

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra ekologie a životního prostředí



**Polysacharidy jako měřítko tvorby
biofilmu v intertidálním prostředí
wattových sedimentů**

Kateřina Pančochová

Bakalářská práce

předložená

na Katedře ekologie a životního prostředí

Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

jako součást požadavků

na získání titulu Bc. v oboru

Ekologie a ochrana životního prostředí

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

Olomouc 2016

Prohlášení

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

V Olomouci dne 29. července 2016

podpis

Pančochová, K.: Polysacharidy jako měřítko tvorby biofilmu v intertidálním prostředí wattových sedimentů. Bakalářská práce, Katedra Ekologie a životního prostředí, Přírodovědná fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, 29 s., v češtině

Abstrakt

Cílem této práce bylo porovnat vertikální distribuci biofilmu na třech rozdílných stanovištích, posoudit zda mezi těmito stanovišti existuje rozdíl v průměrném množství polysacharidů a celkového organického uhlíku a zda existuje nějaký trend s jejich množstvím s narůstající hloubkou. Cílem této práce bylo také posoudit, zda koreluje průměrná koncentrace polysacharidů s množstvím celkového organického uhlíku.

Odběr vzorků na intertidálním pobřeží Wattového moře probíhal od ledna do února 2015. Vzorky byly odebírány na bahnitých a písčítých sedimentech, a na sedimentech ústřicových lavic. Zpracování těchto vzorků od ledna do června 2016. Byly sledovány tyto parametry: (i) koncentrace polysacharidů ve vertikálním profilu a mezi stanovišti, (ii) množství organického uhlíku ve vertikálním profilu a mezi stanovišti a (iii) velikost zrn sedimentů ve vertikálním profilu a mezi stanovišti.

Byly prokázány vertikální trendy distribuce polysacharidů, celkového organického uhlíku i velikosti zrn sedimentu. Jako nejvhodnější stanoviště pro růst biofilmu se ukázaly sedimenty ústřicových lavic.

Klíčová slova: růst biofilmu, měkké mělčiny, Fríské ostrovy, vertikální distribuce, polysacharidy

Pančochová, K.: Polysaccharides as a measure of biofilm development in intertidal sediments of the Wadden Sea. Bachelor's thesis, Department of Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, 29 pp., in Czech

Abstract

The aim of this bachelor thesis was to compare vertical distribution on three different habitats, assess if between these habitats exist some difference in the average volume of polysaccharides and total organic carbon, and if exist some trend in their vertical distribution. The aim of this bachelor thesis was to assess if average concentrations of polysaccharides correlates with volume of total organic carbon.

The sampling was conducted in January to February 2015 on the intertidal coast of Wadden sea. The samples were taken from muddy and sandy sediments and from oyster bed. The results were processed in January to June 2016 and were studied these parameters: (i) concentration of polysaccharides (ii) total organic carbon and (iii) grain size. Every of these parameters were studied on vertical distribution and between habitats.

Were proved vertical distribution trends of polysaccharides, total organic carbon and grain size. As best habitat for biofilm's growth were detected oyster beds.

Key words: biofilm growth, soft shores, Frisian Island, vertical distribution, polysaccharides

Obsah

Seznam grafů (obrázků)	viii
Seznam příloh.....	x
Poděkování	xi
1. Úvod.....	1
2. Cíle práce.....	3
3. Teoretická část.....	4
3.1 Intertidální wattová pobřeží.....	4
3.2 Význam mikroorganismů	5
3.3 Biofilm	6
3.3.1 Význam biofilmu	6
3.3.2 Vznik a vývoj biofilmu	7
3.3.3 Složení biofilmu	8
3.4 Polysacharidy.....	8
3.5 Uhlík.....	9
4. Lokalita a metody.....	12
4.1 Sylt	12
4.2 Odběr vzorků.....	13
4.3 Stanovení obsahu neutrálních sacharidů podle Duboise (1956)	13
4.4 Stanovení obsahu uhlíku dle Horákové et al. 1989	14
4.5 Stanovení sušiny.....	14
5. Výsledky.....	16
5.1 Koncentrace polysacharidů ve vertikálním profilu	16
5.2 Koncentrace polysacharidů mezi jednotlivými sedimenty.....	17
5.3 Množství celkového organického uhlíku	18
5.4 Granulometrické měření ve vertikálním profilu.....	20
5.5 Vztahy mezi parametry	22
6. Diskuze.....	24
6.1 Koncentrace polysacharidů	24
6.2 Množství celkového organického uhlíku	26
6.3 Granulometrické měření.....	26
6.4 Vztahy mezi parametry	27
7. Souhrn	29

8. Literatura	31
8. Přílohy	34

Seznam grafů (obrázků)

Obrázek 1. Poloha ostrovu Sylt.....	12
Graf 1. Průměrná koncentrace polysacharidů ve vertikální distribuci u vzorků bahnitých sedimentů (M), chybová úsečka značí SD.....	16
Graf 2. Průměrná koncentrace polysacharidů ve vertikální distribuci u vzorků písčitých sedimentů (S), chybová úsečka značí SD.....	17
Graf 3. Průměrná koncentrace polysacharidů ve vertikální distribuci u vzorků sedimentů ústřicových lavic (U), chybová úsečka značí SD.....	17
Graf 4. : Průměrná koncentrace polysacharidů na jednotlivých sedimentech, chybová úsečka značí SD.....	18
Graf 5. Průměrné množství celkového organického uhlíku na bahnitých sedimentech (M) ve vertikálním profilu, chybová úsečka značí SD	19
Graf 6. Průměrné množství celkového organického uhlíku na písčitých sedimentech (S) ve vertikálním profilu, chybová úsečka značí SD.....	19
Graf 7. Průměrné množství celkového organického uhlíku na sedimentech ústřicových (U) ve vertikálním profilu, chybová úsečka značí SD.....	20
Graf 8. Průměrná velikost zrn ve vzorcích sedimentů M ve vertikálním profilu, chybová úsečka značí SD.....	21
Graf 9. Průměrná velikost zrn ve vzorcích sedimentů S ve vertikálním profilu, chybová úsečka značí SD.....	22

Graf 10. Průměrná velikost zrn ve vzorcích sedimentů U ve vertikálním profilu, chybová úsečka značí SD.....	22
Graf 11. Korelace mezi průměrnou koncentrací polysacharidů a průměrným celkovým množstvím organického uhlíku.....	23
Graf 12. Korelace mezi průměrnou koncentrací polysacharidů a průměrným velikostí zrn sedimentů.....	23

Seznam příloh

Příloha 1. Odběr vzorků na ostrově Sylt (foto: Doc. RNDr. Martin Rulík Ph.D., 2015).....	34
Příloha 2. Mělčiny intertidálního pobřeží.....	35
Příloha 3. Vzorky sedimentu M s vertikální distribucí (0-5 cm vlevo až 15-20 cm vpravo).....	35
Příloha 4. Neprůkazné vztahy mezi zkoumanými parametry.....	36

Poděkování

Nejprve bych chtěla poděkovat svému vedoucímu práce doc. RNDr. Martinu Rulíkovi, Ph.D., za poskytnutí literatury, cenné rady a připomínky a také za trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat Bc. Anně Smolíkové za vysvětlení postupu zpracování vzorků a Mgr. Adamu Bednaříkovi za pomoc se zpracováním vzorků. V poslední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za neustálou psychickou podporu.

1. Úvod

Intertidální pobřeží jsou dynamické a proměnlivé systémy, periodicky zaplavovaných území, vlivem gravitační síly Měsíce a Slunce (Kukal, 1984). Wattové moře, které se nachází u pobřeží Nizozemska, Německa a Dánska na Fríských Ostrovech, je jedním z největších intertidálních systémů. Fríské ostrovy patří mezi největší útočiště pro hejna migrujících ptáků v západní Evropě. Takové množství predátorů spotřebuje velké množství potravy, tudíž je důležité, aby zde bylo dostatek živin pro vývoj měkkýšů a jiných bezobratlých, kterými se ptáci živí (Fontana, Catherine, 2015).

Organické zdroje potravy z anorganických látek na pobřeží vznikají díky činnosti mikroorganismů. V intertidálních systémech mají mikrobiální procesy klíčovou roli v remineralizaci živin a primární produkci (Decho 2000). Podle aktuálního množství mikroorganismů můžeme usuzovat na velikost mikrobiální produkce dané lokality. Vzhledem k obtížné kvantifikaci mikroorganismů ve své práci porovnávám množství jejich biofilmů.

Jako biofilm označujeme přisedlé společenstvo mikroorganismů, které je zapuštěno ve slizovitém pouzdře, které bakterie izoluje od okolí a zvyšuje jejich odolnost např. proti působení UV-záření, toxických látek nebo mechanickému poškození. Jelikož biofilmové nárosty nalezneme téměř všude, kde se vyskytují mikroorganismy, pokouší se řady biologů již několik desítek let co nejpřesněji popsat a definovat biofilm (Rulík et al. 2011). Jedna z nejaktuálnějších definic říká, že biofilm je „...přisedlé společenstvo mikroorganismů, charakterizované tím, že buňky, které jsou ireverzibilně

přichycené k podkladu nebo jedna k druhé, jsou zapuštěné v matrici extracelulárních polymerních látek, těmito buňkami produkovaných, které dále vykazují odlišný fenotyp s ohledem na rychlost růstu a transkripci genů...“ (Donlan & Costerton 2002).

