

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra ekologie a životního prostředí



# **Vývoj mikrobiálního biofilmu v sedimentech toku na dvou odlišných lokalitách**

**Bc. Hana Vinklerová**

Diplomová práce

předložená na Katedře ekologie a životního prostředí  
Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

jako součást požadavků na získání titulu Mgr. v oboru  
Ochrana a tvorba životního prostředí

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

Olomouc 2015



Vinklerová H. (2015): Vývoj mikrobiálního biofilmu v sedimentech toku na dvou odlišných lokalitách. Diplomová práce, Katedra ekologie a životního prostředí, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého Olomouc, 36 s., v češtině.

## **Abstrakt**

Cílem této diplomové práce bylo porovnat vývoj biofilmu na skleněných kuličkách o průměru 5 mm inkubovaných v sedimentu na dvou lokalitách vodního toku Sítka pomocí stanovených parametrů. Následně pak zjistit, zda existují vztahy mezi naměřenými hodnotami parametrů a naměřenými hodnotami teploty vody. Celý výzkum probíhal od prosince roku 2013 do prosince roku 2014. Uskutečnilo se celkem šest odběrů. Bylo stanovováno těchto šest parametrů biofilmu: (i) koncentrace polysacharidů, (ii) množství celkového organického uhlíku, (iii) mikrobiální abundance, (iv) relativní zastoupení domény *Archaea* a metanogenních archeí, (v) biovolum (objem buňky) a (vi) biomasa. Během celé doby inkubace byla na obou lokalitách zaznamenávána teplota vody. Zkoumané parametry vykazovaly podobný růstový trend na obou lokalitách. Velký vliv na růst jednotlivých parametrů měla teplota vody. Významným výsledkem bylo prokázání závislosti hodnot biovolumu na teplotě vody a výskyt metanogenních archeí na obou lokalitách po prvním odběru. Nelze jednoznačně určit, na které lokalitě bylo více biofilmu nebo která byla pro jeho vývoj vhodnější. Lokality se však lišily teplotou vody, relativním zastoupením archeí včetně metanogenních archeí, mikrobiální abudancí a koncentrací polysacharidů.

**Klíčová slova:** biomasa, biovolum, celkový organický uhlík, metanogenní archea, mikrobiální abundance, polysacharidy, potok Sítka, teplota vody

Vinklerová H. (2015): Development of microbial biofilm in river sediment at two different localities. MSc. thesis, Department of Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Science, Palacky University in Olomouc, 36 pp., in Czech.

## **Abstract**

The aim of this thesis was, according to determined parameters, to compare a development of the biofilm on glass balls (diameter 5 mm) incubated in sediment at two localities of the Sitka stream. Subsequently was evaluated, if there are relations between measured values of the parameters and the measured water temperature. The research was carried out from December 2013 to December 2014. In total, six samplings took place. Six parameters of the biofilm were determined: (i) concentration of polysaccharides, (ii) total organic carbon, (iii) microbial abundance, (iv) relative representation of Archaea and methanogenic archaea, (v) biovolume (volume of a cell) and (vi) biomass. During the whole sampling period was measured a water temperature. The examined parameters showed a similar grow trend on the both localities. The growth of individual parameters was significantly influenced by the water temperature. Important results were proving of the relation of biovolume value to the water temperature and a finding of the methanogenic archaea on both localities after the first sampling. It cannot be positively ascertained, on which locality was higher amount of the biofilm or which locality could be more suitable for a development of the biofilm. However, the two localities differed in water temperature, relative representation of Archaea including methanogenic archaea, microbial abundance and concentration of polysaccharides.

**Key words:** biomass, biovolume, microbial abundance, methanogenic archaea, polysaccharides, Sitka stream, total organic carbon, water temperature

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Martina Rulíka, Ph.D. s použitím citované literatury.

