2006).

SHRnutí VÝSLEDKŮ

V první části této práce jsme se zabývali porovnáním mikrobiálního společenstva biofilmu se společenstvem volně žijících bakterií. Konkrétně jsme se zaměřili na biofilmy tekoucích vod, kolonizující povrchy sedimentu, kamenů, vodních makrofyt, kořenů ripariální vegetace a makroskopických agregátů vodního sloupce.

Pro srovnání jsme využili mikrobiálních parametrů, jako jsou celková abundance a biomasa, buněčný objem, enzymatická aktivita a fylogenetická struktura studovaných společenstev.

Co se fylogenetické struktury týče, potvrdili jsme přítomnost zástupců obou studovaných domén (*Bacteria*, *Archaea*) i podskupin proteobakterií (*Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-*, *Deltaproteobacteria*), jak pro všechna biofilmová společenstva, tak i pro volně žijící bakterie. Z kvantitativního hlediska byl říční kámen substrátem, u něhož bylo nejvyšší zastoupení téměř všech fylogenetických skupin, naopak celkově nejnižší relativní počty byly nalezeny u volně žijících bakterií.

Celková abundance a buněčná biomasa byly nejvyšší v biofilmu sedimentu a kořene; průměrně nejvyššího buněčného objemu dosáhlo biofilmové společenstvo kamene, zatímco nejnižší hodnoty byly detekovány v sedimentu.

Při studiu enzymatických aktivit vykazovalo nejvyšší aktivitu biofilmové společenstvo sedimentu a kamene a ve srovnání s mikroorganismy volné vody, byla aktivita v sedimentu mnohonásobně vyšší. Při porovnání velikostních frakcí sedimentu byla nejvyšší aktivita potvrzena u nejmenší frakce (<1 mm), stejně jako další studované parametry (celková abundance, biomasa, množství polysacharidů i abundance metanogenních archeí).

Ve druhé části práce jsme se zaměřili na detekci a identifikaci společenstva metanogenních archeí a metanotrofních bakterií ve dvou hloubkových frakcích hyporheického sedimentu (povrchová a hloubková frakce). Vzorky sedimentu byly odebrány na pěti lokalitách v podélném profilu malého nížinného toku. Kromě samotné detekce jsme studovali také další parametry společenstva, jako jsou enzymatická a metanotrofní aktivita, metanogenní potenciál a v neposlední řadě genetická diverzita metanogenních archeí.

Jak metanogenní archea, tak i metanotrofy byly detekovány na všech lokalitách a v obou zkoumaných hloubkových profilech sedimentu, přičemž s rostoucí hloubkou

vykazovaly obě skupiny rostoucí podíl ve společenstvu. Naopak hodnoty ostatních zkoumaných parametrů (enzymatická a metanotrofní aktivita, metanogenní potenciál) byly vyšší v povrchové vrstvě hyporheického sedimentu.

Z hlediska genetické diverzity jsme identifikovali mezi lokalitami 19 odlišných metanogenních taxonů. Získaná data byla dále analyzována pomocí shlukové analýzy, jež odhalila tři skupiny lokalit, lišící se množstvím dominantních taxonů. První skupinu tvořily lokality dolní části toku s výrazně vyšším počtem taxonů, další dvě skupiny lokalit (s nižším počtem taxonů) se nacházely v horním úseku toku. Jako nejbohatší se jevila lokalita č. 4 (v dolní části toku), na níž sekvenační analýza odhalila jeden ze dvou nalezených metanogenních rodů, patřící do řádu *Methanomicrobiales*. Druhý zástupce metanogenních archeí byl nalezen také v dolní části toku (na lokalitě č. 5) a taxonomicky náleží do řádu *Methanosarcinales*.

