Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky

Symbiotické bakterie sladkovodní mechovky *Pectinatella magnifica*

Bakalářská práce

Autor práce: Martin Kadlec
Vedoucí práce: prof. Ing. Eva Vlková, Ph.D.

© 2015 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci " Symbiotické bakterie sladkovodní mechovky *Pectinatella magnifica* " jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne _____

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval prof. Ing. Evě Vlkové, Ph.D. za podporu, výjimečnou trpělivost a za poskytnutí cenných rad a materiálů při psaní bakalářské práce. Též bych rád poděkoval pracovníkům KMVD za vytvoření příjemného pracovního prostředí při experimentální části bakalářské práce.

Souhrn

Nedílnou součást vodního společenství po celém světě tvoří mikroskopičtí koloniální živočichové z kmenu Mechovky (*Bryozoa)*, kam se řadí i bochnatka americká (*Pectnitalla magnifica).* Kmen *Bryozoa* se v současné době dělí do tří tříd, *Pectinatella magnifica* tvořící přisedlé kolonie houbovitého vzhledu spadá do nejméně početné třídy sladkovodních mechovek *Phylactolamneata*. *Pectinatella magnifica* se stále častěji objevuje na území České republiky, jedná se o invazivní druh mechovky pocházející ze Severní Ameriky. Na rozdíl od mořských mechovek, u kterých již byla publikována řada studií zabývajících se mikrobiologickými aspekty těchto živočichů, jsou sladkovodní mechovky nejméně prozkoumané. Prozatím neexistují studie zabývající se výzkumem symbiotických bakterií bochnatky americké. Cílem této práce bylo kultivační stanovení symbiotických bakterií organismu *Pectinatella magnifica*, jejich morfologická kontrola a příprava izolátů pro následnou podrobnou identifikaci. Za tímto účelem byly asepticky odebrány vzorky bochnatky americké ze čtyř lokalit v jižních Čechách, které byly následně v laboratoři zpracovány pro kultivační stanovení bakterií. Zvlášť byla odebírána povrchová vrstva obsahující zooidy a zvlášť gelová hmota nacházející se uvnitř kolonií mechovky. Bakterie byly stanovovány kultivačně za anaerobních a aerobních podmínek. Po stanovení počtů bakterií následovala jejich morfologická kontrola za využití fázové kontrastní mikroskopie a následně bylo vybráno několik charakteristických vzorků pro přípravu na podrobnou identifikaci pomocí sekvenace 16S rDNA a hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Kultivační stanovení bakterií odhalilo fakt, že více bakterií se nachází v povrchové vrstvě kolonií mechovky než ve vnitřní gelové hmotě, morfologická kontrola odhalila častější výskyt tyčinkovitých bakterií, z nichž téměř polovina byla pohyblivá.

Klíčová slova: *Pectinatella magnifica*, symbiotické bakterie, stanovení počtů bakterií, morfologická kontrola

Summary

Pectinatella magnifica is included in the phylum *Bryozoa,* which is represented by microscopic colonial animals, forming an integral part of water environment all over the world. The phylum *Bryozoa* is currently divided into three classes, *Pectinatella magnifica* forming sessile colonies of fungal appearance is included in the class of freshwater bryozoans called *Phylactolamneata.* Currently there is growing frequency of the occurrence of *Pectinatella magnifica* in Czech Republic, therefore it is considered to be an invasive animal with its origin in North America. In the difference of sea-water bryozoans, which have been in the center of interest of many microbiological studies, the study of microbiological aspects of fresh water bryozoans was until now left out. In the presence there are no studies dedicated to investigation of symbiotic bacteria of the organism *Pectinatella magnifica*. The object of this work was the enumeration of bacteria associated with *Pectinatella magnifica*, the morphological analysis of the bacteria isolated and the preparation of the bacterial samples for further identification. To this purpose samples of *Pectinatella magnifica* were recovered from 4 locations in South Bohemia. Superficial parts of colonies contained zooids were collected separately from the inner gelled mass. Symbiotic bacteria were enumerated after cultivation in aerobic and anaerobic conditions. Enumeration of bacteria was followed by morphological analysis using the phase contrast microscopy. Results of microscopy labor were used for the selection of characteristic samples that has been processed for the detailed identification by sequencing of 16S rDNA and mass spectrometry MALDI-TOF. The enumeration of bacteria revealed that more bacteria are found in the superficial layer of colonies then inner gelled mass, the results of morphological analysis discovered major occurrence of rod shaped bacteria and the fact that almost half of this rod shaped bacteria were motile.

Key words: *Pectinatella magnifica*, symbiotic bacteria, enumeration, morphological analysis

Obsah

1. **Úvod** 7
2. **Literární rešerše** 8
   - 2.1. *Bryozoa* 8
     - 2.1.1. *Phylactolaemata* 9
       - 2.1.1.1. *Pectinatella magnifica* 11
   - 2.2. Symbiotické organismy *Bryozoa* 13
   - 2.3. Bakteriální rody často izolované z mechovek 16
     - 2.3.1. Rod *Vibrio* 16
     - *2.3.2.* rod *Alteromonas* 17
     - 2.3.3. rod *Shewanella* 18
     - 2.3.4. rod *Sphingomonas* 18
   - 2.4. Kultivační média 18
3. **Hypotéza** 21
4. **Cíl práce** 22
5. **Materiál a metody** 23
   - 5.1. Sběr vzorků 23
   - 5.2. Ředící řady 23
   - 5.3. Vlastní mikrobiologický rozbor 23
     - 5.3.1. Kultivační stanovení bakterií 23
     - 5.3.2. Izolace bakterií a morfologická kontrola 24
   - 5.4. Příprava izolátů pro identifikaci bakterií 24
6. **Výsledky** 26
   - 6.1. Stanovení počtu bakterií 26
   - 6.2. Morfologická kontrola 27
7. **Diskuse** 29
8. **Závěr** 32
9. **Seznam použité literatury** 33
10. **Přílohy** 36

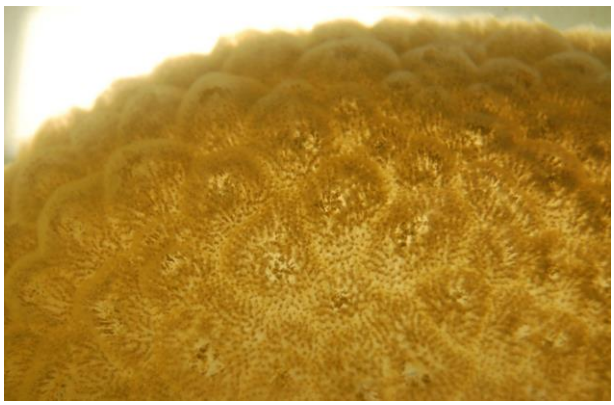
1. Úvod

Nedílnou součást vodního prostředí po celém světě tvoří živočichové z kmene *Bryozoa*. Jedná se o mikroskopické živočichy tvořící kolonie. Vzhledem k nedostatečným informacím o této skupině živočichů zatím nebyly jasně určeny vývojové vztahy s ostatními živočichy. Krom morfologických poznatků se při zařazování této skupiny ve fylogenetickém stromu v současné době klade i důraz na analýzu DNA, která by mohla objasnit příbuznost s dalšími skupinami živočichů. Výskyt těchto koloniálních živočichů je velice hojný, přičemž většina jich je vázána na mořskou vodu, avšak existují i druhy sladkovodní či druhy vyskytující se ve vodě brakické. Kolonie jsou popisovány jako útvary houbovitého vzhledu, jež rostou přisedlé na pevném podkladu nebo jsou volně plovoucí ve vodním prostředí. Kolonie jsou tvořeny jednotlivými živočichy, kteří narostli pučením z jediného vajíčka či statoblastu a mají zachovanou schopnost samostatné obživy. Jednotlivci připomínají vnějším vzhledem žahavce, jsou velcí přibližně 0,5 cm a obvykle se nazývají zooidi. Zooidi se skládají z vnějšího obalu cystidu, který obklopuje polypid. Při zkoumaní těchto živočichů v rámci ČR je i pro jejich stále častější výskyt zkoumán vliv na ekologii vodního prostředí a z toho důvodu je vhodné analyzovat mikroorganismy v nich obsažené. Všeobecně více prozkoumaní jsou mořští mechovci, pro ekologii vodních společenství ČR je však ze zjevného důvodu zásadní výzkum mechovek sladkovodních, mezi které řadíme například *Plumatella fungosa, P. repens, P. lucifuga, P. hyalina, Hyialinella vitrea, Lophopus trembleyi, Cristatella ophidioidea, Paludicella ehrenbergi* a v poslední době také *Pectinatella magnifica*, jejíž symbiotické mikroorganismy jsou středem zájmu této práce. Jedná se o invazivní druh sladkovodní mechovky, který pochází ze Severní Ameriky.