Právě vlastnosti extracelulární polymerní matrice (dále jen EPM) vychází z kombinace vnitřních a vnějších faktorů. EPM se skládá především z vody a z látek anorganických a organických. Významnou roli ve struktuře mají (exo)polysacharidy, které i přesto že jejich celkové zastoupení v matrici je jen 1-2%, poskytují biofilmu kostru (Rulík et al. 2011). Matrice je důležitá pro biostabilizační procesy a také pro tok uhlíku v sedimentech. Může se chovat jako důležitý nositel uhlíku v jeho koloběhu nebo jak zdroj uhlíku pro mikroorganismy (Duyf et al., 1999).

Já se ve své práci zabývám stanovením obsahu polysacharidů z odebraných vzorků různých sedimentů, z čehož získám alespoň hrubou představu o množství mikroorganismů v něm obsažených. Porovnávám vertikální distribuci biofilmů ve vzorcích z různých sedimentů a též různé biotopy mezi sebou. Z výsledných hodnot se pokouším odhadnout množství mikrobiální produkce těchto oblastí.

Pro lepší pochopení naměřených hodnot porovnávám výsledky z analýzy množství polysacharidů s výsledky měření celkového organického uhlíku (TOC) a granulometrické analýzy sedimentů.

2. Cíle práce

Cílem mé práce je zjistit vertikální distribuci biofilmu na třech rozdílných stanovištích. Dále posoudit zda mezi těmito stanovišti existuje rozdíl v průměrném množství polysacharidů a zda existuje nějaký trend v množství polysacharidů s rostoucí hloubkou. V rámci organického uhlíku zjišťuji, zda existuje rozdíl v jeho obsahu mezi stanovišti a jestli existuje nějaký trend v jeho množství s rostoucí hloubkou, stejně jako u polysacharidů. Pokouším se zjistit, jestli množství polysacharidů koreluje s obsahem organického uhlíku. Nakonec se pokouším zjistit, jestli granulometrické složení půd koreluje s množstvím polysacharidů nebo jestli koreluje s obsahem organického uhlíku.

3. Teoretická část

3.1 Intertidální wattová pobřeží

Intertidální pobřeží jsou specifickými mořskými systémy, které jsou silně ovlivňované přílivem a odlivem. Příliv a odliv; neboli slapové jevy, způsobují periodický pokles a výzdvih mořské hladiny ve světových oceánech a jsou výsledkem působení gravitačních sil Slunce a Měsíce. Pro tato pobřeží je typický skočný příliv a odliv, při kterém rozdíl vodní hladiny činí běžně pět a více metrů. Jsou klíčovým rozhraním mezi oceány, terestrickými ekosystémy a atmosférou. Jako takové jsou pro ně charakteristické časté výkyvy teploty, iontové koncentrace, vysoušení, UV-záření a aktivity vln. Relativní četnost těchto výkyvů představuje jak fyzikální tak biochemické problémy pro mikroorganismy, které obývají tento ekosystém (Decho 2000).

Slovo Watt bychom do češtiny mohli přeložit jako bahnisko nebo mokřad, tudíž území prosycené vodou. Nejedná se ale o sladkovodní útvar nýbrž o mořský. Toto slovo pochází z němčiny a je odvozeno od místa vzniku těchto biotopů.

Wattové moře; neboli Waddenzee, jsou zhruba 500 km dlouhé a v průměru 20 km široké mělčiny, které se rozkládají podél pobřeží mezi Nizozemskem, Německem a Dánskem. Tato převážně písčité pobřeží vznikla z velké části až během 10. a 14. století, kdy docházelo k odnosu sedimentů z původního rašeliniště (Fontana, Catherine, 2015). Rozsáhlé mělčiny jsou rozděleny hlubokými brázdami a ostrovy, které jsou pozůstatkem pobřežních dun (whc.unesco.org). Dno mělčin je tvořeno sedimentovými

částicemi velmi různé velikosti. Jejich rozměry kolísají mezi velikostí hrubého písku, přes menší velmi jemná zrnka až nejjemnějším púdním a bahenním částecám. V mělčinách můžeme podle podílu velikosti jednotlivých zrn rozlišit několik typů dna: písčitou mělčinu, tvořenou převážně jemným pískem, bahnité písčiny, které tvoří nejjemnější částecy zeminy, a smíšené mělčiny. Čím jsou částice v bahnitém dně jemnější, tím větší je jejich schopnost vázat organický materiál. V písčité mělčině jsou organické látky zastoupeny přibližně jedním procentem, zatímco v bahnité nejméně pěti procenty. Písčité dna se vyskytují dále od pobřeží, zatímco u pobřeží převládají bahnitá dna. Tuto oblast mělčin charakterizuje velká plocha mokrých, lesknoucích se písčných desek a bahnitých lavic (Reuchholf et al. 1999). Přílivové plošiny jsou typické zrnitostní inverzí. Blíže k pevnině sedimentují jíly a naopak dále od pevniny převážně písky. Mezi nimi je oblast střídání jílu, písku a prachů (Kukal, 1986).

Většina rozlohy Wattového moře je vyhlášena ramsarským mokřadem, přičemž německá a nizozemská část je od července 2009 světovým přírodním dědictvím UNESCO. Tato oblast je typická bohatou flórou a faunou. Nejvýrazněji zde pozorujeme velká hejna ptáků, kteří tady odpočívají při migraci nebo přezimují. Potravu zde ročně hledá až 6 miliónů jedinců, převážně z řádu brodivých a vrubozobých, přičemž spotřebují velké množství ryb, měkkýšů a jiných bezobratlých. Produkce biomasy je zde jedna z nejvyšších na světě (whc.unesco.org).

3.2 Význam mikroorganismů

V přírodě hlavní funkcí bakterií, a mikroorganismů obecně, je mineralizace látek organických na anorganické za uvolnění tepla. Podmiňují tak život rostlin a ty dále

existenci živočišných druhů. Ve vodním prostředí je významné jejich postavení v potravním řetězci, v tzv. mikrobiální smyčce, kdy potravní řetězec nezačíná fotosyntetizujícími producenty, ale právě bakteriemi, které jsou schopny využít rozpuštěné nízkomolekulární organické látky a zabudovat je do svých těl. Začátek potravního řetězce pobřežních ekosystémů dělíme na dvě části. V první bakterie využívají nerozpuštěný organický uhlík (POC) a rozpuštěný (DOC). Těmito bakteriemi se pak živí prvoci nebo meiofauna. V případě potřeby mohou také využívat přímo POC. V druhé části řetězec začíná právě zmíněnou mikrobiální smyčkou (Little, 2000).

Mořské bakterie mají klíčovou roli v koloběhu dusíku a fosforu, při oxidaci organických látek, ovlivňují zásadně režim železa a manganu v oceánech a jsou odpovědné i za změny chemismu mořské vody a sedimentů (Kukal 1984). Bakterie a *archea*, stejně jako rozsivky, vytváří biofilmové nárůsty. V intertidálních usazeninách mohou biofilmy přispívat k fixaci části sedimentu, zvyšovat depozici jeho částic a tím i ovlivňovat jeho stabilitu. Navíc také jsou důležitým místem přeměny energie a látek (Rulík et al., 2011).

3.3 Biofilm

Mnoho biochemických a geochemických procesů, které jsou zprostředkovány mikroorganismy, se odehrávají v matrici extracelulárních polymerních sekrecí (EPS), které jsou součástí mikrobiálního biofilmu (Decho, 2000).

3.3.1 Význam biofilmu

Tvorba biofilmu je známa jako běžná adaptace mikroorganismů v přírodních systémech (Decho, 2000). Jak jsem již zmiňovala v úvodu, biofilm má pro

mikroorganismy několik důležitých významů, které napomáhají především jejich růstu, replikaci a přežití.

V intertidálních systémech mají biofilmy vliv také na soudržnost sedimentů. Na jejich povrchu zde dochází k časté resuspenzi odlivem a přílivem. Toto mísení zabraňuje vrstvení mikroorganismů v rámci nejvyšší vrstvy sedimentů. Slizovitá matrice biofilmů obklopuje částice sedimentů a stabilizuje vrstvy sedimentů proti resuspenzi (Decho, 2000).

3.3.2 Vznik a vývoj biofilmu

Biofilm vzniká z látek produkovaných mikroorganismy, které jsou v něm zanořeny. Vznik biofilmu je možno popsat v několika krocích:

Transport a adsorpce organických molekul na povrchu nosiče.

Transport mikrobiálních buněk k povrchu nosiče. Rozhodujícími faktory transportu jsou molekulární a turbulentní difuze, termoforéza, chemotaxe a sedimentace. Na povrchu zůstanou a dále rostou pouze buňky irreverzibilně přichycené, zatímco reverzibilně přichycené buňky se odtrhávají.