LITERATURA

- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59: 143-169.
- Araya R, Tani K, Takagi T, Yamaguchi N, Nasu M (2003) Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis. *FEMS Microbiol Ecol* 43: 111-119.
- Arnon S, Marx LP, Searcy KE, Packman AI (2010) Effects of overlying velocity, particle size, and biofilm growth on stream - subsurface exchange of particles. *Hydrol Process* 24: 108–114.
- Azam F, Fenchel T, Field JG, Gray JS, Meyer-Reil LA, Thingstad F (1983) The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. *Mar Ecol Prog Ser* 10: 257-263.
- Baker MA, Dahm CN, Vallet HM (1999) Acetate retention and metabolism in the hyporheic zone of a mountain stream. *Limnol Oceanogr* 44: 1530 – 1539.
- Bapteste E, Brochier C, Boucher Y (2005) Higher-level classification of the Archaea: evolution of methanogenesis and methanogens. *Archaea* 1: 353-363.
- Battin TJ (1997) Assessment of fluorescent diacetate hydrolysis as a measure of total esterase activity in natural stream sediment biofilms. *Sci Total Environ* 198: 51-60.
- Bureau T, Jacques MA, Berruyer R, Dessaux Y, Dominguez H, Morris CE (2003) Comparison of the phenotypes and genotypes of biofilm and solitary epiphytic bacterial populations on broadleaved endive. *Microb Ecol* 47:87–95.
- Bowman J (2006) The Methanotrophs - The Families Methylococcaceae and Methylocystaceae. In: *The Prokaryotes*, Vol. 5 (M Dworkin, ed.), pp. 266-289. Springer -Verlag, New York, USA.
- Chaban B, Ng SYM, Jarrell KF (2006) Archaeal habitats – from the extreme to the ordinary. *Can J Microbiol* 52: 73-116.
- Chróst RJ, Overbeck J (1990) Substrate ectoenzyme interaction: significance of beta-glucosidase activity for glucose-metabolism by aquatic bacteria. *Arch Hydrobiol* 34:93-98.
- Conrad R (2007) Microbial ecology of methanogens and methanotrophs. *Adv Agron* 96: 1-63.
- Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ (1987) Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann Rev Microbiol* 41: 435-464.
- Damgaard LR, Nielsen LP, Revsbech NP (2001) Methane microprofiles in a sewage biofilm determined with a microscale biosensor. *Wat Res* 35 (6): 1379–1386.
- Dolfing J (1988) Acetogenesis. In: *Biology of Anaerobic Microorganisms* (AJB Zehnder, ed.), pp. 417–468. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- Donlan RM, Costerton JW (2002) Biofilms: Survival mechanism of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15:167-193.
- Dufour PH, Torrétón JP (1996) Bottom-up and top-down control of bacterioplankton from eutrophic to oligotrophic sites in the tropical northeastern Atlantic Ocean. *Deep- Sea Res I* 43:1305–1320.
- Eggert SL, Wallace JB (2007) Wood biofilm as a food resource for stream detritivores. *Limnol Oceanogr* 52:1239–1245.
- Ferry JG (1993) Fermentation of acetate. In: *Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics* (JG Ferry, ed.), pp.304–334. Chapman & Hall, London, UK.
- Fischer H, Kloep F, Wilczek S, Pusch MT (2005) A river's liver - microbial processes within the hyporheic zone of a large lowland river. *Biogeochemistry* 76: 349-371.
- Fried J, Mayr G, Berger H, Traunspurger W, Psenner R, Lemmer H (2000) Monitoring protozoa and metazoa biofilm communities for assessing wastewater quality impact and reactor up-scaling effects. *Water Sci Technol* 41: 309–316.
- Froehner S, Machado KS, Dombroski LF, Nunes AC, Kishi RT, Bleninger T, Sanz J (2012) Natural Biofilms in Freshwater Ecosystem: Indicators of the Presence of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Water Air Soil Pollut* 223:3965–3973.
- Garcia JL, Patel BKC, Ollivier B (2000) Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe* 6: 205-226.