V Olomouci 27. 7. 2015

Podpis:

# Obsah

<b>Seznam tabulek</b> .....	viii
<b>Seznam obrázků</b> .....	ix
<b>Seznam příloh</b> .....	x
<b>Poděkování</b> .....	xi
1. ÚVOD .....	1
2. CÍLE PRÁCE .....	4
3. MATERIÁL A METODY .....	5
3.1. Materiál .....	5
3.2. Lokalita.....	5
3.3. Inkubace a odběr .....	7
3.4. Měření teploty .....	8
3.5. Laboratorní část.....	8
3.5.1. Stanovení koncentrace polysacharidů.....	8
3.5.2. Stanovení celkového organického uhlíku.....	8
3.5.3. Stanovení mikrobiální abundance (DAPI), abundance archeí a metanogenních archeí a jejich relativní zastoupení (FISH).....	9
3.5.4. Stanovení biovolumu a biomasy.....	11
3.6. Analýza dat.....	12
4. VÝSLEDKY .....	13
4.1. Stanovení koncentrace polysacharidů .....	13
4.2. Stanovení celkového organického uhlíku.....	13
4.3. Stanovení mikrobiální abundance (DAPI), abundance archeí a metanogenních archeí a jejich relativní zastoupení (FISH).....	14
4.4. Stanovení biomasy a biovolumu .....	17
4.5. Teplota.....	20
4.6. Vztahy mezi parametry a teplotou.....	20
5. DISKUSE.....	23
5.1. Polysacharidy .....	23
5.2. Celkový organický uhlík .....	24
5.3. Abundance.....	24
5.4. Relativní zastoupení archeí a metanogenních archeí.....	25

5.5. Biomasa a biovolum .....	26
5.6. Vztah mezi parametry a teplotou.....	26
5.7. Porovnání lokality I a V .....	27
6. SOUHRN .....	28
7. LITERATURA.....	29
8. PŘÍLOHY .....	37

## Seznam tabulek

<b>Tabulka 1:</b> Vybrané fyzicko-chemické parametry povrchové vody dvou lokalit potoku Sitka. .....	7
<b>Tabulka 2:</b> Procentuální zastoupení archeí a metanogenních archeí v mikrobiálním společenstvu během jednotlivých odběrů. ....	17



## Seznam obrázků

<b>Obrázek 1:</b> Mapa zobrazující umístění potoku Sitka .....	5
<b>Obrázek 2:</b> Potok Sitka - lokalita I.....	6
<b>Obrázek 3:</b> Potok Sitka - lokalita V.....	7
<b>Obrázek 4:</b> Průměrná koncentrace polysacharidů biofilmu na dvou sledovaných lokalitách .	13
<b>Obrázek 5:</b> Celkový organický uhlík (TOC) biofilmu na dvou sledovaných lokalitách.....	14
<b>Obrázek 6:</b> Průměrná mikrobiální abundance biofilmu na dvou sledovaných lokalitách. ....	15
<b>Obrázek 7:</b> Průměrná abundance archeí během celého výzkumu na dvou sledovaných lokalitách.....	16
<b>Obrázek 8:</b> Průměrná abundance metanogenních archeí během celého výzkumu na dvou sledovaných lokalitách.....	16
<b>Obrázek 9:</b> Bakteriální biomasa biofilmu na dvou sledovaných lokalitách.. ....	18
<b>Obrázek 10:</b> Buněčný objem (biovolum) pro 1 buňku na lokalitě I během jednotlivých odběrů. .....	19
<b>Obrázek 11:</b> Buněčný objem (biovolum) pro 1 buňku lokalitě V během jednotlivých odběrů .....	19
<b>Obrázek 12:</b> Vývoj teploty na dvou lokalitách po dobu celé inkubace .....	20
<b>Obrázek 13:</b> Vztah mezi teplotou a biovolumem na lokalitě I.....	21
<b>Obrázek 14:</b> Vztah mezi teplotou a biovolumem na lokalitě V .....	22