Zachycení mikroorganismů na povrchu je řízeno fyzikálními silami, chemickými vazbami a interakcemi mezi bakteriálními receptory. Dále probíhá replikace již přisedlých buněk a produkce extracelulární matrice a dalších metabolitů.

Další vývoj biofilmu je výrazně ovlivňován podmínkami okolního prostředí a vlastnostmi povrchu nosiče. Drsný povrch je pro růst biofilmu lepší stejně jako živinami bohaté okolí. Dochází k odumírání některých buněk a k replikaci dalších částí biofilmu. Poslední částí vývoje biofilmu je odtrhávání a disperze buněk zpět do vody (Rulík et al., 2011).

3.3.3 Složení biofilmu

Biofilm se skládá z přisedlých mikroorganismů, které jej vytváří, a především z EPM. Matrice je z 97% tvořena vodou, různými proteiny, polysacharidy (extracelulární polysacharidy- dále jen EPS), lipidy a nukleovými kyselinami (DNA, RNA) (Pierre et al., 2011). Tyto makromolekuly se zde nachází ve větším množství, ale mimo ně se zde v menší míře nachází i peptidoglykany, lipidy a fosfolipidy (Rulík et al., 2011). Polymery se nachází ve formě kapsulí, pouzder volně ve slizu a jako DOC (rozpuštěný organický uhlík) v roztoku (Decho, 2000). Nalezneme zde také absorbované živiny a metabolity, produkty buněčné lýze, partikulovaný materiál a detrit z okolí (Rulík et al., 2011).

3.4 Polysacharidy

Polysacharidy jsou nejpočetnější makromolekuly v biosféře. Tyto komplexní sacharidy jsou často jedním z hlavních konstrukčních prvků rostlin (celulóza) a živočichů (chitin) nebo slouží jako uložisko energie (Ferreira et al., 2016).

Polysacharidy jsou složeny ze stovek až tisíců stejných, nebo různých, monosacharidů vzájemně vázaných glykosidovými vazbami (Murry, 2004).

Jako monosacharidy označujeme polyalkoholy s 1 aldehydickou (ketonickou) skupinou. Existují v řadě izomerních forem, jako je např. fruktosa a glukosa. Stereoizomery, které jsou si navzájem svými zrcadlovými obrazy, dělíme na D a L formy, přičemž v přírodě se nejčastěji vyskytují D formy.

Polysacharidy můžeme dělit na homo- a heteropolysacharidy. Homopolysacharidy sestávají z identických monomerů (glukoza, glukany, manosa...) a heteropolysacharidy obsahují různé sacharidové jednotky (Benda et al., 2006).

V biofilmech rozlišujeme také exopolysacharidy specifické, které jsou typické pro individuální bakteriální kmeny, a polysacharidy nspecifické, které jsou nacházeny u více bakteriálních kmenů.

Nspecifické jsou strukturálně odlišné a jednodušší než specifické polysacharidy. Většina z nich jsou homopolysacharidy. Specifické polysacharidy, se zjevně pravidelným strukturálním vzorcem, se běžně v EPM vyskytuje v různých variacích vlastností.

EPS z celého obsahu matrice zaujímají pouze 1-2%. I přes malou koncentraci v biofilmu, jsou hlavní strukturální složkou, jelikož vytváří kostru (framework). Poskytují tedy skelet, do kterého jsou mikrobiální buňky a jejich bioaktivní produkty zapuštěny (Rulík et al., 2011). Přítomnost exopolysacharidů v EPM může poskytnout ochranu molekulárnímu mikroprostředí pro bakteriální extracelulární enzymy (Decho, 2000).

3.5 Uhlík

Zásoby uhlíku se liší v různých subsystémech. V atmosféře je uhlík obsažen v oxidu uhličitém, v litosféře v horninách a v hydrosféře např. v kyselině uhličitě. Ve všech těchto případech jsou prvky v anorganické formě, zatímco živé organismy a mrtvá a rozkládající se těla můžeme považovat za část cyklu, které obsahují uhlík v organické formě (např. celulóza). Globální cyklus uhlíku je především plynný, přičemž hlavním prostředníkem jeho

toku mezi atmosférou, hydrosférou, litosférou a organismy je oxid uhličitý (Townsend et al., 2008).

Do hydrologického cyklu se uhlík tedy dostává především jako CO₂ z atmosféry, ale i biologickými procesy ve vodní mase. S vodou reaguje na slabou kyselinu uhličitou a s vápníkem se spojuje na uhličitán vápenatý. Vodní rostliny rozpuštěné uhličitany odstraňují fotosyntézou, zatím co při dýchání jím vodu obohacují, stejně jako živočichové a mikroorganismy. Značnou měrou do koloběhu oxidu uhličitého přispívá i člověk. Spalováním fosilních paliv se do ovzduší uvolňuje velké množství CO₂ (od průmyslové revoluce z hodnoty cca 280ppm na dnešní průměrnou globální hodnotu 360ppm) (Kukal, 1984; <http://portal.chmi.cz>). Část produkovaného CO₂ proniká do svrchních vodních vrstev. Pokud by se koncentrace stále zvyšovala, může postupně docházet k okyselení vody a rozpouštění schránek vápnatého planktonu (Kukal, 1984).

Většina mikroorganismů získává energii pro své životní pochody přeměnami oxidačního stupně uhlíku (např. fixace CO₂ řasami na sacharidy) (Kalač et al., 2010).

Ve vodě přítomný anorganický uhlík je asimilován hlavně fytoplanktonem. Uhlík jejich těl se recykluje především v povrchové vrstvě oceánu díky mikrozooplanktonu, který jejich těla konzumuje. Dále díky uvolňování organických exudátů a jejich mineralizací bakteriemi. Sedimentující těla, zejména pak schránky větších druhů fytoplanktonu a makrozooplanktonu, odnáší část uhlíku do hlubin. Část těchto organických látek je spotřebována hlubokomořskými živočichy, část je bakteriemi mineralizována na anorganickou formu a znova se dostává do oběhu, a část je pohřbena do sedimentů (Townsend et al., 2008).

Extracelulární enzymy mikroorganismů, které jsou vylučované buňkami a nejsou v přímém kontaktu

s buněčnými membránami, slouží k hydrolýze organického materiálu s velkou molekulovou hmotností na menší oligometrické a monometrické složky. Ty mohou být přímo převzaty buňkami. Tento proces je důležitý v efektivitě velko-měřítkové transformace organického materiálu bakteriemi a v přeměně rozpuštěného organického uhlíku (DOC) na nerozpuštěný organický uhlík (NDOC) (Decho 2000).

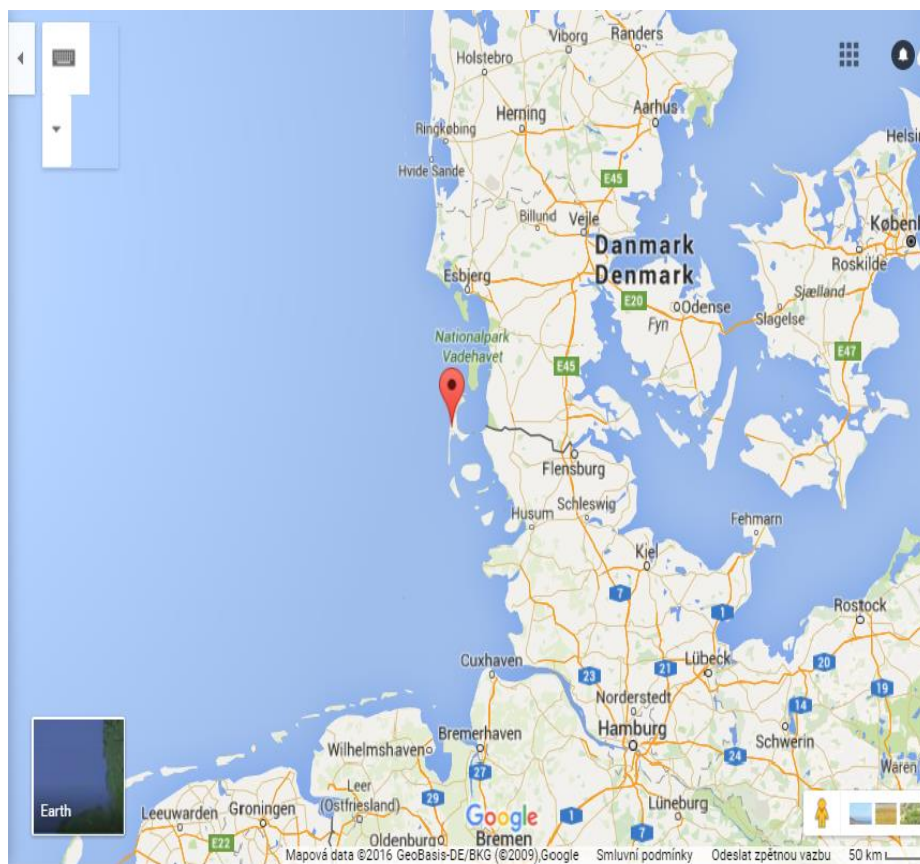
Uhlík se navíc do vod dostává jako hydrogenuhlíčan ze zvětrávání na vápník bohatých hornin, jako je vápenec a křída (Townsend et al., 2008).