- Grossart HP, Ploug H (2000) Bacterial production and growth efficiencies: direct measurement on riverine aggregates. *Limnol Oceanogr* 45:436–445.
- Hanson RS, Hanson TE (1996) Methanotrophic bacteria. *Microbiol Rev* 60: 439-471.
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2:95–108.
- Hempel M, Blume M, Blindow I, Gross EM (2008) Epiphytic bacterial community composition on two common submerged macrophytes in brackish water and freshwater. *Microbiology* 8:1–10.
- Hendricks SP (1993) Microbial ecology of the hyporheic zone: a perspective integrating hydrology and biology. *J N Am Benthol Soc* 12: 70-78.
- Hlaváčová E, Rulík M, Čáp L (2005) Anaerobic microbial metabolism in hyporheic sediment of a gravel bar in a small lowland stream. *River Res Appl* 21: 1003 – 1011.
- Hlaváčová E, Rulík M, Čáp L, Mach V (2006) Greenhouse gases (CO₂, CH₄, N₂O) emissions to the atmosphere from a small lowland stream. *Arch Hydrobiol* 165: 339 –353.
- Hornibrook ERC, Longstaffe FJ, Fyfe WS (2000) Evolution of stable carbon isotope compositions for methane and carbon dioxide in freshwater wetlands and other anaerobic environments. *Geochim Cosmochim Acta* 64: 1013–1027.
- Johnson LR (2008) Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria. *J of Theor Biol* 251: 24–34.
- Jones JB, Holmes RM (1996) Surface-subsurface interactions in stream ecosystems. *TREE* 11: 239-242.
- Korber DR, Lawrence JR, Lappin-Scott HM, Costerton JV (1995) Growth of microorganisms on surfaces. In: *Microbial biofilms* (HM Lappin-Scott & JV Costerton, eds.) pp. 15-45. Cambridge University Press, Cambridge UK.
- Lock MA, Wallace RR, Costerton JW, Ventullo RM, Charlton SE (1984) River epilithon: toward a structural functional model. *Oikos* 42: 10–22.
- Lock MA (1994) Attached microbial communities in rivers. In: *Aquatic microbiology - an ecological approach* (TE Ford, ed.), pp 113–138. Blackwell, Oxford, UK.
- Meyer JL (1994) The microbial loop in flowing waters. *Microb Ecol* 28(2):195–199.
- Mickelburg S, Lock MA, Ford TE (1984) Spatial uptake of dissolved organic carbon in river beds. *Hydrobiologia* 108:115–119.
- Morrice JA, Dahm CN, Valett HM, Unnikrishna P, Campana ME (2000) Terminal electron accepting processes in the alluvial sediments of a headwater stream. *J N Am Benthol Soc* 19: 593-608.
- Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59 (3): 695-700.
- Neu TR, Lawrence JR (1997) Development and structure of microbial biofilms in river water studied by confocal scanning microscopy. *FEMS Microbiol Ecol* 24:11-25.
- Neufeld JD, Mohn WW (2006) Assessment of Microbial Phylogenetic Diversity Based on Environmental Nucleic Acids. In: *Molecular Identification, Systematics, and Population Structure of Prokaryotes* (E Stackebrandt, ed.), pp. 219-259. Springer, Brunschweig, Germany.
- Paerl HV, Pinckney JL (1996) A minireview of microbial consortia: their roles in aquatic production and biogeochemical cycling. *Microb Ecol* 31: 225-247.
- Pernthaler J, Glöckner FO, Schönhuber W, Amann RI (2001) Fluorescence in situ hybridization. In: *Methods in microbiology-marine microbiology* (J Paul, ed.), vol. 30. Academic Press Ltd, London.
- Pohlen E, Marxsen J, Kusel K (2010) Pioneering bacterial and algal communities and potential extracellular enzyme activities of stream biofilms. *FEMS Microbiol Ecol* 71: 364–373.
- Porter KG, Feig YS (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol Oceanogr* 25: 943–948.