2. Literární rešerše

2.1 Bryozoa

Pectinatella magnifica je jeden z mnoha organismů spadajících do kmene *Bryozoa*, který se řadí do pododdělení *Protostomia.* Příslušníkům této skupiny nezanikají prvoústa. Kmen *Bryozoa* sestává z 6000 dosud popsaných druhů celého světa, které obývají jak mořské biotopy, tak sladkovodní prostředí. Většina druhů mechovek se nachází v mělkých vodách, avšak existují i zástupci žijící v hloubce až 1 km. Název kmene *Bryozoa* (bryon = řecky mech, zoa = latinsky živočich) vychází z keříčkovitého typu růstu kolonií některých druhů živočichů této skupiny. Další označení kmene je téže *Ectoproctra*, které vychází z polohy řitního otvoru, který se nachází vně před věncem chapadel blízko ústního otvoru. Kolonie se skládá ze zooidů. Tělo zooida tvoří v hlavové části lofofor, který obklopuje ústní otvor. Pod lofoforem lze nalézt vyustění řitního otvoru, v této oblasti se také nachází cerebrální ganglion. Na ústní otvor navazuje jícen a laterálně od jícnu se nachází střevo. Přechod hlavové část v metacoel (tělní dutinu) obklopuje svalový prstenec. Na jícen navazuje žaludek, na jeho kaudálním konci je připojen funiculus. Tělo zoodia je uloženo v cystidu, který tak vytváří výše zmíněný metacoel. Stěna cystidu sestává z exocystu a endocystu. Mechovky pomocí chapadel loví plankton, který následně zpracovávají v žaludku a trávenina je v podobě výživové tekutiny roznášena po těle. Mechovky jsou hermafrodité, rozmnožují se však i nepohlavně pomocí pučení. K zachování organizmu v době nepříznivých podmínek vnějšího prostředí slouží útvary zvané statoblasty, obsahující zárodek nového organizmu.



Obr. 1: Zooidi *P. magnifica* tvořící bochánky na povrchu kolonie (fotografii pořídil pracovní kolektiv KMVD)

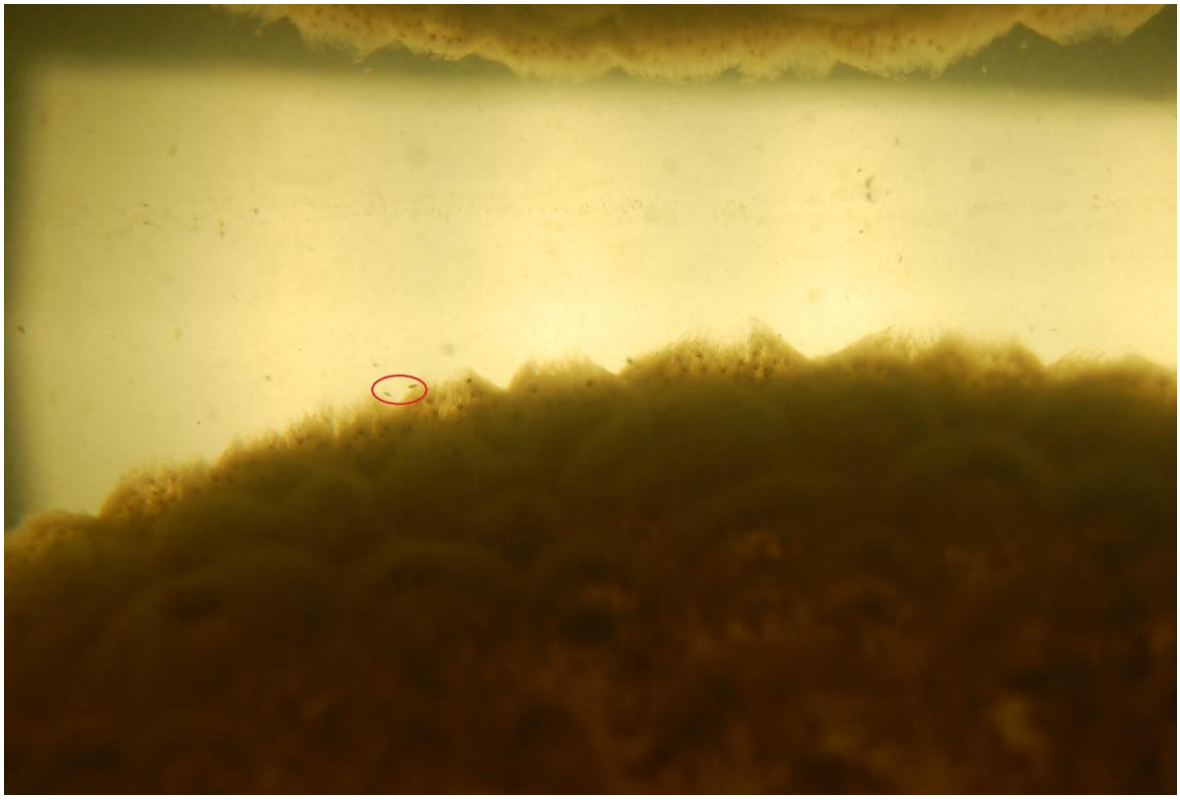
Bryozoa je jeden z nejzáhadnějších kmenů, co se týče evolučních vztahů v rámci živočišné říše a fylogenetického postavení kmene mezi živočichy. V současné době se kmen dělí do tří tříd: *Phylactolaemata*, třída která zahrnuje 80 druhů (Massard and Gaimer, 2008); třída *Stenolaemata* zahrnující 700 druhů; a třída *Gymnolaemata* obsahující přibližně 5000 druhů. Za účelem zjištění příbuznosti mechovek s dalšími organismy byla například zkoumána skeletální organizace buněk. Ultrastruktura vápenitého skeletu mechovek vykazuje podobnosti se skeletální strukturou ramenonožců (Travener-Smith, 1973). Jedním důvodem nejasných vývojových vztahů mechovek s ostatními živočichy je bezesporu i fakt, že zatím bylo odebráno málo vzorků tohoto taxonu pro analýzu DNA. Na molekulární fylogenetiku mechovek se zaměřil Judith Fuchs a kolektiv spolupracujících kolegů ve své práci "První komplexní fylogeneze Bryozoí založená na kombinované analýze nukleových a mitochondriálních genů (2009)". V této práci bylo analyzováno 32 druhů z 23 rodů mechovek pomocí molekulárních technik. Výsledky jejich práce jsou zobrazeny v příloze 2. Vzhledem k masovému šíření některých druhů mechovek je v zájmu výzkumu i způsob jejich šíření. Čtyřicet procent druhů třídy *Gymnolaemata* a *Phylactolaemata* jsou endemité, jedná se především o druhy obývající rovníkové oblasti. Úspěšné šíření a kolonizace nových prostředí je spojováno se schopností tvořit statoblasty a reprodukčním potenciálem. Také se odvíjí od návaznosti období vrcholné produkce statoblastů s migrací ptáků (často konzumují statoblasty spolu s potravou, mohou je přenášet také na svém těle) a neposledně také se schopností adaptace (Bushnell, 1973).

2.1.1 třída Phylactolaemata

Pectinatella magnifica se řadí do třídy *Phylactolaemata*, což jsou sladkovodní mechovky s chitinovými nebo gelovitými tělními stěnami (cystidy), tělní schránka se skládá ze tří částí (protocoel v ústní části, mesocoel tvořící lofoforus a metacoel tvořící trup). Dále mají Phylactolaemata svalovou vrstvu v tělní stěně, která tvoří výběžek polypidu, jsou to bilaterálně symetričtí živočichové s lofoforem tvaru koňské podkovy a vyznačují se absencí polymorfismu v jejich koloniích (neskládají se z tvarově a funkčně diferenciovaných jedinců). Od ostatních tříd mechovek lze *Phylactolamneata* odlišit dle polohy a směru pučení nových jedinců. U této třídy pučení probíhá ve směru orálním. V porovnání s třídou *Gymnolamneata*, u které probíhá pučení ve směru

análním, lze pak odvodit rozdílný vývoj v uspořádání kolonií uvedených tříd (Jebram, 1973). U třídy *Phylactolamneata* se tvoří dormantní stádia, zvaná statoblasty. Statoblasty tvoří jediné známé fosilní pozůstatky této skupiny z dřívějších dob a poprvé se objevují ve svrchním triasu (Kohring and Hörnig, 2001).

Obr. 2 a 3: Statoblasty *P. magnifica* (fotografii pořídil pracovní kolektiv KMVD)



Obr. 4: Uvolňování statoblastů *P. magnifica* (fotografii pořídil pracovní kolektiv KMVD)

2.1.1.1 Pectinatella magnifica

Druh *Pectinatella magnifica* popsal americký vědec Joseph Leidy roku 1851 a zdokumentoval tento druh v knize s názvem “Fresh-water polyzoa of Pensylvania”, původně byl tento druh nazván *Cristatella magnifica*. Výskyt této mechovky se váže na čisté stojaté či tekoucí vody o dostatečné teplotě (nevyskytuje se ve vodách horských a podhorních, kde je průměrně nízká teplota vody, která jim nesvědčí). Kolonie se váží na pevný substrát, rostou na stoncích a listech vodních rostlin, kořenech a při nedostatku jiného substrátu je lze nalézt i na plochých kamenech. *Pectinatella* vytváří oválné kolonie, popřípadě může vytvářet kolonie páskovité charakteru. Funkce jedinců v kolonii není nijak specializovaná, každý jedinec má schopnost plnit životní funkce samostatně. Na povrchu kolonie se nachází samotné organismy, vnitřní část kolonie je tvořena gelovou hmotou, kterou tyto organizmy produkují.