## Seznam příloh

<b>Příloha 1:</b> Zakopané lahvičky v potoku Sitka.....	37
<b>Příloha 2:</b> Obsah lahvičky - čtvrtý odběr.....	37
<b>Příloha 3:</b> Očištěné kuličky - čtvrtý odběr.....	38
<b>Příloha 4:</b> Procentuální zastoupení jednotlivých složek celkového organického uhlíku biofilmu během celého výzkumu na lokalitě I.....	38
<b>Příloha 5:</b> Procentuální zastoupení jednotlivých složek celkového organického uhlíku biofilmu během celého výzkumu na lokalitě V.....	39
<b>Příloha 6:</b> Vztah mezi mikrobiální abundancí a biomasou na lokalitě I.....	39
<b>Příloha 7 :</b> Vztah mezi a mikrobiální abundancí a biomasou na lokalitě V.....	40
<b>Příloha 8:</b> Vztah mezi biovolumem a biomasou na lokalitě V.....	40
<b>Příloha 9:</b> Vztah mezi biomasou a abundancí archeí na lokalitě I.....	41
<b>Příloha 10:</b> Vztah mezi biomasou a abundancí archeí na lokalitě V.....	41
<b>Příloha 11:</b> Vztah mezi biomasou a abundancí metanogenních archeí na lokalitě I.....	42
<b>Příloha 12:</b> Vztah mezi biomasou a abundancí metanogenních archeí na lokalitě V.....	42
<b>Příloha 13:</b> Vztah mezi mikrobiální abundancí a abundancí archeí na lokalitě I.....	43
<b>Příloha 14:</b> Vztah mezi mikrobiální abundancí a abundancí archeí na lokalitě V.....	43
<b>Příloha 15:</b> Vztah mezi mikrobiální abundancí a abundancí metanogenních archeí na lokalitě I.....	44
<b>Příloha 16:</b> Vztah mezi mikrobiální abundancí a abundancí metanogenních archeí na lokalitě V.....	44
<b>Příloha 17:</b> Vztah mezi teplotou a mikrobiální abundancí na lokalitě V.....	45
<b>Příloha 18:</b> Vztah mezi teplotou a biomasou na lokalitě I.....	45
<b>Příloha 19:</b> Vztah mezi teplotou a biomasou na lokalitě V.....	46
<b>Příloha 20:</b> Vztah mezi teplotou a abundancí archeí na lokalitě V.....	46
<b>Příloha 21:</b> Vztah mezi teplotou a abundancí metanogenních archeí na lokalitě I.....	47
<b>Příloha 22:</b> Vztah mezi teplotou a abundancí metanogenních archeí na lokalitě V.....	47

## **Poděkování**

Nejprve bych ráda poděkovala svému vedoucímu diplomové práce doc. RNDr. Martinu Rulíkovi, Ph.D. za cenné rady a připomínky, za čas strávený při konzultacích, odběrech vzorků a za poskytnutí literatury. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Lence Brablcové, Ph.D. a Mgr. Ivě Buriánkové, Ph.D. za pomoc při zpracování vzorků a řešení problémů s přístrojovým vybavením. Velké poděkování patří celé mé rodině, která mě jak finančně, tak i psychicky podporovala po celou dobu mého studia. Další poděkování patří mému příteli Standovi za psychickou podporu, toleranci mých stresových stavů, ale i za veškerou pomoc. Na závěr bych chtěla poděkovat svému vedoucímu stáže Ing. Martinu Prusenovskému za poskytnutí volna pro dopsání této diplomové práce.