- Romaní AM, Giorgi A, Acuna V, Sabater S (2004) The influence of substratum type and nutrient supply on biofilm organic matter utilization in streams. *Limnol Oceanogr* 49:1713–1721.
- Romaní AM (2010) Freshwater biofilms. In: Biofouling (S Durr & JC Thomason, eds.), pp. 137-153. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- Rulík M (2012) Mikrobiální biofilmy – Vodní prostředí. *Živa* 5: 220-223.
- Sanders IA, Heppell CM, Cotton JA, Wharton G, Hildrew AG, Flowers EJ, Trimmer M (2007) Emissions of methane from chalk streams has potential implications for agricultural practices. *Freshw Biol* 52: 1176-1186.
- Schindler JE, Krabbenhoft DP (1998) The hyporheic zone as a source of dissolved organic carbon and carbon gases to a temperate forested stream. *Biogeochemistry* 43: 157-174.
- Semrau JD, Dispirito AA, Yoon S (2010) Methanotrophs and copper. *FEMS Microbiol Rev* 34: 496-531.
- Sobczak WV (1996) Epilithic bacterial responses to variations in algal biomass and labile dissolved organic carbon in water. *J North Am Benthol Soc* 15: 143–154.
- Storey RG, Fulthorpe RR, Williams DD (1999) Perspectives and predictions on the microbial ecology of the hyporheic zone. *Freshwat Biol* 41: 119-130.
- Tabatabaei M, Zakaria MR, Rahim RA, Wright ADG, Shirai Y, Abdullah N et al. (2009) PCR-based DGGE and FISH analysis of methanogens in an anaerobic closed digester tank for treating palm oil mill effluent. *Electron J Biotechnol* 12 (3): 1-12.
- Thelaus J, Haecky P, Forsman M, Andersson A (2008) Predation pressure on bacteria increases along aquatic productivity gradients. *Aquat Microb Ecol* 52:45–55.
- Tóth LG (1993) Measurement of the terminal electron transport system (ETS) activity of the plankton and sediment – International Training Course. Balaton Limnological Res. Inst. of the Hung. Acad. Sci. Hungary
- Van Horn DJ, Sinsabaugh RL, Takacs-Vesbach CD, Mitchell KR, Dahm CN (2011) Response of heterotrophic stream biofilm communities to a gradient of resources. *Aquat Microb Ecol* 64: 149–161.
- White DS (1993) Perspectives on defining and delineating hyporheic zone. *J N Am Benthol Soc* 12 (1): 61-69.
- Wilcock RJ, Sorrell BK (2008) Emissions of greenhouse gases CH₄ and N₂O from low gradient streams in agriculturally developed catchments. *Water Air Soil Poll* 188: 155-170.
- Wong JCI, Williams DD (2010) Sources and seasonal patterns of dissolved organic matter (DOM) in the hyporheic zone. *Hydrobiologia* 647: 99–111.

ABSTRAKTY PUBLIKACÍ A PŘÍSPĚVKŮ ZAHRNUTÝCH V DISERTAČNÍ PRÁCI

I. The phylogenetic structure of microbial biofilms and free-living bacteria in a small stream

Lenka Brablcová, Iva Buriánková, Pavlína Badurová, Martin Rulík

Folia Microbiol., in press

The phylogenetic composition, bacterial biomass, and biovolume of both planktonic and biofilm communities were studied in a low-order Bystřice stream near Olomouc City, in the Czech Republic. The aim of the study was to compare the microbial communities colonizing different biofilm substrata (stream aggregates, stream sediment, underwater tree roots, stream stones, and aquatic macrophytes) to those of free-living bacteria. The phylogenetic composition was analyzed using fluorescence in situ hybridization for main phylogenetic groups. All phylogenetic groups studied were detected in all sample types. The stream stone was the substratum where nearly all phylogenetic groups were the most abundant, while the lowest proportion to the DAPI stained cells was found for free-living bacteria. The probe specific for the domain *Bacteria* detected 20.6 to 45.8 % of DAPI-stained cells while the probe specific for the domain *Archaea* detected 4.3 to 17.9 %.

The most abundant group of *Proteobacteria* was *Alphaproteobacteria* with a mean of 14.2 %, and the least abundant was *Betaproteobacteria* with a mean of 11.4 %. The average value of the *Cytophaga-Flavobacteria* group was 10.5 %. Total cell numbers and bacterial biomass were highest in sediment and root biofilm. The value of cell biovolume was highest in stone biofilm and lowest in sediment. Overall, this study revealed relevant differences in phylogenetic composition, bacterial biomass, and biovolume between different stream biofilms and free-living bacteria.