Obr. 5: Čirá gelová hmota uvnitř rozřízlé kolonie *P. magnifica* rostoucí na větvičce (fotografii pořídil pracovní kolektiv KMVD)

Každý jedinec v kolonii je tvořen dvěma základníma částmi, polypidem a cystidem a zaujímá v kolonii větší či menší prostor označovaný jako zoecium. Cystid je uzavřený váček, který vytváří vnější obal pro polypid. Uvnitř cystidu se nachází

trávicí trubice s chapadélky, nervová, svalová a pohlavní soustava, vyživující tekutina a funikulus. V cystidu se též vyvíjí pohlavní zárodky a letní i zimní pupeny. Stěny cystidu jsou tvořeny z několikavrstevného pletiva, které zahrnuje i vrstvu svalovou, jež slouží k roztahování a stahování zoecia. Na povrchu zoecia se nachází pokožka, tvořící vnější část cystidu, ektocyst. Vnitřní část tělní stěny (cystidu) vytváří endocyst. Ektocyst mívá rozdílné složení u různých druhů, je-li tvořen chitinem, má průsvitný charakter, méně často pak bývá zcela průhledný při absenci chitinu. Endocyst se odlučuje od ektocystu na předním konci zoecia a tvoří s ním stálou duplikaturu, která je udržována napříč uloženými pochvovými svaly. Endocyst tvoří vnitřní část stěny cystidu a vychlípitelnou část nazývanou tykadlová pochva, která v zataženém stavu ukrývá lofofor. Endocyst je tvořen třemi vrstvami, vnitřním epitelem, svalovou vrstvou (tunica muscularis) a vnější vrstvou buněčnou, která se skládá z buněk cylindrických a vejčitých. Na vnitřním epitelu se nachází brvy, které umožňují pohyb výživové tekutiny uvnitř živočicha. Základem vrstvy svalové je homogenní blána, na kterou se váží příčně pruhované svaly a svaly podélné. Polypid je tvořen dvěmi základními složkami a to trávicí trubicí a lophophorem. K těmto částem se připojuje tykadlová pochva a svalstvo s funikulem, které pojí polypid s cystidem. Dále do polypidu náleží nervová soustava, funikulus sloužící k vývoji spermatozoí a statoblastů (vaječník spadá do cystidu). Trávicí trubice má formu vaku a je připojena ke stěně těla při ústním otvoru a v oblasti konečníku a dále jí k tělní stěně pojí svalstvo. Trubici tvoří tři hlavní oddíly a to jícen, žaludek a konečník. Lofofor (česky označovaný jako chvostonoš) obklopuje ústní otvor, který se nachází v jeho středu. Může mít tvar koňské podkovy, oválný či kruhovitý (tvořící nálevku) na jeho vnějších stranách se nachází dutá obrvená chapadélka. Ve chvostonoši lze také nalézt „mozek“ (cerebrální ganglium) a jeho výběžky, nebo nervy vybíhající k tykadlům (Kafka, 1886).

Mechovky přijímají potravu pomocí vířivého pohybu svých tykadel. Živí se drobnými vodními organismy, jako jsou rozsivky, řasy, drobná vajíčka vodních organismů, nálevníci a další. Pomocí chapadel se potrava dostává do ústního otvoru a dále do trávicí dutiny, kde je zpracována. Živiny jsou rozváděny po těle ve formě výživové tekutiny. Exkrementy odcházejí z konečníku v podobě kulovitých nebo oválných chuchvalců. Chapadla nacházející se v hlavové části živočicha pravděpodobně také zprostředkovávají obměnu krve (zajišťují dýchání). Mechovky jsou hermafrodité, jsou schopny rozmnožování pohlavního i nepohlavního a to

několika možnými způsoby. Jednak z oplodněných vajíček, dále pomocí statoblastů, nebo pučením. Vývoj vajíček a spermií se děje již během růstu nových kolonií. V létě též probíhá pučení, pomocí něhož se rozrůstá nová kolonie. Pučení zahrnuje několik stádií. První stádium je charakterizováno vznikem váčkovité vychlípeniny tělní stěny (cystidu). Ve druhém stádiu se již vchlípenina pojí k tělní stěně pouze vnější vrstvou buněčnou, uvnitř vychlípeniny se vytvořila z vnitřní buněčně vrstvy dutina. Ve třetí fázi pučení se dále dělí buňky a tak se zvětšuje vnitřní prostor dutiny, také se tvoří svalová vrstva pojící cystid k pupenu. Čtvrté stádium je charakterizováno vnitřní diferenciací, kdy se začíná vytvářet svrchní vrstva tvořená tykadlovou pochvou a chvostonoš s dutinou poševní. Spodní vrstva tvoří základ pro trávicí trubici a zažívací dutinu. V pátém stádium pokračuje vývoj chvostonoše. Šesté stádium je charakterizováno vznikem funikulu. V dalším stádiu pokračuje vývoj chvostonoše, vzniká nervová soustava. V osmém stádiu se diferencují tykadla lophophoru a diferencují se další části trávicí trubice. V posledním devátém stádiu již bývá zahájena na funikulu tvorba spermatozoí nebo i statoblastů. Rozvoj polypidu končí po jeho vychlípení se do vnějšího prostoru. Statoblasty představují důležité prostředky nepohlavního rozmnožování sloužící mechovkám k zachování existence v průběhu zimy, jelikož je to útvar odolný proti zimně a suchu. Statoblasty jsou tvořeny na funikulu a obsahují výživnou tekutinu a zárodečnou hmotu, kterou chrání chitinový obal (Kafka, 1886). Statoblasty *P. magnifica* vyžadují relativně dlouhé období předcházející klíčení, což poskytuje více času k jejich rozšíření, jelikož to přímo ovlivňuje dobu, po kterou jsou statoblasty vystaveny potenciální predaci. Statoblasty jsou šířeny ptáky, savci, ale i pomocí hmyzu, či šneků konzumujících statoblasty. Tyto faktory vedou k zajištění efektivnějšího šíření organismu (Bushnell, 1973).

2.2 Symbiotické organismy *Bryozoa*

Existuje velmi málo studií zabývajících se bakteriemi sladkovodních mechovek. Na druhou stranu však existuje podstatně více studií zkoumajících bakteriální společenství mořských mechovek, u kterých se například zkoumala i přítomnost bakterií v larválních stadiích a samozřejmě také v dospělcích. Při výzkumu mikroskopických kolonizátorů mechovek, které mohou také vést k objevu nových mikroorganismů, se vědci zabývají nejen jejich identifikací, ale zaměřují se například i

na původ bakterií, jejich vztah k hostiteli, funkci hostitele jako přenašeče potencionálních patogenů atp.

U sedmi druhů larev mořských mechovek se zkoumalo jejich bakteriální společenství. Jednalo se u larvy mechovek *Scrupocelleria berholetti*, *Tricellaria occidentalis*, *Bugula stolonifera*, *Bugula turrita*, *Bugula neretina*, *B*. *pacifica*, *B*. *simplex*. U tří druhů (*Bugula neretina*, *B*. *pacifica*, *B*. *simplex*) byly zjištěny morfologicky identické tyčinkovité bakterie s centrálním nukleoidem, nezávisle na geografické lokalitě, roku a sezóně odběru. Bakterie identické anatomie lze nálezt ve funikulární soustavě dospělců. Dospělci tudíž mohou být pravděpodobně nakažení bakteriemi obsaženými v larvách. Larvy blízce příbuzných bryozoí (*B. stolonifera*, *B*. *turrita*, *Scrupocellaria bertholetti*, *Tricellaria occidentalis*), které se vyskytují ve stejných oblastech jako larvy předešlých druhů, tyto bakterie neobsahovaly. Lze tedy přepokládat, že nalezené larvy jsou symbionti s hostitelskou specifitou. Druhy, jejichž larvy obsahovaly zmíněné bakteriální společenství, patří mezi nejčastěji se vyskytující přisedlé mořské mechovky (Woollacott, 1981).