# 1. ÚVOD

Bakterie jsou díky své přizpůsobivosti prakticky všudypřítomné a můžeme je tak považovat za nejúspěšnější formu života na Zemi (Schindler 2008). V přírodě mohou bakterie žít buď volně, planktonicky nebo seskupeny do společenstva, přisedat k nejrůznějším povrchům a vytvářet biofilm (Schindler 2008, Rulík et al. 2011). Tato komunita je schopna reagovat a přizpůsobovat se změnám v životním prostředí (Hall-Stoodley and Stoodley 2002). Existence v biofilmu je pro bakterie z mnoha důvodů výhodnější (Donlan a Costerton 2002) a je také základním způsobem jejich přirozeného výskytu (Rulík et al. 2011).

Biofilmy byly lidem známy ještě dlouho před vynalezením vhodných přístrojů k jejich bližšímu zkoumání. Důležitým milníkem v jejich studiu byl pak rok 1800, kdy byla Robertem Kochem vyvinuta metoda přípravy živného média pro kultivaci mikroorganismů (Costerton 2004). První použití termínu biofilm v odborné literatuře bylo zaznamenáno v 70. letech 20. století v publikaci Mack et al. (1975). Od roku 1990 se výzkum dočkal velkého rozmachu (Costerton 2004). Jelikož jsou biofilmy významným fenoménem v přírodě, průmyslu a medicíně, jsou předmětem interdisciplinárního výzkumu (Stoodley et al. 2002, Karunakaran et al. 2011)

Biofilm je většinou definován jako aktivní biologická vrstva složená z mikroorganismů (bakterií, řas, hub, prvoků, mnohobuněčných) a jejich extracelulárních polymerních produktů, která je přichycena na povrchu nejrůznějších podkladů, které jsou v kontaktu s vodou (Lock 1993). Definice biofilmu se stále vyvíjí. Jedna z nejaktuálnějších zahrnuje také fyziologické vlastnosti organismů biofilmu a schopnost transkripce genů (Rulík et al. 2011). Dle této definice je biofilm přisedlé společenstvo mikroorganismů, charakterizované buňkami, které jsou ireverzibilně přichycené k podkladu nebo jedna k druhé, jsou zapuštěny v matici extracelulárních polymerních látek těmito buňkami produkovaných, a které dále vykazují odlišný fenotyp s ohledem na rychlost růstu a transkripci genů (Donlan a Costerton 2002, Schindler 2008).

Hlavní odlišnou charakteristikou biofilmů, která je odlišuje od planktonních populací, je to, že buňky biofilmu jsou zachyceny do extracelulární polymerické matrice (Rulík et al. 2011). Matrice je ústředním strukturálním parametrem biofilmu. Zajišťuje jeho stabilitu a integritu, poskytuje mikrobiálnímu společenstvu potřebnou přilnavost k povrchu a ochranu před vyschnutím (Ramasamy a Zhang 2005). Dále chrání

mikrobiální společenstvo před působením UV-zářením, antibiotik, toxických látek a predátorů (Flemming a Wingender 2010). Přispívá také k organizaci biofilmového společenstva (Branda et al. 2005). Matrice je tvořena souborem extracelulárních polymerů (Romaní 2010) nazývaných souhrnně EPS (zkratka "extracellular polymeric substance", extracelulární polymerická hmota), který je vylučován mikroorganismy během jejich růstu a hromadí se na povrchu buněk (Tsuneda et al. 2003, Sheng et al. 2010). Sutherland (2001b) uvádí navíc další složky matrice, a to vodu, mikrobiální buňky, absorbované živiny a metabolity, produkty z buněčné lyze, partikulovaný materiál a detrit z bezprostředního okolí. EPS zastává důležitou roli při tvorbě biofilmu (Laspidou a Rittmann 2002) a přispívá ke stabilitě a přilnavosti biofilmu (Romaní et al. 2008). Chemické složení EPS se uvádí jako velmi heterogenní (Frølund et al. 1996). Výzkumem bylo zjištěno, že hlavními komponenty jsou proteiny a polysacharidy, v menším množství se zde pak vyskytují huminové látky, uronové kyseliny, DNA a lipidy (Frølund et al. 1996, Azeredo et al. 1999, Liu a Fang 2002, Tsuneda et al. 2003, Comte et al. 2006, Pal a Paul 2008, D'Abzac et al. 2010, Sheng et al. 2010).