II. Methanogens and methanotrophs distribution in the hyporheic sediments of a small lowland stream

Iva Buriánková, Lenka Brablcová, Václav Mach, Aneta Hýblová, Pavlína Badurová, Jana Cupalová, Lubomír Čáp, Martin Rulík

Fundam Appl Limnol., 181(2): 87–102

Distribution of microbial activity, methanogenic archaea and type I and II methanotrophs were studied in a small lowland stream Sitka in Czech Republic. The methanogens and methanotrophic bacteria were detected using FISH with 16 S rRNA-targeted oligonucleotide probes. The highest microbial density was obtained in the upper sediment layer 0 – 25 cm; this zone corresponded also to that of the highest metabolic activity, as indicated by the methanogenic potential, methanotrophic activity, INT and FDA profiles. Both methanogenic archaea and aerobic methanotrophs were found at all localities along the longitudinal stream profile. The proportion of these groups to the DAPI-stained cells was quite consistent and varied only slightly but a higher proportion to the DAPI-stained cells in the deeper sediment layer 25 – 50 cm was observed. On average 23.4 % of DAPI-stained cells were detected by FISH with a probe for methanogens while type I methanotrophs reached ~ 21.4 % and type II methanotrophs

11.9 %, respectively. The percentage of DAPI-stained cells hybridizing with methanotroph-specific probes was generally higher for type I than type II. Our data show that the methanogenic archaea and aerobic methanotrophs can be numerically dominant components of the hyporheic biofilm community and affect CH₄ cycling in river sediments.

III. Running waters as important source of methane emissions to atmosphere: preliminary results from the Sitka stream, Czech Republic

Martin Rulík, Václav Mach, Jana Cupalová, Lenka Brablcová, Iva Buriánková, Lubomír Čáp

J Environ Sci Eng 10: 43-52

In order to find whether streams might be the important producers of greenhouse gases into the atmosphere, we focused to determine total emissions of CH₄ from a surface water of the small lowland stream in Czech Republic to the atmosphere. We found that vast majority of annual emissions (90 %) was produced in lower, 7 km long stretch of the stream (localities IV-V), which represent only 1/5 of the total calculated area of the stream. Emissions of the methane to the atmosphere are greatest during the spring and summer period when the water temperature is elevated. Totally, more than half tonne of methane was annually emitted to the atmosphere from the stream water level (~ 0.2 km²). Our findings have also revealed occurrence of methanogen archaea in interstitial water along longitudinal stream profile and that percentual proportion of methanogens to DAPI stained bacterial cells did not correspond always to the methane concentration in the interstitial water. Based on our results from a Sitka stream we suppose that due to their numbers and potential area for emitting, the contribution of streams and rivers to the contribution to total methane annual emissions would not be negligible.

IV. Occurrence and diversity of methanogenic archaea detected by FISH and DGGE in stream hyporheic sediment

Lenka Brablcová, Iva Buriánková, Pavlína Badurová and Martin Rulík

Submitted to *Environ Microbiol*

The occurrence and diversity of methanogenic archaeal community were analyzed by fluorescence in situ hybridization (FISH) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in hyporheic sediment samples collected from two sediment depths (0-25 cm and 25-50 cm) at five localities along the lowland stream Sitka (Czech Republic). Both methods confirmed the presence of methanogenic archaea at all localities and depths. The proportion of methanogens to the DAPI-stained cells varied among all localities and depths with average value 18.1% (range 4.4 – 31.1%). A total of 19 different bands were observed on the DGGE gel. Cluster analysis of DGGE image showed three main clusters consisting of localities that differed in the amount and similarity of the DGGE bands. Sequencing analysis revealed only two different clones which were affiliated with members of *Methanosarcinales* and *Methanomicrobiales* orders. Our data show that the methanogenic archaea may be important component of hyporheic sediment community and can affect CH₄ cycling in river ecosystem.