Pomocí molekulárně-biologických metod byla studována mikrobiální diversita kultivovatelných bakterií druhu *Flustra foliacea* ze Severního moře. Metody restrikční analýzy amplifikované rDNA a sekvenace 16S rDNA odhalily rozdílnosti ve složení kultivovatelných bakteriálních populací jednotlivých kolonií mechovek odebraných ze dvou rozdílných oblastí v Severním moři. Byly také prokázány rozdílnosti ve složení kultivovatelných bakterií jednotlivých kolonií mechovek odebraných ve stejné oblasti, ale v různých časových obdobích. Přestože ve vzorku Flustra 1 (získaný nedaleko ostrova Helgoland) převažovaly gama-proteobakterie, identifikované jako *Shewanella frigidimarina*, *Pseudoalteromonas ssp*. a *Psychrobacter ssp*., většina bakterií izolovaných ze vzorku Flustra 2., původem ze Steingrund, se řadila do grampozitivních taxonů. Průzkum vzorků mechovky z lokality Steingrund v únoru 2000 vedl k detekci smíšených bakteriálních populací, skládajících se z proteobakterií a grampositivních bakterií s nízkým i vysokým procentem GC (Flustra 3). Vzhledem ktomu, že tyto bakterie patří mezi nejčastěji isolované organismy z mořského prostředí, lze předpokládat, že povrch mechovky *F.foliacea* je přístupný pro kolonizaci bakteriemi, které běžně obývají mořské prostředí a které mohly být přeneseny do tohoto prostředí ze suchozemských oblastí (Pukall et al., 2001).

Bakteriální společenství nalezená ve čtyřech druzích mechovek z oblasti Jade (Severní moře, Německo), byla zkoumána kombinováním molekulárních technik a vizualizace zooidů pomocí elektronové mikroskopie. Byla izolována bakteriální DNA z mechovek druhů *Aspidelectra melolontha*, *Conopeum reticulum*, *Electra monostachys* a *Electra pilosa*. Pomocí PCR byla amplifikována 16S rDNA, která byla analyzována pomocí elektroforézy v denaturačním gradientu (DGGE). Analýza ukázala specifické profily bakteriálních společenství u jednotlivých druhů mechovek. Opět se tedy prokázalo, že bakteriální společenství obývající jednotlivé druhy mechovek jsou hostitelsky specifická, což bylo potvrzeno také pomocí elektronové mikroskopie (Kittelmann and Harder, 2005).

Stabili et al. (2008) izolovali světélkující bakterie z mechovek. Bakterie byly identifikovány na základě fenotypové a genotypové analýzy. Jednalo se o druhy *Vibrio fisheri* a *Vibrio harveyi*. Na základě výzkumu bylo možno prohlásit, že světélkující vibria představují hlavní složku bakteriálního společenství obsažených na povrchu mechovky *Myriapora truncata*. Výsledky sledování naznačují, že interakce mezi světélkujícími bakteriemi a mechovkami jsou velmi specifické. Tyto interakce můžou mít epidemiologický a ekologický dopad na mořské organizmy, vzhledem k oportunistické patogenitě některých druhů vibrií a vzhledem k rozsáhlému rozšíření mechovek, které slouží jako přenašeči těchto vibrií (Stabili et al., 2008).

Heindl et al. (2010) se ve své studii zaměřil na výzkum bakterií mořských mechovek. Cílem jeho práce bylo identifikovat bakterie ve vzorcích a také sledování antimikrobiální aktivity izolovaných bakterií. Analyzoval 21 vzorků ze 14 druhů nasbíraných mechovek z několika oblastí Baltického a Středozemního moře. Z Baltického moře nasbíral mechovky *Callopora aurita, Electra pilosa*, *Membranipora membranacea*, *Membranipora sp*. a *Tubulipora sp*. Ze Středozemního moře nasbíral vzorky mechovek *Adeonella calveti*, *Carbasea papyrea*, *Cellaria salicornioides*, *Cellepora pumicosa*, *Cryptosula pallasiana*, *Pentapora fascialis*, *Schizobrachiella sanguinea*, *Schizotheca serrati-margo*, a *Sertella beaniana*. Při zkoumání vzorků bakterií získaných z těchto druhů využili elektronovou mikroskopii a sekvenaci genu 16S rRNA. Mimo jiné ve své práci autoři odhalili souvislosti mezi lokalitou odběru vzorků a izolovanými druhy bakterií. Rody *Alteromonas* a *Sphingomonas* byly izolovány pouze ze vzorků mechovek Středozemního moře, kdežto rody *Shewanella*, *Marinomonas* a druhy příbuzné rodu *Vibrio* byly nalezeny pouze ve vzorcích z

Baltického moře. Krom uvedených rodů se dále podařilo izolovat na obou lokalitách rody *Cellulomonas, Tenacibaculum, Pseudovibrio, Pseudoalteromonas.*

Pomocí mikroskopie a sekvenace rDNA byly v koloniích sladkovodních mechovek odhaleny tři nové druhy mikrosporidí. Ve výzkumu byl popsán nový rod *Pseudonosema,* do kterého se zařadila mikrosporidie *Nosema cristatellae* (izolováno z *Cristatella mucedo*), dále byl popsán nový rod *Trichonosema,* jediným zástupcem tohoto rodu je objevený druh *Trichonosema pectinatellae* (izolováno z *Pectinatella magnifica*). Také popsali nový rod *Bryonosema,* ve kterém jsou nově posané druhy *Bryonosema plumatellae* (izolováno z *Plumatella nitens*) a *Bryonosema tuftyi* (izolováno z *Plumatella sp*.). Pro nově popsané rody se vytvořila nová čeleď *Pseudonosematidae.* Do této čeledi spadají dvoujaderné mikrosporidie tvořící ve fázi rozmnožování dva sporoblasty. Vyvíjejí se pomocí přímého kontaktu s cytoplazmou hostitele (Canning at al., 2002). Další nový druh mikrosporidie, *Trichonosema algonquiensis*, izoloval Dresser et al. (2004) ze sladkovodní mechovky *P*. *magnifica* nalezené v oblasti Ontaria. Organismus se vyvíjí v epiteliálních buňkách a jeví se jako bílá kulovitá hmota obsažená ve všech tkáních. Tato mikrosporidie je diplokariotní, diploblastní a prodělává vývoj v přímém kontaktu s cytoplazmou hostitelské buňky. Vyzrálé spory mají ovoidní tvar a jsou zúžené na jednom konci. Pólové bičíky vytváří 20-23 spirál. Přestože se podobá mikrosporidii *T*. *pectinatellae* popsané ze stejného hostitele nalezeného v oblasti Michigan a Ohaio, liší se v délce spor a počtu spirál pólového filamenta. Také analýza 16S rDNA ukázala, že *T*. *algonquienses* je blízce příbuzný druh *T*. *pectinatellae*.

2.3 Bakteriální rody často izolované z mechovek

2.3.1 Rod Vibrio

Jedná se o početnou skupinu fakultativně anaerobních gramnegativních tyčinkovitých bakterií, které netvoří spory. Jsou to pohyblivé bičíkaté bakterie, které mají dle podmínek vnějšího prostředí fermentativní nebo respiratorní metabolismus. Vyskytují se hlavně ve vodách tropických a subtropických oblastí. Vibria lze tudíž najít i v mořských organizmech, při pozření některých mořských produktů se mohou dostat

do lidského organizmu. Existuje přes dvacet mořských druhů vibrií, které by se teoreticky mohly vyskytovat ve faeces lidí následkem pozření neupravené přírodní vody nebo tepelně neupravených mořských pokrmů (existují důkazy, že se tak doopravdy děje). Neexistují jednotné podmínky pro kultivaci vibrií a výsledky kultivace se liší u rozdílných laboratoří na základě druhu užitých kultivačních médií a použití odlišných kultivačních podmínek (Farmer III. a Hickman-Brenner, 2006).

Vibrio harveyi nalezené v mechovce *F. foliacea* se řadí mezi halofilní vibria, poprvé jej popsali Johnson and Shunk (1936) a původně byla tato bakterie pojmenována *Achromobacter harveyi*. Rodové jméno bylo zvoleno podle mikrobiologa E. N. Harvey, který mezi prvními zkoumal bioluminiscenci. Mnoho rodů vibrií má bioluminiscenční vlastnosti, avšak existují i druhy, které tuto vlastnost postrádají a může být těžké tyto druhy odlišit od ostatních vibrií (Furniss et al., 1978). Schopnost luminiscence souvisí s produkcí enzymu luciferázy. *V*. *harvey* bylo izolováno z mnoha geografických lokalit, z pobřežních i oceánských vod a z povrchů a fekálií ryb a hlavonožců (Baumann a Baumann, 1981) a často se využívá ve výzkumu bioluminiscence. Obsah guaninu a cytosinu v DNA je 46-48 %mol.

Vibrio fischeri je stejně jako předešlý druh halofilní a také má bioluminiscenční vlastnosti. Původně bylo pojmenováno jako *Photobacterium fischerii* Beijerinckem roku 1889. Později jej Lehmann a Neumann (1896) reklasifikovali do rodu *Vibrio*. Jméno *V. fischeri* se odvodilo z příjmení vědce Bernharda Fishera, který patřil mezi první mikrobiology systematicky studující bioluminiscenční jevy u bakterií. Tento rod roste při 30°C, růst ustává při 37°C, často produkuje žlutý pigment. *V*. *fischerii* bylo izolováno z oceánských a pobřežních vod, povrchů a fekálií ryb a hlavonožců, z luminiscenčních orgánů, jako je například pokožka sépií (Baumann a Baumann, 1981) a z mořských pokrmů (Furniss et al., 1978). Obsah GC bází v DNA činí 39-41 %mol.