Všechny pevné povrchy v tocích (např. kameny, zrna sedimentu, kořeny, listí, atd.) jsou kolonizovány biofilmy (Ainsworth a Goulder 2000, Romaní et al. 2004, Romaní et al. 2013). Biofilmy mají nezastupitelnou roli při remineralizaci a koloběhu živin v tocích (Von Schiller et al. 2007). Díky své schopnosti odnímat z vody mnohé polutanty i jiné organické a anorganické látky tvoří biofilmy klíčový prvek samočisticí schopnosti vodních toků (Rulík et al. 2011). Vývoj biofilmu můžeme charakterizovat pěti fázemi, kterými jsou: (i) adheze, (ii) kolonizace, (iii) akumulace, (iv) klimax společenstva a (v) disperze (Jenkinson a Lappin-Scott 2001, Jahid a Ha 2012). Tyto fáze jsou ovlivněny řadou fyzikálních, biologických a environmentálních faktorů (Jahid a Ha 2012). Proces vývoje biofilmu se všemi jeho fázemi se dá chápat jako cyklus, protože na uvolněném místě po zániku biofilmu se začne tvořit biofilm nový (Tarjányi-Szikora et al. 2013). Dnes již víme, že pokud dojde k ponoření nového předmětu pod vodní hladinu, dochází na něm ke tvorbě biofilmu již po několika hodinách (Sabater a Romaní 1996).

Hyporheická zóna je definována jako přechodná ekotonální zóna mezi podzemní a povrchovou vodou (Boulton et al. 1998). Nachází se pod povrchem říčního dna a je vyplněna sedimentem. Má klíčovou roli při mineralizaci organického materiálu, biogeochemických cyklech a metabolismu toku (Storey et al. 1999, Fischer et al. 2005, Hancock et al. 2005, Boulton 2007). Zároveň slouží i jako refugium pro bentické

organismy (Kawanishi et al. 2013). Biofilmy rostoucí na hyporheickém sedimentu nazýváme hyporheické biofilmy. Od biofilmu tekoucích vod se liší nedostupností světla a tím pádem i složením mikrobiálního společenstva. U biofilmu tekoucích vod jakožto autotrofního biofilmu převažuje biomasa tvořená řasami a sinicemi. U hyporheického biofilmu převažuje heterotrofní biomasa bakterií, hub a prvoků (Rulík 2011).

Metanogenní archea jsou jednou z hlavních skupin domény *Archaea* (Sedláček 2007). Domény, která byla v roce 1977 vyčleněna jako nezávislá na ostatních doménách života (*Bacteria*, *Eucaryota*) na základě sekvenace genů kódujících rRNA (ribozomální RNA), tehdy pod názvem *Archaeobacteria*. Zasloužili se o to Carl Woese a George Fox publikováním své práce (Woese a Fox 1977). Metanogenní archea patří do kmene *Euryarchaeota* a dělí se do pěti řádů: (i) *Methanobacteriales*, (ii) *Methanococcales*, (iii) *Methanomicrobiales*, (iv) *Methanosarcinales* a (v) *Methanopyrales* (Sedláček 2007). Jsou to obligátní anaerobové, vyskytující se v anoxickém prostředí s extrémně nízkým redoxním potenciálem (Liu a Whitman 2008). Methanogenní archea jsou hlavními producenty metanu, který je výsledným produktem anaerobní respirace (Garcia et al. 2000).