V. Mikrobiální biofilmy tekoucích vod

Lenka Brablcová, Iva Buriánková, Martin Rulík

Zborník prednášok a posterov (Mikrobiológia vody 2009): 42-49

Bakteriální společenstva v tekoucích i stojatých sladkých vodách jsou v posledních letech stále častějším předmětem mikrobiálně - ekologických studií na celém světě. Pozornost se však od volné a průlinové vody obrací zejména ke společenstvům biofilmu, tj. takovým, které tvoří povlaky částic sedimentů, kamenů, kořenů a různých jiných předmětů, vyskytujících se ve vodním prostředí. Tato biofilmová kultura se také vyskytuje na površích částic (agregátů), které jsou unášeny vodou a nemají tak statický charakter jako již výše zmíněné typy biofilmu.

Na Univerzitě Palackého v Olomouci se mikrobiální výzkum biofilmových společenstev zaměřuje především na využití fluorescenčních barviv, a to jak pro účely stanovení celkového bakteriálního oživení (DAPI), tak pro zjištění taxonomického složení biofilmových společenstev (barvivo Cy3 při fluorescenční hybridizaci - FISH). Dále na problematiku hydrolytické a respirační aktivity mikrobiálního společenstva. U všech typů biofilmu a filtrátu bylo také sledováno množství chl *a*.

VI. Srovnání mikrobiálního osídlení tří velikostních frakcí říčního sedimentu

Martin Rulík, Pavlína Badurová, Lenka Brablcová, Iva Buriánková, Kristýna Gratzová, Václav Mach & Adam Bednařík

Zborník prednášok a posterov (Mikrobiológia vody 2012): 115-122

Bentické a hyporheické mikrobiální biofilmy jsou významným centrem metabolismu říčního toku, kde dochází k retenci, absorpci, ukládání a transformaci látek a živin. Tyto biofilmy obvykle koncentrují většinu mikrobiálních buněk intersticiálního prostředí a nachází se na povrchu sedimentů. Ve srovnání s relativně homogenními sedimenty stojatých vod (jezer) představují dnové (hyporheické) sedimenty tekoucích vod značně heterogenní prostředí, které může ovlivňovat jak abundanci, tak i metabolickou aktivitu přisedlých bakterií. Abundance a aktivita bakterií tak může být ovlivněna např. velikostní frakcí sedimentu, neboť mnohé studie potvrzují signifikantní negativní korelaci mezi abundancí přisedlých bakterií a velikostí zrn sedimentu.

V předložené studii jsme zjišťovali, zda existují rozdíly mezi třemi velikostními frakcemi sedimentu, odebraného na různých místech v podélném profilu toku Sítka, z hlediska jejich kvalitativních charakteristik a zda se liší celková abundance prokaryotických buněk, abundance vybraných taxonomických skupin (metanogenní archea, metanotrofní bakterie skupin I a II) a indikátory metabolické aktivity a růstu měřené na těchto třech frakcích.

PUBLIKAČNÍ ČINNOST

Publikace

Brabčová L, Rulík M (2007) The comparison of abundance of attached and free-living bacteria in water column of two gravel-sand pit lakes. *Acta Universitatis Carolinae-Environmentalica* (21): 31-34.

Rulík M, Mach V, Cupalová J, **Brabčová L**, Buriánková I, Čáp L (2008) Running waters as an important source of methane emissions to atmosphere: preliminary results from the Sitka stream, Czech Republic. *J Environ Sci Eng* (10): 43-52.

Brabčová L, Buriánková I, Badurová P, Rulík M (2012) The phylogenetic structure of microbial biofilms and free-living bacteria in a small stream, *Folia Microbiol*, DOI 10.1007/s12223-012-0201-y (in press)

Buriánková I, **Brabčová L**, Mach V, Hýblová A, Badurová P, Cupalová J, Čáp L, Rulík M (2012) Methanogens and methanotrophs distribution in the hyporheic sediments of a small lowland stream. *Fundam Appl Limnol* (17): 87-102

Rulík M, Bednařík A, Mach V, **Brabčová L**, Buriánková I, Badurová P, Gratzová K (2012) Methanogenic system of a small lowland stream Sitka, Czech Republic. In: Biomass / Book 2 (MD Matovic et al., ed.), chapter XX (in press).