4. Lokalita a metody

4.1 Sylt

Německý ostrov Sylt, na kterém byly vzorky odebírány, je jedním ze Severofríských ostrovů, které vytváří západní hranici Šlesvicko-Holštýnské spolkové země. Ostrov se nachází v Severním moři a východní pořeží je od pevniny odděleno Wattovým mořem. Ostrov Sylt dlouhodobě slouží především k rekreaci (www.sylt.de).

Je součástí Národního parku Wattenmeer, který se v roce 2009 stal i světovou památkou UNESCO. Oblast národního parku je také vyhlášena ptačí oblastí dle Natury 2000, biosférickou rezervací a Ramsarským mokřadem (www.nationalpark-wattenmeer.de).



Obr. 1. Poloha ostrovu Sylt (zdroj: www.google.com)

4.2 Odběr vzorků

Odběr vzorků probíhal v průběhu ledna-února 2015 během odlivových period dopoledne. Všechny vzorky byly odebrány v zálivu Königshaffen, v blízkosti AWI Wadden Sea Station u města List. Vzorky sedimentů byly odebírány na 3 rozdílných typech sedimentů, a to bahnitých (vzorky označené M- z angl. mud), písčitých (S z angl. sand) a sedimentech ústřicových lavic (označené U). Vzorky z hloubky 0-20 cm byly odebírány pomocí odběrové sondy-trubice z plexiskla. Následně bylo jádro vzorku děleno na 4 hloubkové profily (0-5 cm, 5-10 cm, 10-15 cm a 15-20 cm). Na každém substrátu bylo odebráno celkem 6 sond (0-20 cm). Z toho 3 sondy byly použity pro analýzu organického uhlíku a granulometrie a 3 sondy pro analýzu polysacharidů. Z každé hloubky byly vzorky odebrány ve 3 opakováních. Výjimku tvoří vzorky z ústřicových lavic, kde nebylo možné z důvodu nepropustnosti substrátu odebrat nejhlubší vrstvu (15 - 20 cm)

4.3 Stanovení obsahu neutrálních sacharidů podle Duboise (1956)

Tato metoda je založena na dehydrataci cukrů koncentrovanou kyselinou sírovou a následné kondenzaci vzniklého furfuralu či 5-hydroxymethylfurfuralu s fenolem za vzniku barevných kondenzačních produktů, které lze spektrofotometricky stanovit.

Neutrálními sacharidy se rozumí „pravé“ cukry, tedy ne např. jejich aminoderiváty.

Ze zásobního roztoku D-glukosy byly připraveny kalibrační roztoky o koncentracích 0-100 $\mu\text{g/ml}$. Ze sáčků

se vzorky bylo odebráno do skleněných zkumavek 0,1 g vzorku. Do zkumavek s 1ml kalibračních roztoků a do zkumavek se vzorky byly přidány 1 ml 5% roztoku fenolu a 5 ml koncentrované H₂SO₄. Vzniklá směs byla ihned protřepána a nechala se odstát 30 minut při laboratorní teplotě. Na spektrofotometru, značky Cecil CE 9 500 od firmy Labimex, byla po uplynutí této doby změřena absorbance všech vzorků při vlnové délce 490 nm. V programu MS Excel 2016 byla sestrojena kalibrační křivka. Zjištěné hodnoty byly přepočítány na µg/g. Korelace byly sestrojeny v programu NCSS 9.

4.4 Stanovení obsahu uhlíku dle Horákové et al. 1989

Obsah organické hmoty ve vzorcích mořských sedimentů byl stanoven metodou ztráty žiháním, tzv. LOI (Lost of ignition).

Pracovní postup:

Na vysušené keramické misky, které byly předem zváženy, byl přidán vzorek sedimentu. Tyto misky byly v sušárně při teplotě 100 °C sušeny 24 hodin. Po uplynutí této doby a vychladnutí v exsikátoru byla vzniklá sušina zvážena. Dále byly žihány v laboratorní peci při teplotě 550 °C po dobu 3 hodin. Po vychladnutí v exsikátoru byly opět zváženy.

Vyhodnocení výsledků:

Zjištěné hodnoty byly pomocí koeficientu 0,45 přepočteny na celkový organický uhlík. Hodnoty organického uhlíku byly vyjádřeny jako procentuální podíl.

4.5 Stanovení sušiny

Pracovní postup:

Do suchých keramických misek, které byly předem zváženy, byl přidán vzorek sedimentu. Tyto misky byly

ponechány 24 hodin v sušárně při teplotě 100 °C. Vzniklá sušina byla po vychladnutí v exsikátoru zvážena.

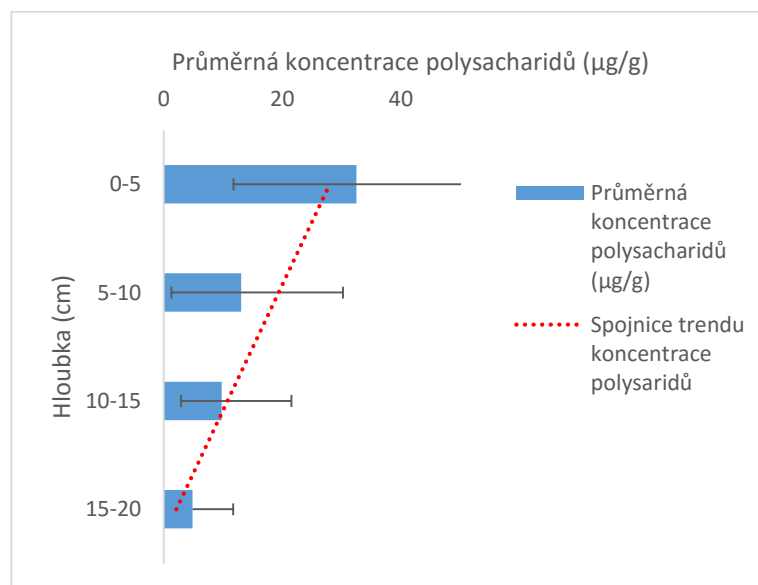
5. Výsledky

Jako první jsem sestavovala kalibrační křivku D-glukosy, podle které jsem následně vyhodnocovala obsah neutrálních polysacharidů jednotlivých vzorků. Na základě kalibrační křivky jsem prováděla měření jednotlivých vzorků.

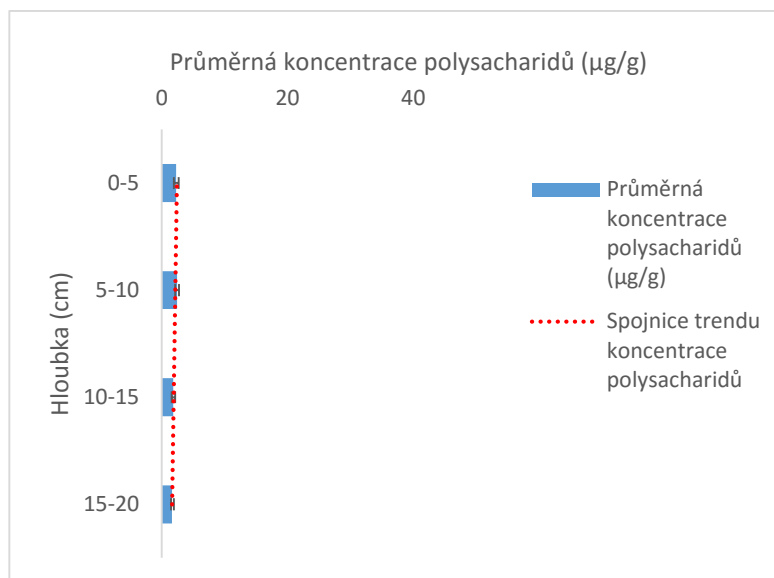
5.1 Koncentrace polysacharidů ve vertikálním profilu

Hodnoty koncentrace polysacharidů se ve vertikální distribuci snižovaly s rostoucí hloubkou, což bylo prokazatelně viditelné na grafech průměrné hodnoty koncentrace polysacharidů u sedimentů M a S (graf 1,2).

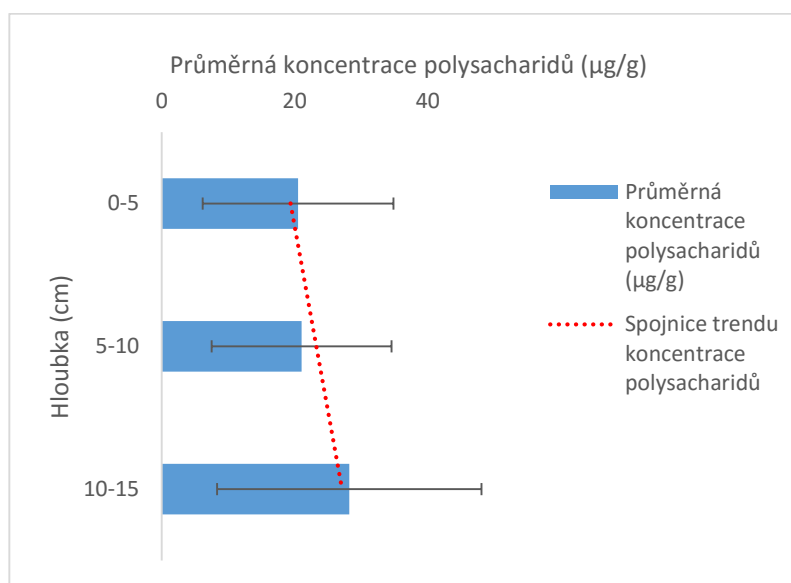
U vzorků sedimentů U byl prokázán mírný nárůst koncentrace polysacharidů do hloubky (graf 3).