2.3.2 rod Alteromonas

Alteromonas se řadí mezi gramnegativní bakterie, které mají tvar zahnuté tyčinky. Na pólu se nachází bičík, jsou to tudíž bakterie pohyblivé. Jedná se o aerobní, heterotrofní bakterie. Nejvíce druhů se vyskytuje v moři, a to jak v oceánské vodě, tak při pobřeží. Rod *Alteromonas* byl vytvořen Baumannem et al. (1972) pro bakterie, které

se lišily od již známého rodu *Pseudomonas* především v obsahu guanino-cytosinových bází v DNA (38-50%mol *Alteromonas*, 55-64%mol *Pseudomonas*). Alteromonady štěpí želatinu a netvoří sorbitol. Spolu s analýzou GC bází a základní morfologickou charakteristikou (poloha bičíku) lze pomocí těchto údajů odlišit rod *Alteromonas* od ostatních rodů (Gauthier a Breittmayer, 1992).

2.3.3 rod Shewanella

Tento rod je součástí třídy gammaproteobakterií, jedná se o gramnegativní, fakultativně anaerobní, rovné nebo zahnuté tyčinky, které nesporulují. Bakterie jsou pohyblivé, mají polární bičík a produkují oxidázu i katalázu. Převažuje respiratorní metabolismus, ale mohou mít i metabolismus fermentativní. Bakterie rodu *Shewanella* preferují nízké teploty do 20°C, jsou psychrofilní, většina druhů může růst při 4°C. Shewanelly jsou všudypřítomné, vyskytují se v mnoha vodních zdrojích (mořská voda, jezera, odpadní vody, podzemní vody…), často se nacházejí v potravinách (často jsou přítomny na zkažených zchlazených potravinách). Obsah GC bází v DNA je 38-54 %mol (Brenner et al., 2005).

2.3.4 rod Sphingomonas

Bakterie rodu *Sphingomonas* jsou aerobní, rovné či mírně zahnuté tyčinky, které se řadí do třídy *Alphaproteobacterie*. Stejně jako předešlé rody jsou gramnegativní. Tyto bakterie netvoří spory, můžou být jak pohyblivé, tak nepohyblivé. Tvoří katalázu, metabolismus mají striktně respiratorní. Jsou to bakterie žijící jak v přirozených přírodních habitatech, tak v prostředích vybudovaných člověkem, znečištění jim nevadí. Obsah GC bází činí 59-68 %mol (Brenner et al., 2005).

2.4 Kultivační média

Jelikož se otázce bakteriálních společenství obsažených ve sladkovodních mechovkách vědci intenzivněji věnují relativně krátkou dobu, nebyly doposud stanoveny sjednocené podmínky pro mikrobiální kultivaci vzorků získaných z těchto organismů. Právě kvůli rozsáhlejšímu výzkumu bakteriálních společenství mořských

mechovek lze najít více informací o kultivaci mikroorganismů a s tím související přípravu kultivačních médií pro vzorky získané z mořských mechovek.

Při analýze mikrobiální diversity kultivovatelných druhů mořské mechovky *F. foliacea* použil Pukall et al. (2001) minimální a komplexní kultivační média. Všechna média obsahovala 100 µg/ml cykloheximidu za účelem potlačení růstu plísní. Složení minimálních médií bylo následující:

- 10 mg peptonu (Difco)
- 5 mg kvasničného extraktu (Oxoid)
- 15 g agaru (Oxoid) rozpuštěného v 1 l umělé mořské vody (Sigma),
- doplněno 1g/l jednou ze směsí:
    - sodná sůl kyseliny alginové, acetát, glukóza, glyoxalát, manitol, metylamin, propionát, "laminaria saccharina extract" (Sigma) ve formě prášku
    - laminarin (0,1 mg/l; Sigma) a rybí moučka (1%; Sigma).

Dále bylo použito více druhů komplexních médií:

- R2A (Difco) agarové médium doplněné NaCl (15 g/l)
- Agar pro aktinomycety (Difco) doplněný 15 g/l NaCl a glycerolem (5 ml)
- Mořský agar (Difco)
- Mořský bujón 1:100 doplněná NaCl (20 g/l) a 15 g/l agaru (Oxoid)
- glukózový kvasnicový extrakt, sladový extrakt a umělá mořská voda
- tryptonový kvasnicový extrakt: "sea salt" médium YTSS (obsahuje: 16 g/l tryptone, 10 g/l kvasničného extraktu, 5 g/l NaCl), (Gonzáles et al., 1996)
- TCBS-agar (Difco; obsahuje: sacharóza, thiosíran sodný, chlorid sodný, citronan sodný, peptony, kvasniční extrakt, žluč, cholát sodný, citronan železitý, modř thymolová, modř bromthymolová, agar)
- Agarové médium s celulózou a škrobem (10 mg/l), (Huang et al., 1996)
- chitinový agar doplněný chitosanem (1 g/l)

Heindel et al. (2010) při své práci využil dvě rozdílná kultivační média. Jednak použil médium TSB3S25, které se skládalo ze sójového bujónu "tryptic soy broth" (Difco) a NaCl. Dále použil médium vyrobené z přírodní mořské vody Baltického a Středozemního moře (dle původu zkoumaného vzorku) a agaru jako solidifikačního činidla.

Při kultivaci luminescenčních vibrií bylo použito mořského agaru 2216 (Beckton Dickinson and Company). Následovala 24-48 hodinová inkubace při 30°C. Po identifikaci luminiscenčních bakterií se tyto bakterie opakovaně kultivovaly na mořském agaru pro získání čistých kultur. Čisté kultury byly při rozličném testování kultivovány na agaru obsahujícím thiosulfát, citrát, žlučovou sůl a sacharózu (TCBS agar; Beckton Dickinson and Company), luminsecence se testovala na luminiscenčním agaru. Médium pro testování luminiscence definovali Baumann a Baumann (1981) takto:

- Tris HCl (pH7,5) 7,9 g
- kvasniční extrakt 5 g
- trypton 5 g
- CaCO3 1 g
- agar 20 g
- glycerol 3 g
- BM (basal medium) 1 l.:
    - tris HCl (pH 7,5) 15,8 g
    - NH4Cl 1 g
    - (0,33 mM) $KH_2HPO_4*3H_2O$ 57 mg
    - (0,1 mM) $FeSO_4*7H_2O$ 28 mg
    - voda 500ml
    - umělá mořská voda 500ml.

3. Hypotéza

Zatím neexistují práce věnující se kultivačnímu stanovení bakterií kolonizujících sladkovodní mechovky, avšak bylo prezentováno relativně mnoho publikací týkajících se kultivace bakterií z mořských mechovek. Je pravděpodobné, že při vhodné úpravě kultivačních médií použitých pro kultivaci bakterií z mořských mechovek, bude možné kultivačně stanovit symbiotické bakterie obsažené ve sladkovodní mechovce *Pectinatella magnifica*.

4. Cíl práce

Cílem práce bylo kultivační stanovení bakterií obsažených ve sladkovodní mechovce *Pectinatella magnifica* za použití vhodného kultivačního média. Dalšími cíli byl morfologický popis bakterií a příprava vzorků pro podrobnou identifikaci pomocí molekulárně - biologických metod a hmotnostní spektrometrie.

5. Materiál a metody

5.1 Odběr vzorků

Sběr vzorků pro experimentální část práce proběhl v červenci a srpnu 2012. Odběr vzorků se prováděl na čtyřech lokalitách, vzorky se sbíraly z rybníků Hejtamn a Kanclíř a pískoven Cep a Veselí. Zvlášť se odebírala povrchová vrstva se zooidy a hmota nacházející se uvnitř kolonie. Vzorky byly odebírány do infuzních lahví obsahujících peptonovou vodu. Před sterilací byl bujón ve vzorkovnicích probublán CO_2, tak aby bylo vytvořené anaerobní prostředí. Vzorky byly odebrány asepticky a dále skladovány v chladu do doby, než byly analyzovány.

5.2 Ředící řady

V experimentu byly jednotlivé vzorky kolonií mechovky homogenizovány pomocí mixéru a dále ředěny desítkovým ředěním ve vialkách probublaných CO_2. Ze vzorkovnice byla suspenze pomocí sterilních injekčních stříkaček převedena do vialky obsahující 9 ml bujónu. Z této vialky se odebral do sterilní stříkačky vzorek o objemu 1 ml a umístil se do další vialky obsahující 9 ml ředidla. Tento postup se opakoval, až bylo dosaženo ředícího faktoru 10^{-8}. Po naředění vzorku se z každé vialky odebral 0,5 ml obsahu, který byl umístěn na kultivační Petriho misky. Kultivační misky se následně zalily níže popsaným agarem o teplotě přibližně 48°C, krouživými pohyby kultivační miskou se dosáhlo homogenizace vzorku a agaru.