Buriánková I, **Brabčová L**, Mach V, Dvořák P, Rulík M (2012) Identification of methanogenic archaea involved in a methane stream cycle by targeting methyl-coenzyme M reductase (*mcrA*) gene. *Submitted to PloS One*

Brabčová L, Buriánková I, Badurová P, Rulík M (2012) Occurrence and diversity of methanogenic archaea detected by FISH and DGGE in stream hyporheic sediment. *Submitted to Environ Microbiol* (EMI-2012-1185)

Konference

Brabčová L, Buriánková I, Rulík M (2008) Microbial biofilm: applied methods of ecological laboratory UP. Fresh Blood for Fresh Water, Lunz am See, Austria, 16-18 May 2008 – POSTER

Rulík M, Mach V, **Brabčová L**, Buriánková I, Cupalová J (2009) Linking organic carbon cycling within hyporheic zone of a small lowland river and green house gases emissions (abstract). NABS 57th Annual Meeting, Grand Rapids, Michigan, 17-22 May 2009 - POSTER

Brabčová L, Buriánková I, Lee SH, Kim DH, Cupalová J, Rulík M (2009) Fylogenetická analýza metanogenních archeí a metanotrofních bakterií v hyporheickém sedimentu pomocí klonování a sekvenace genů *mcrA* a 16S rRNA genů (abstrakt). In: Sborník příspěvků (L Kröpfelová, J Šulcová, eds.), pp. 31-32. XV. konference České limnologické společnosti a Slovenskej limnologickej spoločnosti, Třeboň, 22.-26.6. 2009 - POSTER

Mach V, Cupalová J, **Brablcová L**, Buriánková I, Čáp L, Rulík M (2009) Odpovídá metanogenní a metanotrofní aktivita hyporheických sedimentů malého nížinného toku Sítka složení bakteriálního společenstva? (abstrakt). In: Sborník příspěvků (L Kröpfelová, J Šulcová, eds.), pp. 173-174. XV. konference České limnologické společnosti a Slovenskej limnologickej spoločnosti, Třeboň, 22.-26.6. 2009 – POSTER

Brablcová L, Buriánková I, Rulík M (2009) Mikrobiální biofilmy tekoucích vod (abstrakt). In: Zborník prednášok a posterov (M Prokšová, M Seman, eds.), pp. 42-49. Konferencie ČSSM - Mikrobiológia vody 2009, Poprad, 30.9.- 2.10. 2009 - PŘEDNÁŠKA

Buriánková I, **Brablcová L**, Cupalová J, Mach V, Rulík M (2009) Využití moderních molekulárních metod pro detekci metanogenů a metanotrofních bakterií ze sedimentů tekoucích vod (abstrakt). In: Zborník prednášok a posterov (M Prokšová, M Seman, eds.), pp. 120-127. Konferencie ČSSM - Mikrobiológia vody 2009, Poprad, 30.9.- 2.10. 2009 - PŘEDNÁŠKA

Buriánková I, Mach V, **Brablcová L**, Hýblová A, Badurová P, Rulík M (2010) Linking biogeochemistry of methane and molecular detection of methanogens and methanotrophs in rivers sediments. Fresh Blood for Fresh Water, Lunz am See, Austria, 2-4 July 2010 - POSTER

Brablcová L, Buriánková I, Cupalová J, Mach V, Hýblová A, Badurová P, Rulík M (2010) Activity and structure of microbial biofilm in river sediments with focus on methane production (abstract) In: Conference Handbook, pp. 54. Biofilms 4th International Conference, Winchester, UK, 1-3 September 2010 - POSTER

Brablcová L, Buriánková I, Hýblová A, Badurová P, Cupalová J, Mach V, Bednařík A, Rulík M (2010) Struktura a distribuce mikrobiálního společenstva hyporheického biofilmu ve vztahu k procesům metanogeneze a metanotrofie (abstrakt). In: Sborník abstraktů a příspěvků, pp. 3. Symposium Říční dno VII, Šlapanice u Brna, 2.-4.11. 2010 - PŘEDNÁŠKA