Graf 1. : Průměrná koncentrace polysacharidů ve vertikální distribuci u vzorků bahnitých sedimentů (M), chybová úsečka značí SD



Graf 2. : Průměrná koncentrace polysacharidů ve vertikální distribuci u vzorků písčitéch sedimentů (S), chybová úsečka značí SD



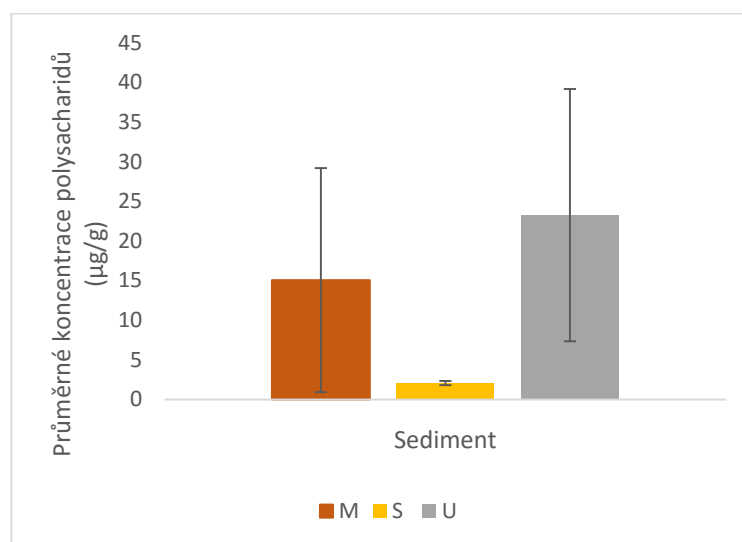
Graf 3. : Průměrná koncentrace polysacharidů ve vertikální distribuci u vzorků sedimentů ústřicových lavic (U), chybová úsečka značí SD

5.2 Koncentrace polysacharidů mezi jednotlivými sedimenty

Jak již bylo patrné na předešlých grafech průměrných koncentrací ve vertikálním profilu (viz výše), byly v jednotlivých sedimentech zjištěny rozdílné koncentrace polysacharidů.

Hodnoty koncentrace polysacharidů kolísaly od 0,72 $\mu\text{g/g}$ do 66,09 $\mu\text{g/g}$. Nejvyšší průměrná koncentrace polysacharidů byla naměřena u vzorků sedimentů U a to 23,25 $\mu\text{g/g}$. O něco nižší pak u vzorků sedimentů M 15,06 $\mu\text{g/g}$. Nejnižší hodnoty průměrné koncentrace polysacharidů byly zjištěny u vzorků sedimentů S 2,06 $\mu\text{g/g}$.

Do tohoto výpočtu nebyly zahrnuty hodnoty koncentrace polysacharidů v hloubce 15-20 cm u vzorků sedimentu U, kvůli chybějícím datům.



Graf 4. : Průměrná koncentrace polysacharidů na jednotlivých sedimentech, chybová úsečka značí SD

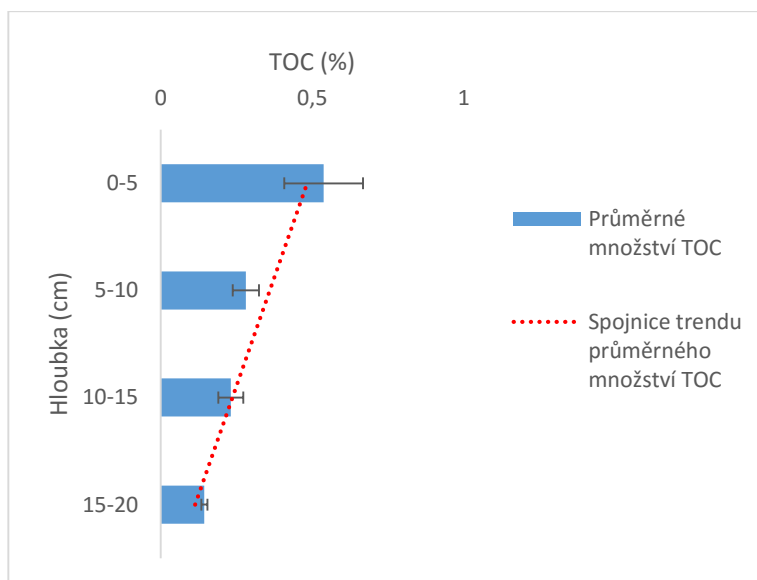
5.3 Množství celkového organického uhlíku

Vertikální distribuce TOC vykazuje podobný trend jako vertikální distribuce koncentrace polysacharidů. U vzorků sedimentů M a S, se jeho procentuální zastoupení v biofilmu snižuje, zatímco u vzorků sedimentů U je tento trend opačný.

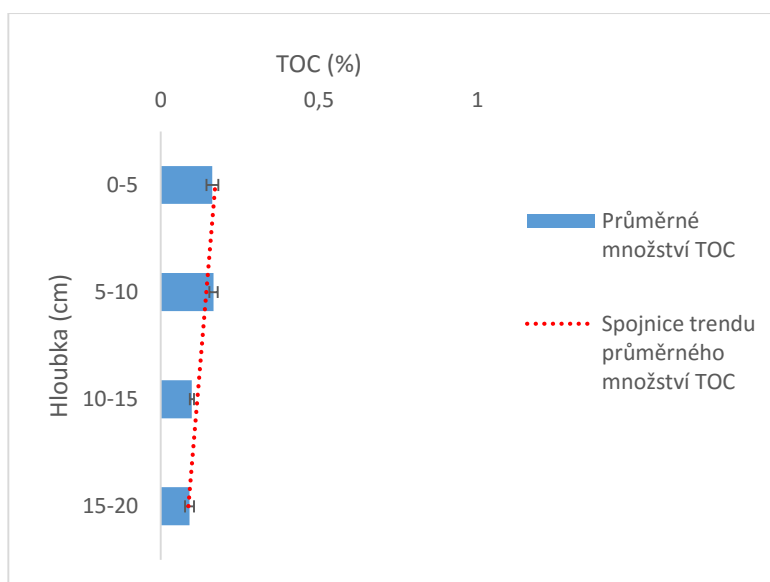
Množství celkového organického uhlíku kolísalo od 0,07 % do 0,98 %. Nejvyšší průměrné zastoupení celkového organického uhlíku bylo naměřeno ve vzorcích

sedimentu U a to 0,37 %. Méně pak na vzorcích sedimentu M 0,30 % a opět nejméně na vzorcích S 0,13 %.

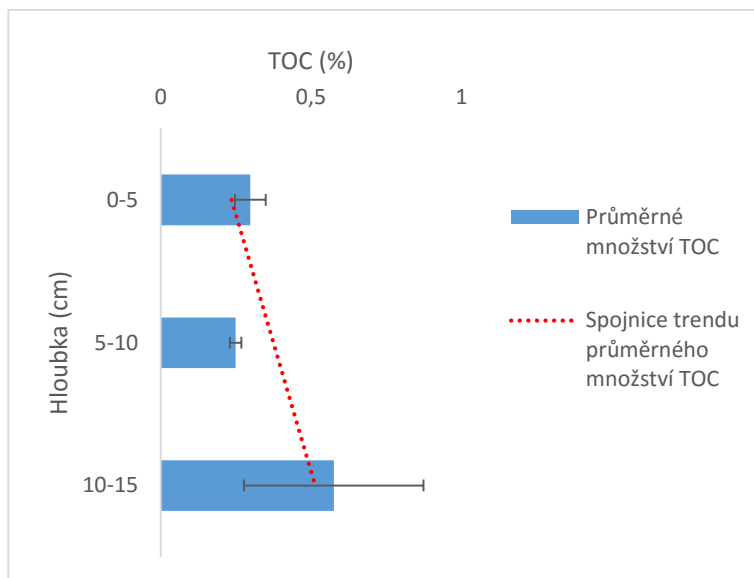
Do tohoto výpočtu nebyly zahrnuty hodnoty koncentrace polysacharidů v hloubce 15-20 cm u vzorků sedimentu U, kvůli chybějícím datům.