Ačkoliv je hyporheický biofilm důležitou složkou ekosystému vodních toků a podílí se na procesu říčního samočištění, není mu věnovaná patřičná pozornost. Studium hyporheického biofilmu se zabývali ve svých pracích např. Bärlocher a Murdoch (1989), Claret (1998), Findlay a Sinsabaugh (2003), Koutný a Rulík (2007), Rulík et al. (2007). Dosavadní studie, které zkoumaly vývoj hyporheického biofilmu, probíhaly jen po dobu několika měsíců. Výzkumů, které by sledovaly vývoj po dobu jednoho roku, je velmi málo. Výsledky dlouhodobé celoroční studie nám mohou ukázat celoroční vývoj hyporheického biofilmu.

## 2. CÍLE PRÁCE

Cílem této práce je:

- 1) Pomocí vybraných parametrů porovnat vývoj biofilmu na umělém podkladu (skleněné kuličky) zakopaném v sedimentech na dvou lokalitách vodního toku Sitka po dobu 12 měsíců. Těmito parametry jsou (i) koncentrace polysacharidů, (ii) množství celkového organického uhlíku, (iii) mikrobiální abundance, (iv) biovolum (objem buňky), (v) množství biomasy a (vi) relativní zastoupení domény *Archaea* a metanogenních archeí.
- 2) Zjistit, zda existují vztahy mezi zjištěnými hodnotami parametrů a naměřenými hodnotami teplot vody.

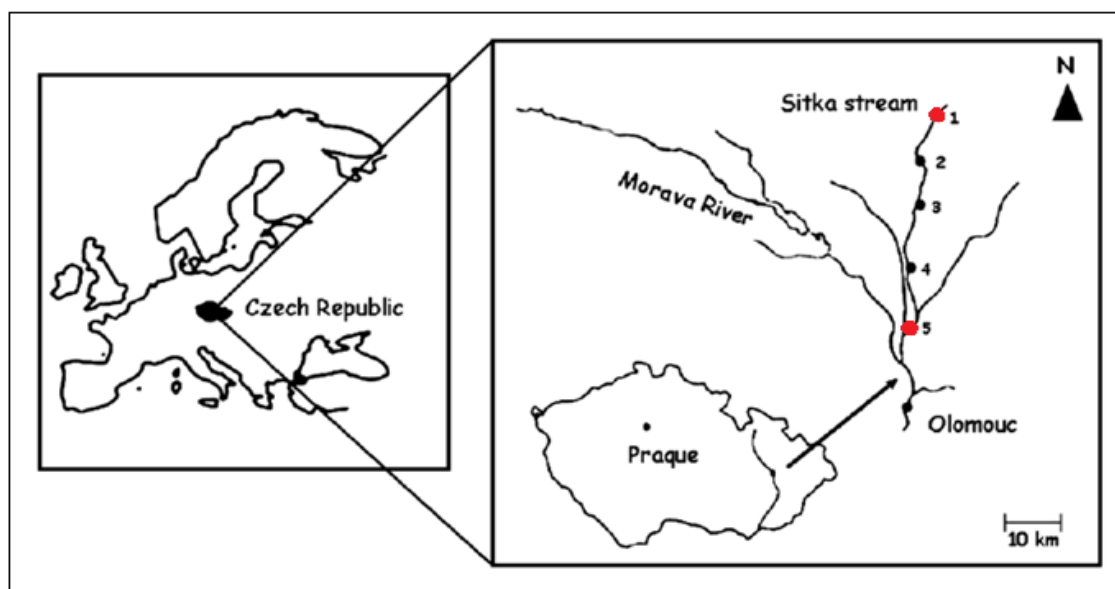
### 3. MATERIÁL A METODY

#### 3.1. Materiál

Jako umělý substrát pro tvorbu biofilmu byly použity skleněné kuličky o průměru 5 mm. Tyto kuličky byly před inkubací v toku dezinfikovány 36% HCl a promyty destilovanou vodou. Poté byly nasypány do zelených polyethylenových lahvíček o objemu 125 ml, kterým byly po obvodu vyvrtány otvory. Každá lahvíčka obsahovala vždy 500 skleněných kuliček. Následně bylo na víčko lahvíčky připevněno lanko s již navázaným okem pro připevnění v toku. Celkem bylo takto připraveno 70 lahvíček.