Rulík M, **Brablcová L**, Buriánková I, Cupalová J, Mach V, Hýblová A, Badurová P, Bednařík A, Vašková M, Čáp L (2010) Hyporheický biotop a jeho význam pro fungování toku: stav našeho poznání v roce 2010 (abstrakt). In: Sborník abstraktů a příspěvků, pp. 48. Symposium Říční dno VII, Šlapanice u Brna, 2.-4.11. 2010 - PŘEDNÁŠKA

Badurová P, Buriánková I, **Brablcová L**, Bednařík A, Mach V, Rulík M (2011) Detekce a vertikální distribuce metanogenních archeí v říčním sedimentu toku Sítka (abstrakt). In: Sborník referátů (D Baudišová ed.), pp. 3-5. Mikrobiologie vody a prostředí 2011, Tupadly - Kokořínsko, 17.-19.10. 2011 - PŘEDNÁŠKA

Brablcová L, Buriánková I, Badurová P, Rulík M (2011) Stručný přehled metod pro analýzu společenstva metanogenů v hyporheických sedimentech říčního toku (abstrakt). In: Sborník referátů (D Baudišová ed.), pp. 10-12. Mikrobiologie vody a prostředí 2011, Tupadly - Kokořínsko, 17.-19.10. 2011 - PŘEDNÁŠKA

Buriánková I, **Brablcová L**, Rulík M (2011): Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE) a její využití ve výzkumu metanogenních archeí (abstrakt). In: Sborník referátů (D Baudišová ed.), pp. 13-16. Mikrobiologie vody a prostředí 2011, Tupadly - Kokořínsko, 17.-19.10. 2011 - PŘEDNÁŠKA

Brablcová L, Buriánková I., Badurová P, Rulík M (2012) Využití denaturační gradientové gelové elektroforézy (DGGE) k analýze společenstva metanogenů (abstrakt) In: Zborník

príspevkov (Z Čiamporová-Zaťovičová, E Štefková, eds.), pp. 181. XVI. Konferencia České limnologické společnosti a Slovenskej limnologickej spoločnosti, Jasná - Nízke Tatry, 25-29.6. 2012 – POSTER

Buriánková I, **Brablcová L**, Badurová P, Bednařík A, Mach V, Rulík M (2012) Diverzita metanogenních archeí v hyporheickém sedimentu říčky Sítky (abstrakt). In: Zborník príspevkov (Z Čiamporová-Zaťovičová, E Štefková, eds.), pp. 182. XVI. Konferencia České limnologické společnosti a Slovenskej limnologickej spoločnosti, Jasná - Nízke Tatry, 25-29.6. 2012 – POSTER

Rulík M, Badurová P, **Brablcová L**, Buriánková I, Gratzová K, Mach V, Bednařík A (2012) Srovnání mikrobiálního osídlení tří velikostních frakcí říčního sedimentu (abstrakt). In: Zborník príspevkov (M Prokšová, ed.), pp. 115-122. Konference ČSSM - Mikrobiológia vody a životného prostredia, Nový Smokovec - Vysoké Tatry, 12.-14. 9. 2012

Miniskripta

Brablcová L, Buriánková I (2009) Vybrané molekulární metody v mikrobiální ekologii vod - Pracovní texty a protokoly vybraných metod, pp. 43. Za podpory *FRVŠ 2135/2009* - Obohacení výuky studentů v oblasti aplikace vybraných molekulárních metod na pozadí problematiky přírodních biofilmů.

Buriánková I, **Brablcová L** (2010) Technologie klonování genů: princip, aplikace a využití v mikrobiální ekologii vody - Pracovní text a protokoly, pp. 16. Za podpory *FRVŠ 2874/2010* - Obohacení vzdělání studentů v oblasti technologií klonování a sekvenace DNA na pozadí problematiky přírodních biofilmů.

Badurová P, **Brablcová L**, Buriánková I (2011) Metody detekce životaschopnosti a aktivity mikrobiálního společenstva - Pracovní text vybraných metod včetně metodických postupů, pp. 17. Za podpory *FRVŠ 3113/2011*- Inovace předmětů mikrobiální ekologie se zaměřením na metabolickou aktivitu a životaschopnost bakterií v říčním sedimentu.