Graf 5. : Průměrné množství celkového organického uhlíku na bahnitých sedimentech (M) ve vertikálním profilu, chybová úsečka značí SD



Graf 6. : Průměrné množství celkového organického uhlíku na písčitéch sedimentech (S) ve vertikálním profilu, chybová úsečka značí SD



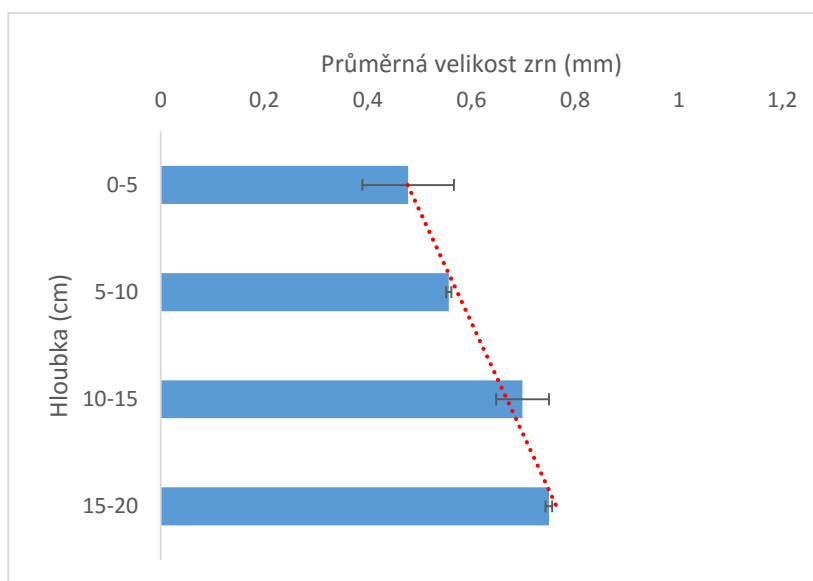
Graf 7. : Průměrné množství organického uhlíku na sedimentech ústřicových lavic (U) ve vertikálním profilu, chybová úsečka značí SD

5.4 Granulometrické měření ve vertikálním profilu

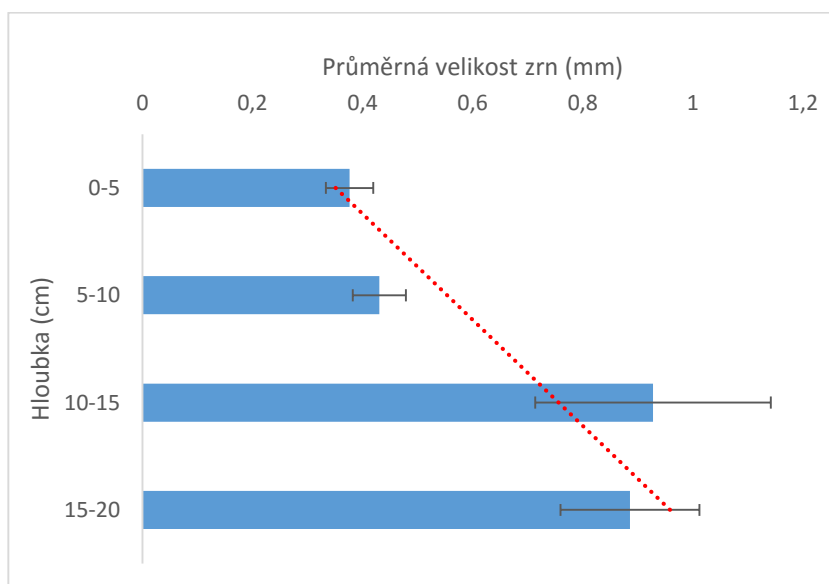
Z granulometrického měření byl zjištěn opačný trend ve vertikálním profilu, než u předchozích měření. U sedimentů M a S se velikost zrn sedimentů s rostoucí hloubkou zvyšuje, zatímco u vzorků sedimentů U je tento trend opačný.

Vzorky byly měřeny ve velikostech od 2 mm po 0,063 mm. Nejčetněji se ve vzorcích sedimentů vyskytovaly částice ve velikosti 0,25 mm. Ve vzorcích sedimentů M se vyskytovaly částice ve velikostech 2 - 0,25 mm (včetně) s procentuálním zastoupením 95 %. Ve vzorcích sedimentů S, s procentuálním zastoupením 97 %. Ve vzorcích sedimentů U, v procentuálním zastoupení 65%.

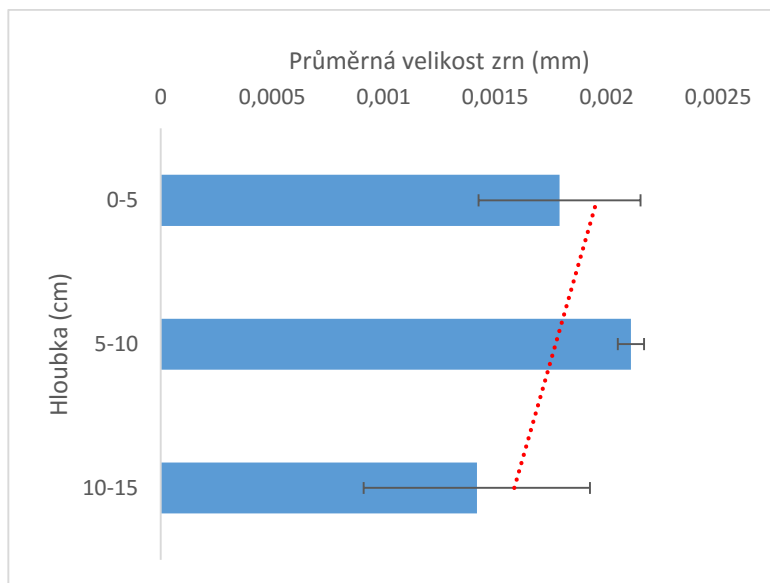
Průměrné hodnoty velikosti zrn se pohybovaly od 0,001 po 1,01 mm. Největší průměrná velikost zrn byla zjištěna v sedimentech M a to 0,62 mm, nižší průměrná velikost na sedimentech S 0,61 mm. V sedimentech U byla zjištěna průměrná velikost zrn 0,001 mm.



Graf 8. : Průměrná velikost zrn ve vzorcích sedimentů M ve vertikálním profilu, chybová úsečka značí SD



Graf 9. : Průměrná velikost zrn ve vzorcích sedimentů S ve vertikálním profilu, chybová úsečka značí SD



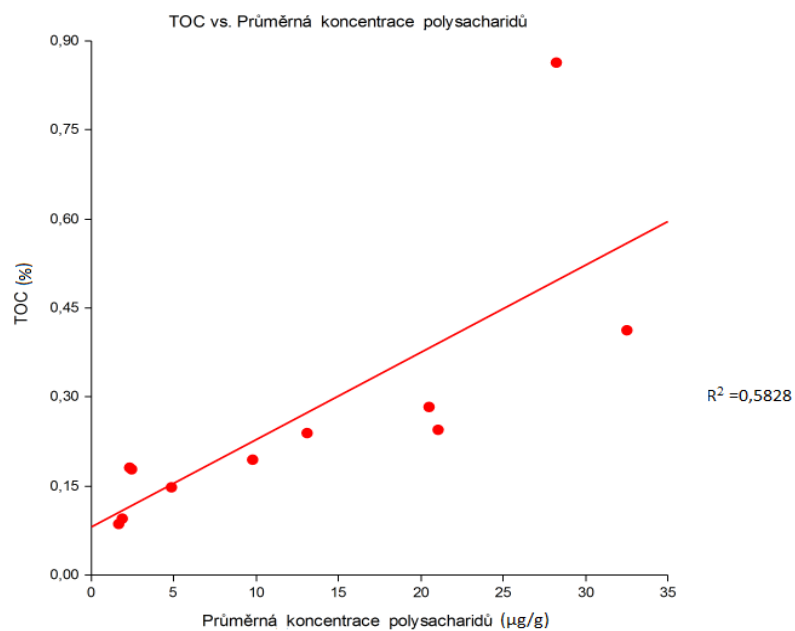
Graf 10. : Průměrná velikost zrn ve vzorcích sedimentů U ve vertikálním profilu, chybová úsečka značí SD

5.5 Vztahy mezi parametry

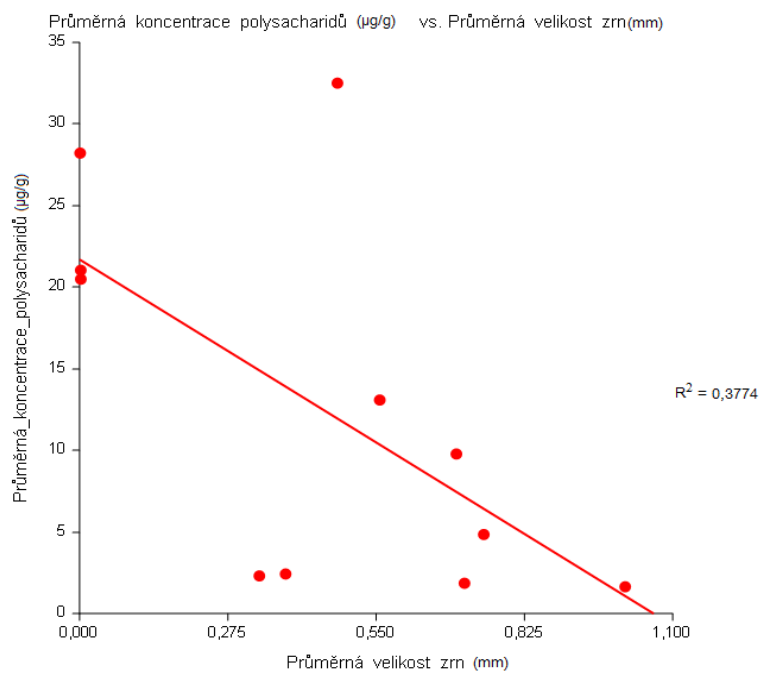
Při zkoumání vztahů mezi průměrným celkovým množstvím organického uhlíku a průměrnou koncentrací polysacharidů byla signifikantně prokázána pozitivní korelace ($p < 0,05$) (graf 11).