#### 3.2. Lokalita

K umístění skleněných kuliček byl vybrán potok Sitka nacházející se 6 km severně od Olomouce. Na tomto toku, na pěti lokalitách, probíhá dlouholetý výzkum katedry ekologie a životního prostředí UP. Záměrně byly pro tuto práci vybrány dvě lokality, lokalita I a lokalita V, které jsou dlouhodobě studovány. Na těchto lokalitách byly kuličky inkubovány (obr. 1).



**Obrázek 1:** Mapa zobrazující umístění potoka Sitka. Červené body znázorňují studované lokality (upraveno dle Buriánková et al. 2012)

Sitka je z velké části přirozeně meandrující potok třetího řádu, 35 km dlouhý. Pramení v Hrubém Jeseníku v nadmořské výšce 650 m n. m. Plocha povodí zaujímá 118,81 km<sup>2</sup>, průměrný roční odtok dosahuje 0,81 m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup>. Šířka koryta se pohybuje v rozsahu 4 až 6 m. Průměrný roční úhrn srážek na dolní části povodí se pohybuje



od 500 do 600 mm. Potok Sitka se vlévá 5 km severně od Olomouce do řeky Oskavy, která je levým přítokem řeky Moravy. Lokalita I se nachází na katastrálním území obce Huzová. Zastupuje horní část toku, která prochází přes zalesněné oblasti s nízkou intenzitou antropogenních vlivů (obr. 2).



**Obrázek 2:** Potok Sitka - lokalita I

Lokalita V se nachází severně od Olomouce u obce Chomoutov. Zastupuje spodní část toku, která protéká intenzivně obhospodařovanou zemědělskou krajinou (obr. 3). S výjimkou krátkých úseků tok potoku Sitka není regulovaný. Více charakteristik o jednotlivých lokalitách je uvedeno v Tabulce 1.



**Obrázek 3:** Potok Sitka - lokalita V

**Tabulka 1.** Vybrané fyzicko-chemické parametry povrchové vody dvou lokalit potoku Sitka (upraveno dle Rulík et al. 2013).

parametr/lokalita	I.	V.
nadmořská výška (m n. m.)	535	215
vzdálenost od pramenu (km)	6,9	34,9
dominantní složka substrátu	štěrk	štěrkopísek
střední velikost zrna (mm)	12,5	5,4
konduktivita ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	107,5	397,7
$\text{PO}_4^{3-}$ (mg/l)	0,2	0,82
$\text{N-NO}_3^-$ (mg/l)	0,9	1,79

### 3.3. Inkubace a odběr

Dne 2. 12. 2013 byly do dna potoku Sitka (na lokalitách I a V) přibližně do hloubky 10 cm zakopány lahvičky. Na každé lokalitě bylo zakopáno 35 lahviček. Každá lahvička byla jištěna proti odplavání lankem, které bylo zavěšeno na železnou tyč (Příloha 1). Celkem bylo uskutečněno šest odběrů, při kterých bylo odebráno ze dna toku, z každé lokality, vždy pět lahviček. Odběry proběhly 3. 2., 31. 3., 2. 6., 31. 7., 3. 10. a 1. 12. 2014. Odebrané lahvičky byly převezeny v uzavíratelné plastové nádobě

do laboratoře. Kuličky byly očištěny od bahna, šterku a ostatních nečistot (Příloha 2), a to s použitím minimálního množství vody tak, aby nedošlo k poškození biofilmu. Očištěné kuličky (Příloha 3) byly během zpracování skladovány po dobu 2 až 3 dnů při teplotě *in situ*, zalité destilovanou vodou.

### 3.4. Měření teploty

Na obou lokalitách bylo v hloubce 10–20 cm pod hladinou vody umístěno teplotní čidlo (datalogger Minikin). Měření teploty probíhalo po celou dobu inkubace kuliček. Teploty byly zaznamenávány 2 × denně (tj. po 12 hodinách). Každé čtyři měsíce byly naměřené hodnoty staženy do PC.