5.3 Vlastní mikrobiologický rozbor

5.3.1 Kultivační stanovení bakterií

Bakterie byly kultivovány za aerobních i anaerobních podmínek. Ke kultivaci bylo využito médium s následujícím složením: 900 ml H_2O, 4,5 g kvasničného agaru, 0,9g glukózy, 4,5 g tryptonu. Médium bylo upraveno na pH 7 pomocí 1M NaOH. Aerobní kultivace probíhala 3 dny při 25°C, anaerobní kultivace probíhala 5 dní při 25°C (stanovení fakultativně anaerobních bakterií). Pro kultivaci striktně anaerobních mikroorganismů byl přidán neomycin (80 mg/l), omezující růst fakultativně anaerobních bakterií.

Po kultivaci byly spočítány narostlé kolonie. Následně byly počty narostlých kolonií spočítány podle vzorce: $P = [(P_1+P_2+\ldots)/X] * F$ (KTJ/ml). Výsledky vyjadřují počet kolonie tvořících jednotek v 1 ml vzorku.

P_1, P_2, … = počet kolonií na počitatelných Petriho miskách jednotlivých ředění

X = hodnota vycházející z počtu počitatelných ředění; dvě počitatelné ředění = 11, tři počitatelné ředění = 111 atd.

F = převrácená hodnota nejvyššího počitatelného ředění

Pro zhotovení přehlednějšího zobrazení výsledků byla hodnota P logaritmována.

5.3.2 Izolace bakterií a morfologická kontrola

Po zpracování výsledků získaných kultivací vzorků následovala izolace bakteriálních kultur. Pro izolaci bylo vybráno několik kolonií charakteristické morfologie s rozdílnou morfologií.

Byly izolovány bakterie aerobní, fakultativně anaerobní i anaerobní. Izoláty byly kultivovány v bujónu o stejném složení, jako bylo polotuhé pěstební prostředí použité pro mikrobiologický rozbor, který ovšem neobsahoval agar. Mikroskopická kontrola byla provedena pomocí fázově kontrastní mikroskopie. Při pozorování bakterií byl brán v potaz jejich tvar, uskupení a sledovala se také pohyblivost.

5.4 Příprava izolátů pro identifikaci bakterií

Bylo vybráno 54 čistých kultur rozdílné morfologie pro podrobnou identifikaci za využití metod sekvenace a hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Příprava vzorků pro sekvenaci zahrnovala izolaci DNA, která spočívala v několika krocích:

1. odebrání 1 ml bakteriální suspenze do 1,5 ml zkumavky
2. centrifugace zkumavky po dobu 3 minut při 14 500 otáčkách/min.
3. slití supernatantu
4. rozmíchání peletu ve 100ml přípravku „PrepManUltra“
5. ohřátí upraveného vzorku v termobloku na 100°C po dobu 10 min.
6. zchlazení 2 minuty
7. druhá centrifugace po dobu 2 minut při 14 500 otáčkách/min.
8. přepipetování supernatantu do nové zkumavky
9. uložení vzorku do mrazáku

Pro MALDITOF analýzu byly vzorky zpracovány následujícím způsobem:

1. umístění 2ml vzorku do 2 ml zkumavky
2. Centrifugace zkumavky po dobu 3 minut při maximální rychlosti 14500 otáček/min.
3. Odstranění supernatantu
4. Rozpuštění peletu v 0,5 ml 70% ethanolu
5. Umístění vzorku do lednice

6. Výsledky

6.1 Stanovení počtu bakterií

Výsledky kultivačního stanovení jsou znázorněny v následujících tabulkách. Čísla uvádějí logaritmovanou hodnotu počtu kolonií tvořících jednotek v 1ml (logKTJ/ml).

Tabulka 1 a 2: Záznam kultivačního stanovení bakterií v mechovce *P. magnifica*

		1. odběr		
Lokalita	typ vzorku	Aerobní b.	Fakultativně anaerobní b.	Anaerobní
Cep	gelová masa	*P. magnifica* nenalezena		
	povrchová vrstva			
Hejtman	gelová masa	4,79	3,42	3,29
	povrchová vrstva	7,35	7,31	3,7
Kanclíř	gelová masa	4,88	6,01	5,85
	povrchová vrstva	5,29	7,19	7,09
Veselí	gelová masa	4,56	5,38	3,26
	povrchová vrstva	6,49	6,58	4,15
⌀ se směrodatnou odchylkou	gelová masa	4.74 ± 0.13	4.94 ± 1.10	4.13 ± 1.2
	povrchová vrstva	6.38 ± 0.84	7.03 ± 0.32	4.98 ± 1.5

		2. odběr		
Lokalita	typ vzorku	Aerobní b.	Fakultativně anaerobní b.	Anaerobní
Cep	gelová masa	6,65	6,5	3,82
	povrchová vrstva	8,33	8,51	4,82
Hejtman	gelová masa	5,78	7,93	3,76
	povrchová vrstva	8,31	7,9	3,84
Kanclíř	gelová masa	5,63	5,66	3,43
	povrchová vrstva	8,06	7,7	4,47
Veselí	gelová masa	5,63	3,73	3,87
	povrchová vrstva	6,67	6,37	5,36
⌀ se směrodatnou odchylkou	gelová masa	5.92 ± 0.42	5.96 ± 1.52	3.72 ± 0.1
	povrchová vrstva	7.84 ± 0.69	7.62 ± 0.78	4.62 ± 0.5

Vzorky povrchových vrstev kolonií *P. magnifica* obsahovaly více bakterií, nežli vzorky gelové masy. V průměru počty aerobních a fakultativně anaerobních bakterií vždy převyšovaly počty anaerobních bakterií.

Ve vzorcích získaných v červenci průměrně převažovaly fakultativně anaerobní bakterie. Největší počet aerobních a fakultativně anaerobních bakterií obsahovaly

vzorky získané z povrchové vrstvy *P. magnifica* odebrané v rybníce Hejtman. Vzorky povrchové vrstvy *P. magnifica* odebrané z pískovny Kanclíř obsahovaly největší počet anaerobních bakterií a zároveň tyto vzorky obsahovaly v průměru nejvíce bakterií v porovnání se vzorky získanými z ostatních oblastí v červenci.

Ve vzorcích povrchové vrstvy *P. magnifica* odebraných v srpnu bylo v průměru nalezeno nejvíce bakterií aerobních. Nejvíce aerobních bakterií obsahovaly vzorky povrchové vrstvy *P. magnifica* odebrané z rybníků Cep a Hejtman. Vzorky povrchové vrstvy *P. magnifica* získané z rybníku Cep také obsahovaly největší počet fakultativně anaerobních bakterií. Nejvíce striktně anaerobních bakterií bylo kultivováno ze vzorků povrchové vrstvy *P. magnifica* získané z pískovny Veselí.

6.2 Morfologická kontrola

V rámci aerobních bakterií bylo vybráno 18 representativních vzorků, většina izolovaných bakterií měla pravidelný tyčinkovitý tvar, pouze v jednom případě se jednalo o tyčinky rohlíčkovitého tvaru. V rámci tyčinek se 70 % bakterií vyskytovalo jednotlivě, nebo v páru, pouze v jednom případě se jednalo o řetízkující bakterie. Převažovaly krátké tyčinky nad tyčinkami dlouhými. Polovina tyčinek byla pohyblivá, jedna třetina bakterií tyčinkovitého tvaru produkovala plyn. Čtyři vzorky representovaly kokotyčinky a koky. Koky se vyskytovaly jednotlivě, nebo v dvojicích. Kokotyčinky tvořily řetízky, dvojice a vyskytovaly se i jednotlivě.

U fakultativně anaerobních bakterií bylo vybráno celkem 17 representativních izolátů, přičemž 14 izolátů tvořily tyčinkovité bakterie. V tomto případě převažovaly tyčinky dlouhé nad tyčinkami krátkými. Polovina tyčinek se vyskytovala jednotlivě, nebo v párech. Dva izoláty obsahovaly řetízkující tyčinkovité bakterie, v jednom případě se bakterie vyskytovaly pouze v párech. Polovina izolovaných tyčinek byla pohyblivá, avšak pouze v jednom případě se prokázala produkce plynu. Ve třech izolátech se našly koky a to buďto jednotlivě se vyskytující, nebo v párech.

Ze zástupců striktně anaerobních bakterií bylo vybráno 11 representativních vzorků, opět převažovaly tyčinky nad koky a kokotyčinkami. Tyčinky dlouhé se vyskytovaly ve stejném počtu izolátů jako tyčinky krátké. Téměř všechny izolované tyčinky se vyskytovaly jednotlivě, nebo v párech. Jeden izolát obsahoval tyčinky vyskytující se jednotlivě a v řetízcích. Tři izoláty obsahovaly pohyblivé tyčinky, produkce plynu nebyla prokázána ani v jednom případě. Mezi striktně anaerobními

bakteriemi vyskytovaly ve dvou případech kokotyčinky a v jednom případě diplokoky.