Mezi průměrnou koncentrací polysacharidů a průměrnou velikostí zrn sedimentů byla signifikantně prokázána negativní korelace ($p < 0,05$) (graf 12).

Mezi průměrným celkovým množstvím organického uhlíku a průměrnou velikostí zrn sedimentů nebyl prokázán signifikantní vztah (viz příloha 2).



Graf 11. : Korelace mezi průměrnou koncentrací polysacharidů a průměrným celkovým množstvím organického uhlíku



Graf 12. : Korelace mezi průměrnou koncentrací polysacharidů a průměrnou velikostí zrn sedimentů

6. Diskuze

Cílem této práce bylo zjistit vertikální distribuci biofilmů na třech rozdílných stanovištích s písčítými a bahnitými sedimenty a se sedimenty ústřicových lavic. Dalším cílem bylo posoudit, zda mezi těmito stanovišti existuje rozdíl v průměrném množství polysacharidů a zda existuje nějaký trend v jeho množství s rostoucí hloubkou. Signifikantně byla prokázána největší průměrná koncentrace polysacharidů u sedimentů U a to 23,25 $\mu\text{g/g}$. Lineární trend ve vertikálním profilu, kdy se koncentrace polysacharidů snižuje s rostoucí hloubkou, byl prokázán v sedimentech S a M. V sedimentech U byl prokázán lineární trend opačný. Dalším cílem bylo provést tytéž posudky i u organického uhlíku. Signifikantně i zde bylo prokázáno největší množství průměrného celkového organického uhlíku u sedimentů U a to 0,37 %. Byl prokázán i tentýž lineární trend ve vertikálním profilu jako u průměrné koncentrace polysacharidů. Při porovnání parametrů mezi sebou byla zjištěna pozitivní korelace mezi průměrnou koncentrací polysacharidů a průměrným množstvím celkového organického uhlíku. Při porovnání těchto parametrů s daty z granulometrického šetření byla zjištěna negativní korelace mezi průměrnou koncentrací polysacharidů a velikostí zrn sedimentu.

6.1 Koncentrace polysacharidů

Koncentrace polysacharidů v biofilmu s jeho růstem úzce souvisí (Rulík et al., 2011). Dle zastoupení polysacharidů ve vzorcích sedimentů, můžu dále usuzovat velikost biofilmu a mikrobiální produkce stanoviště.

Podle získaných výsledků se koncentrace polysacharidů v bahnitých a písčitých sedimentech

s narůstající hloubkou snižovala. Podobný trend zaznamenali ve své práci i Gerbersdorf et al. (2008). Gerbersdorf et al. měřili koncentraci polysacharidů jen od 0,5 do 10 mm hloubky. Pokud bych předpokládala následný stejný lineární vývoj trendu i s dalším nárůstem hloubky, blíží se jejich hodnoty koncentrace polysacharidů mým. Jejich hodnoty koncentrace polysacharidů jsou však oproti mým naměřeným hodnotám o desítky až stovky $\mu\text{g/g}$ vyšší. Domnívám se, že hlavním důvodem proč se mé hodnoty lišily, je chladné období, kdy probíhal odběr mých vzorků. Dalším důvodem by mohl být odlišný typ sedimentu nebo přítomnost predátorů (Sabater et al., 2002). Možná je i kombinace všech uvedených faktorů.

Opačný trend koncentrace polysacharidů ve vertikálním profilu byl prokázán v sedimentu ústřicových lavic. Zde se domnívám, že opačný trend byl způsoben (mimo jiné) složením sedimentu. Mrtvé lastury a jejich výkaly se po dlouhou dobu akumulují a vmíchávají do sedimentu a přitom vytváří tvrdé dno ústřicových lavic. Drsné dno lavic působí na proudy vody a dochází k jejímu promíchávání, což změní vzor proudění. Tím získávají důležitou roli v biogeochemickém cyklu. Hustá populace ústřic vylučuje obrovské množství suspendovaných částic a rozpuštěného organického materiálu ve vodním sloupci. Vylučují metabolity a re-mineralizují živiny do forem využitelných fytoplanktonem (Carleton Ray et McCormic Ray, 2014). Díky sedimentaci těchto organických látek a díky pevnosti sedimentu se zde může vyvíjet větší množství biofilmu než v bahnitých a písčítých sedimentech.

Tím se dostávám k průměrné koncentraci polysacharidů mezi jednotlivými stanovišti. Ústřicové lavice vytváří "hot spoty" funkční biodiversity (Carleton Ray et McCormic Ray, 2014), což svědčí o vyšší mikrobiální produkci. Tomu také odpovídají naměřené

hodnoty vyšší průměrné koncentrace polysacharidů v sedimentech ústřicových lavic než v bahnitých a písčítých sedimentech.

Domnívám se, že vyšší hodnoty průměrné koncentrace polysacharidů v bahnitých sedimentech oproti písčítým sedimentům, jsou způsobeny vyšším množstvím jemnozrnných částic (viz níže).

6.2 Množství celkového organického uhlíku

Množství celkového organického uhlíku vykazovalo ve vertikální distribuci stejné trendy jako vertikální distribuce koncentrace polysacharidů. Na jednotlivých stanovištích, stejně jako u koncentrace polysacharidů, výsledky celkového organického uhlíku byly nejvyšší u sedimentů ústřicových lavic. Tato skutečnost také naznačuje vyšší mikrobiální produkci.

Celkový organický uhlík, ale na sladkovodním toku, ve své práci zkoumala také Brablková L. (2013). Její hodnoty byly v průměru o 0,3 % až 0,5 % vyšší, což může být zapříčiněno odběrem vzorků v jiném ročním období. I přes pozitivní korelaci celkového organického uhlíku a koncentraci polysacharidů, mi není známa práce s měřením celkového organického uhlíku v mořských sedimentech.

6.3 Granulometrické měření

Z výsledků granulometrického měření vyplývají ve vertikální distribuci trendy opačné, než u předchozích parametrů. Velikost zrn sedimentů je úzce spojena s velikostí biofilmů. Čím jemnější jsou částice na dně mělčin, tím větší je jejich schopnost vázat organický materiál (Reichholf et al., 1990), stejně jako větší množství

mikroorganismů (Meyer et al., 1987). Jak vyplývá z mých výsledných hodnot velikosti zrn sedimentu, nejmenší částice se nacházeli ve vzorcích sedimentů ústřicových lavic. Průměrná velikost zrna se do hloubky snižovala, což značí akumulaci jemnozrnných částic do hlubších vrstev sedimentů na rozdíl od sedimentů bahnitých a písčitých. Tento fakt může být u sedimentů ústřicových lavic jedním z důvodů vyšší koncentrace polysacharidů.

Z výsledných hodnot také vyplývá signifikantní rozdíl ve velikostech zrn v bahnitých a písčitých sedimentech. Částice bahnitého sedimentu zřídka kdy přesahovaly velikost 0,5 mm, což může být vysvětlením vyšší koncentrace polysacharidů než v sedimentech písčitých, kde se ve větším procentuálním zastoupení objevovaly částice větší.

Sediment ústřicových lavic tedy prokazatelně vyplývá jako nejvhodnější pro růst biofilmů.

6.4 Vztahy mezi parametry

Je obecně známo, že produktivita biofilmu koreluje s množstvím organického uhlíku (Rulík et al. 2011). I na mnou naměřených hodnotách byla signifikantně prokázána pozitivní korelace mezi průměrnou koncentrací polysacharidů a množstvím celkového organického uhlíku ve vzorcích sedimentů. Pozitivní korelaci pozorujeme, když při vzrůstajících hodnotách jedné proměnné, vzrůstají i hodnoty proměnné druhé, k čemuž u naměřených hodnot docházelo.

Signifikantně prokázána byla také negativní korelace mezi průměrnou koncentrací polysacharidů a průměrnou velikostí zrn ve vzorcích sedimentů. Negativní korelaci pozorujeme, když při vzrůstajících hodnotách jedné

proměnné, hodnoty druhé proměnné klesají, k čemuž u naměřených hodnot docházelo.

Jelikož polysacharidy představují jednu složku z extracelulární polymerní matrice biofilmu, značí jejich zvýšená koncentrace vyšší množství organické hmoty biofilmu.