7. Diskuze

Všeobecně nejsou dostupné téměř žádné informace o kultivačním stanovení bakterií sladkovodních mechovek, ani o jejich mikrobiální diversitě. Na druhou stranu studie mořských mechovek se zaměřují na druhové zastoupení bakterií v organismu, avšak nesledují počty bakterií obsažených v mechovkách. Ve většině studií bylo použito molekulárně-biologických metod k identifikaci bakterií (Pukall et al., 2001; Kittelmann and Harder, 2005; Heindl et al., 2010), a proto se zpravidla nezabývaly morfologickým popisem bakterií, který lze odvodit z podrobné identifikace.

V experimentu provedeném v rámci této práce byla zvláště analyzována povrchová vrstva a gelová masa, přičemž se zjistilo, že povrchová vrstva obsahovala průměrně ve všech případech více bakterií. Počty kultivovaných aerobních bakterií z povrchové vrstvy se pohybovaly v průměru mezi 6,38 – 7,84 logKTJ/ml. Fakultativně anaerobní bakterie průměrně dosahovaly početnosti 7,03 – 7,62 logKTJ/ml, anaerobních bakterií se v izolátech vyskytovalo v průměru 4,62 – 4,98 logKTJ/ml, kdežto gelová masa v průměru obsahovala 4,74-5,92 logKTJ/ml aerobních bakterií, 4,94 – 5,92 logKTJ/ml fakultativně anaerobních bakterií a 3,72 - 4,13 logKTJ/ml anaerobních bakterií. Zvýšená početnost bakterií v povrchové vrstvě pravděpodobně souvisí s anatomií zooidů a způsobem získávání potravy. V povrchové vrstvě kolonie se nachází zooidi mechovky *Pectinatella magnifica* obsahující trávicí trubice tvaru „U“, do které se potrava dostává pomocí chapadel filtrací z vody (Kafka, 1886). Je možné, že bakterie obsažené v trávicím traktu zooidů napomáhají zpracování potravy, jako tomu je i u jiných živočichů (symbiotické bakterie ve střevech savců, specializovaní bičíkovci v trávicí soustavě bezobratlých, symbiotické bakterie jednobuněčných živočichů).

V experimentu bylo použito médium obsahující kvasniční agar a trypton obohacené o glukózu (1 g l^{-1}) rozpuštěnou ve vodě. Pro nedostatek literárních zdrojů k porovnání výsledků kultivačního stanovení bakterií nelze ověřit jak úspěšnost stanovení počtu bakterií, tak vhodnost použitého kultivačního média. Avšak je třeba brát v potaz, že neexistuje médium, které by umožnilo růst všech bakterií ze vzorku a zároveň pravděpodobně bude část bakterií nekultivovatelná (Gottshal et al., 1992). Proto lze přepokládat, že stanovené počty bakterií neodpovídají absolutnímu počtu bakterií kolonizujících mechovku *P. magnifica.*

Nejčastěji nalézané rody bakterií v mořských mechovkách spadají do třídy *Gammaproteobacteria*, jedná se o rody *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Shwenella*, *Vibrio* (Pukall et al., 2001; Heindl et al., 2010). Do těchto rodů spadají nesporulující tyčinky, které jsou převážně pohyblivé. Další relativně často nalézané rody jsou zástupci třídy *Alphaproteobacteria* (Pukall et al., 2001; Heindl et al., 2010), jako například rod nesporulujících tyčinkovitých bakterií *Sphingomonas*, které můžou být jak pohyblivé, tak nepohyblivé (Brenner et al., 2005). Mezi relativně často izolované zástupce koků (popřípadě kokotyčinek) u mořských mechovek patří například rod *Micrococcus,* tvořící tetrády a rod *Arthrobacter*, který tvoří jak tyčinky, tak koky v závislosti na růstové fázi. Všechny zmíněné rody se běžně vyskytují ve vodním prostředí, krom rodu *Arthrobacter*, který se vyskytuje v půdě (Jones et al., 2006). Mezi bakteriemi kultivovanými a izolovanými v tomto experimentu převažovaly tyčinky (36 izolátů; 77% izolovaných bakterií), z nichž byla téměř polovina pohyblivá (45% izolovaných tyčinek). V rámci sférických bakterií byly v experimentu izolovány bakterie v různém uspořádání (monokoky, diplokoky, streptokoky). Dá se předpokládat, že většina bakterií, které se nachází v koloniích mechovky, je běžnou součástí vodního prostředí nebo byly splaveny do vody z půdy či rostlin. Symbiotický vztah ovšem nemůže být vyloučen.

V závěru práce se získané izoláty připravovaly na podrobnou identifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF a sekvenace genu 16S rDNA. Sekvenace části DNA je metoda umožňující zkoumaní složení DNA, v případě identifikace bakterií se zjišťuje nukleotidová sekvence genu kódujícího 16S rRNA. K tomuto účelu se využívá chromozomální DNA izolovaná z čisté bakteriální kultury, jejíž úsek kódující 16S RNA se pomocí PCR (polymerázové řetězové reakce) amplifikuje za vzniku různě dlouhých fragmentů, u kterých se provede elektroforéza. Porovnáním takto zpracovaných vzorků lze určit sekvenci nukleových bázi analyzované části DNA. Výsledky umožňují identifikaci bakteriálního druhu, využívají se také ke zkoumání fylogenetických vztahů. Metoda sekvenace DNA je časově a finančně náročná v porovnání s metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Metoda hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF analyzuje složení proteinů v buňkách. Proteiny bakteriálních buněk se nejprve extrahují a následně se vytváří pomocí této metody spektrum znázorňující jejich složení. Jednotlivé bakterie mají specifická spektra proteinového složení a porovnáním výsledků analýzy hmotnostní spektrometrie se softwarovou databází lze určit konkrétní bakteriální druh. Podmínkou pro úspěšnou analýzu je dodržení standardizovaných

podmínek pro přípravu vzorku, jelikož proteinové spektrum identické bakterie se může lišit především na základě použití rozdílných kultivačních médií. Za použití hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF lze hromadně analyzovat až několik desítek bakterií. Metoda je velmi přesná a lze odlišit bakterie i na kmenové úrovni (Štursa et al., 2010).

Heindl et al. (2010) a Pukall et al. (2001) odhalili ve svých pracích souvislost mezi identifikovanými hostitelskými bakteriemi mořských mechovek a bakteriemi nacházejícími se ve vodě v místě odběru vzorků mechovek. Na základě jich prací lze tedy předpokládat, že u mořských mechovek probíhá environmentální kontaminace bakteriemi. Proto by bylo vhodné ověřit, zdali tomu tak není i u mechovek sladkovodních.

Cílem další práce by mohla být právě podrobná identifikace bakterií kultivovaných ze vzorků bochnatky americké, dále stanovení počtu bakterií a podrobná identifikace bakterií kultivovaných ze vzorků vody obklopující mechovky. Vyhodnocení výsledků identifikace bakterií by mohlo objasnit nové aspekty týkající se původu bakterií bochnatky americké. Po zpracování výsledků za použití výše zmíněných molekulárně -biologických identifikačních metod by bylo možné daleko přesněji odhadnout mikrobiální diversitu *Pectinatella magnifica*, popřípadě také určit symbiotické bakterie.

8. Závěr

Bakterie byly stanoveny po aerobní a anaerobní kultivaci, ve vzorcích převažovaly bakterie aerobní. Větší počty bakterií obsahovaly vzorky povrchových vrstev kolonií bochnatky než vzorky vnitřní gelové hmoty. Morfologická analýza odhalila ve vzorcích převahu tyčinkovitých bakterií.

9. Seznam použité literatury

BAUMANN, P. A. U. L.; BAUMANN, LINDA. The marine gram-negative eubacteria: genera Photobacterium, Beneckea, Alteromonas, Pseudomonas, and Alcaligenes. *The Prokaryotes*, 1981, 1: 1302-1331.

BAUMANN, Linda, et al. Taxonomy of aerobic marine eubacteria. *Journal of Bacteriology*, 1972, 110.1: 402-429.

BRENNER, Don J., et al. Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 2. *The Proteobacteria. East Lansing, USA*, 2005, 183.

BUSHNELL, J. H. The freshwater Ectoprocta: a zoogeographical discussion. *Living and Fossil Bryozoa. Academic Press, London & New York*, 1973, 503-521.

CANNING, Elizabeth U., et al. New diplokaryotic microsporidia (Phylum Microsporidia) from freshwater bryozoans (Bryozoa, Phylactolaemata). *European Journal of Protistology*, 2002, 38.3: 247-265.

DESSER, Sherwin S., et al. Trichonosema algonquinensis n. sp.(Phylum Microsporidia) in Pectinatella magnificd (Bryozoa: Phylactolaemata) from Algonquin Park, Ontario, Canada. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2004, 51.4: 389-393.

FARMER III, J. J.; HICKMAN-BRENNER, F. W. The genera vibrio and photobacterium. In: *The Prokaryotes*. Springer New York, 2006. p. 508-563.

FURNISS, A. L., et al. *The Vibrios*. HM Stationery Office London, 1978.

FUCHS, Judith; OBST, Matthias; SUNDBERG, Per. The first comprehensive molecular phylogeny of Bryozoa (Ectoprocta) based on combined analyses of nuclear and mitochondrial genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2009, 52.1: 225-233.

GAUTHIER, M. J.; BREITTMAYER, V. A. The genera Alteromonas and Marinomonas. *The Prokaryotes*, 1992, 3: 3046-3070.

GOTTSCHAL, J. C.; HARDER, W.; PRINS, RUDOLF A. Principles of enrichment, isolation, cultivation, and preservation of bacteria. *The Prokaryotes*, 1992, 1: 149-196.

HEINDL, Herwig, et al. Phylogenetic diversity and antimicrobial activities of bryozoan-associated bacteria isolated from Mediterranean and Baltic Sea habitats. *Systematic and Applied Microbiology*, 2010, 33.2: 94-104.

JEBRAM, D. The importance of different growth directions in the Phylactolaemata and Gymnolaemata for reconstructing the phylogeny of the Bryozoa. *Living and Fossil Bryozoa. Academic Press, London*, 1973, 565-576.

JOHNSON, Frank H.; SHUNK, I. V. An interesting new species of luminous bacteria. *Journal of Bacteriology*, 1936, 31.6: 585.

JONES, Dorothy; KEDDIE, Ronald M. The genus Arthrobacter. In: *The Prokaryotes*. Springer New York, 2006. p. 945-960.

KAFKA, Josef. *Sladkovodní mechovky země České*. V Praze: V komisi Fr. Řivnáče, 1886. 65 s. Archiv pro přírodovědecké prozkoumání Čech; díl 6, č. 2.

KITTELMANN, Sandra; HARDER, Tilmann. Species-and site-specific bacterial communities associated with four encrusting bryozoans from the North Sea, Germany. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2005, 327.2: 201-209.

KOHRING, R.; HÖRNIG, A. Freshwater bryozoan remains from the molteno formation (Upper Triassic) of South Africa. *Bryozoan Studies*, 2001, 171-174.

LEHMANN, K. B.; NEUMANN, R. Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speciellen backteriologischen. *Diagnostik (edited by Lehmann), Munich*, 1896.

PUKALL, Rüdiger, et al. Microbial diversity of cultivatable bacteria associated with the North Sea bryozoan Flustra foliacea. *Systematic and Applied Microbiology*, 2001, 24.4: 623-633.

STABILI, L., et al. Epibiotic Vibrio luminous bacteria isolated from some Hydrozoa and Bryozoa species. *Microbial Ecology*, 2008, 56.4: 625-636.

ŠTURSA, Petr, et al. MALDI-TOF MS snadný a rychlý způsob pro identifikaci bakterií izolovaných ze životního prostředí. *Listy Cukrovarnicke a Reparske*, 2010, 126.

TAVENER-SMITH, R. Some aspects of skeletal organization in Bryozoa. *Living and Fossil Bryozoa: Recent Advances in Research*, 1973, 349-359.

WOOLLACOTT, R. M. Association of bacteria with bryozoan larvae. *Marine Biology*, 1981, 65.2: 155-158.

10. Přílohy

Příloha 1: Záznam morfologie bakterií representativních izolátů

Aerobní bakterie

tyčinky		**počet vzorků**
délka	dlouhé	4
	střední	1
	krátké	9
forma výskytu	jednotlivě/ v páru	9
	v páru	2
	v páru/ řetízky	1
	řetízky	1
	jednotlivě	1
ostatní	pohyb	7
	produkce plynu	4

koky a kokotyčinky		
tvar	kokotyčinky	2
	koky	2
forma výskytu	dvojice/řetízky	1
	jednotlivě/ v páru	3
ostatní	pohyb	0
	produkce plynu	0

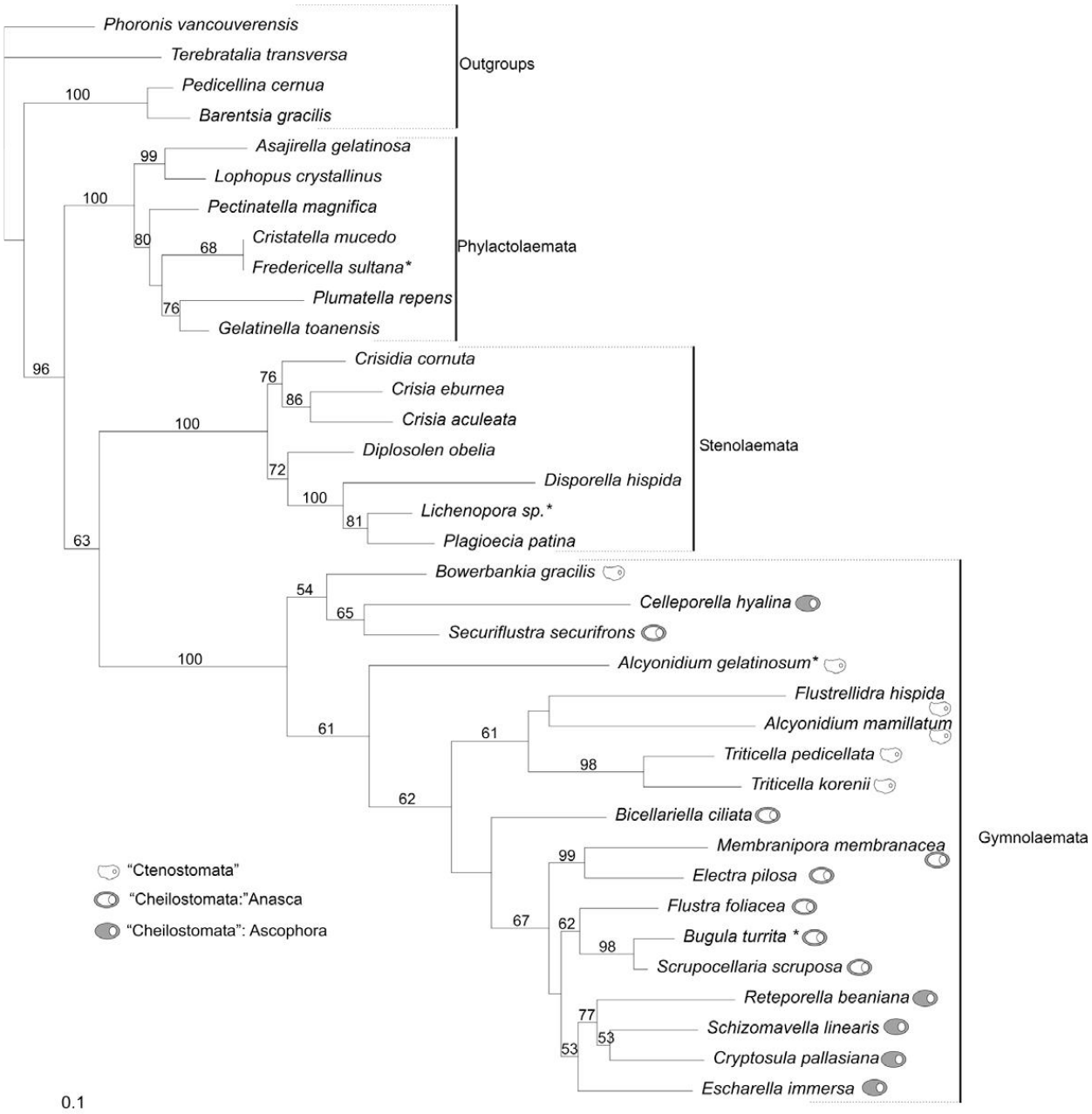
Striktně anaerobní bakterie

tyčinky		**počet vzorků**
délka	dlouhé	4
	střední	0
	krátké	4
forma výskytu	jednotlivě/ v páru	7
	řetízky/jednotlivě	1
ostatní	pohyb	3
	produkce plynu	0

koky a kokotyčinky		**počet vzorků**
tvar	koky	1
	kokotyčinky	2
forma výskytu	jednotlivě/ v páru	1
	diplokok	1
	dnotlivě/ v páru/řetíz	1
ostatní	pohyb	0
	produkce plynu	0

Fakultativně anaerobní bakterie

tyčinky		**počet vzorků**
délka	dlouhé	7
	střední	1
	krátké	6
forma výskytu	jednotlivě	3
	v páru	1
	jednotlivě i v páru	7
	shluk	1
	řetízky,dvojice i jednotlivě	2
ostatní	pohyb	7
	produkce plynu	1

koky		**počet vzorků**
tvar	koky	1
	diplokoky	3
forma výskytu	jednotlivě i v páru	3
ostatní	pohyb	0
	produkce plynu	0

Příloha 2: Fylogenetický strom mechovek navržený J. Fuchsem a kol. (2009) dle výsledků jejich práce (okopírováno z původního dokumentu)