Mezi množstvím celkového organického uhlíku a velikostí zrn ve vzorcích sedimentů nebyla signifikantně korelace prokázána.

7. Souhrn

Biofilmové nárůsty a mikroorganismy jej tvořící, představují v mořských ekosystémech důležitou součást sedimentů a potravního řetězce. Tato práce se věnovala distribuci biofilmů na jednotlivých stanovištích intertidálního pobřeží Wattového moře. Cílem této práce bylo posoudit, zda mezi těmito stanovišti existuje rozdíl v průměrném množství polysacharidů a organického uhlíku. U těchto parametrů také zjistit zda existuje nějaký trend s narůstající hloubkou. A nakonec zda tyto parametry a granulometrické složení sedimentů mají nějaký vztah.

Na každém druhu sedimentu bylo odebráno celkem 6 sond a jejich obsah se poté rozdělil na 4 hloubkové profily 0-20 cm do plastových sáčků. Z těchto sáčků, poté bylo odebráno 0,1 g vzorku ve třech opakováních. U každého tohoto vzorku zvlášť bylo provedeno vyhodnocení zkoumaných parametrů. Dle mých výsledků vykazovala koncentrace polysacharidů i množství celkového organického uhlíku, stejný trend ve vertikálním profilu sedimentů. Přičemž u bahnitých a písčitých sedimentů byl tento trend opačný od sedimentů ústřicových lavic. Ústřicové lavice se ukázaly jako nejvhodnější sediment pro růst biofilmů, o čemž svědčí jak nejvyšší průměrná koncentrace polysacharidů mezi sedimenty, tak nejvyšší množství celkového organického uhlíku. Mezi těmito parametry byla zjištěna pozitivní korelace.

Granulometrické složení ve vertikálním profilu vykazovalo opačné trendy než předchozí parametry. Nejjemnější částice, a tudíž nejvhodnější substrát pro růst většího biofilmu, byly zjištěny na sedimentech ústřicových lavic, čímž se můžou vysvětlovat vyšší hodnoty předchozích parametrů. Mezi velikostí zrn sedimentů a

koncentrací polysacharidů byla zjištěna negativní korelace, mezi velikostí zrn sedimentů a celkovým organickým uhlíkem však korelace signifikantní nebyla.

Ústřicové lavice se tedy ukázaly jako nejvhodnější sediment pro růst biofilmů.

8. Literatura

Alan W. Decho: Microbial biofilms in intertidal systems an overview. *Continental Shelf Research* 20 (2000), str. 1257-1273

Ana R. V. Ferreira, Vítor D. Alves, Isabel M. Coelho: Polysaccharide-Based Membranes in Food Packaging, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa, Caparica 2016, str. 4

Brablcová L.: Mikrobiální biofilmy tekoucích vod a jejich význam pro metanogenezi, Universita Palackého v Olomouci, 2013, str. 116-118

Colin R. Townsend, Michael Begon, John L. Harper: *Essentials of ecology*, Blackwell Publishing Limited 2008, str. 374-383

Fleur C. van Duyl, Ben de Winder, Arjen J. Kop, Ute Wollenzien: Tidal coupling between carbohydrate concentrations and bacterial activities in diatom-inhabited intertidal mudflats, *Marine Ecology Progress Series* 191 (1999), str. 19- 32

Fontana, Catherine G.: Wadden Sea. Salem Press *Encyclopedia of Science*, January, 2015, str. 3

G. Carleton Ray and Jerry McCormick-Ray: *Marine Conservation: Science, Policy, and Management*, Wiley Blackwell, Chichester, UK 2014

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

John Mc Murry: Organická chemie, Brooks/ Cole a Thompson Learning Company 2004, str. 969

M. Rulík, V. Holá, F. Růžička, M. Votava: Mikrobiální biofilmy, Univerzita Palackého v Olomouci 2011, str. 11-29, 323

Meyer J. L., Edwards R. T., Risley R. (1987): Bacterial growth on dissolved organic carbon from a blackwater river. *Microb. Ecol.*, 13: 13–29.

Pavel Kalač, Jan Tříška, Ladislav Kolář, Eva Jírovcová: Chemie životního prostředí, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích 2010, str. 109

Reichholf J., Janke K., Kremer B. : Ekologie mořských životních prostředí Evropy, Ikar Praha, 1990, str. 44-45

Sabater S., Guasch H., Romaní A. M., Muñoz I. (2002): The effect of biological factors on the efficiency of river biofilms in improving water quality. *Hydrobiologia*, 469: 149–156.

Vladimír Benda, Ivan Babůrek, Pavel Kotrba: Základy Biologie, VŠCHT Praha 2006, str. 238- 251

Zdeněk Kukul: Oceán pevnina budoucnosti, Horizont Praha 1984, str. 253, 192-211

Zdeněk Kukul: Základy sedimentologie, Academia 1986,
str. 281-286

Internetové zdroje:

<http://portal.chmi.cz>

www.sylt.de

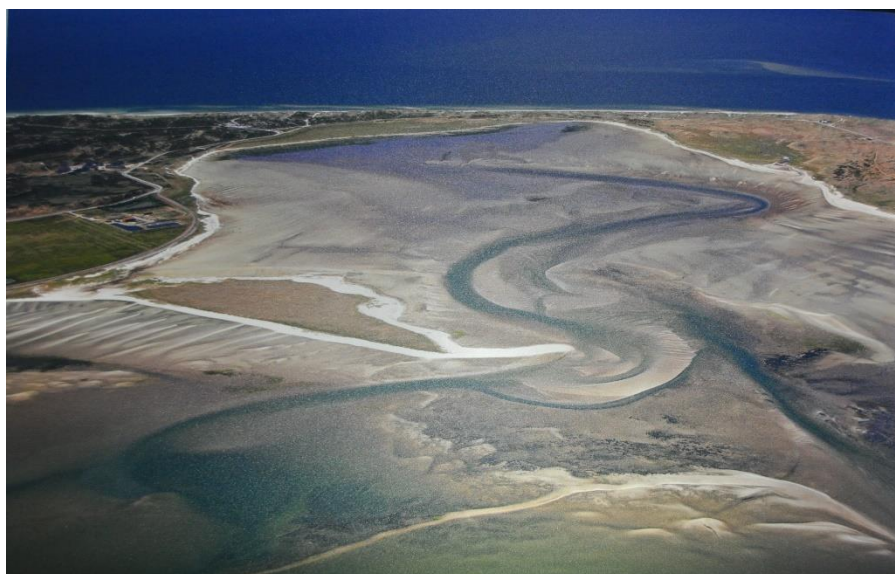
www.nationalpark-wattenmeer.de

8. Přílohy

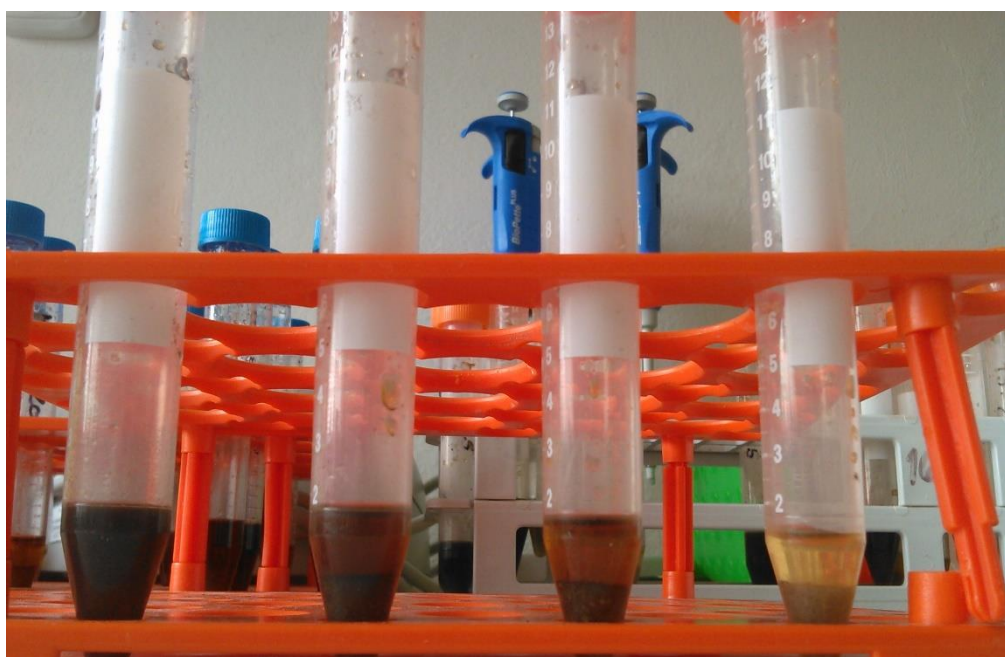
Příloha 1. Odběr vzorků na ostrově Sylt (foto: Doc. RNDr. Martin Rulík Ph.D., 2015)



Příloha 2. Mělčiny intertidálního pobřeží



Příloha 3. Vzorčky sedimentu M s vertikální distribucí (0-5 cm vlevo až 15-20 cm vpravo)



Příloha 4. Neprůkazné vztahy mezi zkoumanými parametry