### 3.5. Laboratorní část

Vývoj mikrobiální biofilmu byl sledován prostřednictvím stanovení hodnot následujících šesti parametrů: (i) koncentrace polysacharidů, (ii) celkového organického uhlíku, (iii) mikrobiální abundance, (iv) relativního zastoupení domény *Archaea* a metanogenních archeí, (v) biovolumu (objem buňky) a (vi) biomasy.

#### 3.5.1. Stanovení koncentrace polysacharidů dle Dubois (Dubois et al. 1956)

Nejprve byly ze zásobního roztoku D-glukosy připraveny kalibrační roztoky o koncentracích 0–100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Z každé lahvičky bylo odebráno do skleněných zkumavek 10 kuliček. Do zkumavek s 1 ml kalibračních roztoků a do zkumavek se skleněnými kuličkami byly přidány 1 ml 5% roztoku fenolu a 5 ml koncentrované kyseliny sírové. Obsah zkumavek byl protřepán a nechal se odstát v digestoři po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Následně byla u všech vzorků naměřena hodnota absorbance při vlnové délce 595 nm. Ze zjištěných hodnot kalibračních roztoků byla v programu Standard Curves (WindowChem Software) vytvořena kalibrační křivka ze které byly získány koncentrace zkoumaných vzorků v jednotce  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Zjištěné hodnoty koncentrací byly převedeny na plochu  $\text{cm}^2$ .

#### 3.5.2. Stanovení celkového organického uhlíku (Horáková et al. 1989)

Na vysušené keramické misky, které byly předem zváženy, bylo z každé lahvičky odebráno 30 skleněných kuliček. Tyto kuličky byly v sušárně při teplotě 100 °C sušeny 24 hodin. Po uplynutí této doby a vychladnutí v exsikátoru byla vzniklá sušina zvážena. Dále byly kuličky žíhány v laboratorní peci při teplotě 550 °C po dobu 3 hodin. Po vychlazení v exsikátoru byly kuličky opět zváženy. Zjištěné hodnoty byly

přepočteny koeficientem 0,45 na celkový organický uhlík. Hodnoty byly vyjádřeny v jednotce  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ .

### **3.5.3. Stanovení mikrobiální abundance (DAPI), abundance archeí a metanogenních archeí a jejich relativní zastoupení (FISH)**

#### 1) Příprava vzorků

Z každé lahvičky bylo odebráno 50 kuliček do 50ml zkumavek. Zde byly kuličky fixovány 10 ml 2% formaldehydu. Následně byly vzorky sonikovány po dobu 30 s ve 3 cyklech při síle 17 %. K sonikovaným vzorkům bylo přidáno 150  $\mu\text{l}$  detergentu Triton. Vzorky byly třepány po dobu 6 hodin při rychlosti 200 rpm. Z takto připravených vzorků bylo odebráno do 15ml zkumavek 10 ml směsi, ke kterým byly zavedeny injekční jehlou 4 ml hustotního média Nycodenz tak, aby došlo k navrstvení vzorku. Zkumavky byly vloženy do centrifugy a centrifugovány při maximálním výkonu po dobu 1 hodiny. Poté byl odebrán vzniklý supernatant.

#### 2) Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) (Pernthaler et al. 2001)

##### (i) Filtrace vzorků na membránový filtr

Z každého vzorku byly pomocí vakuové filtrace přefiltrovány 3 ml supernatantu na membránový filtr Millipore (0,2  $\mu\text{m}$ , GTTP), který byl pak rozřezán na 4 díly. Každý díl byl vysušen položením na filtrační papír.

##### (ii) Příprava hybridizačního a pracího pufru

Byl připraven hybridizační pufr. Pro výrobu 45 ml toho pufru (množství bylo předem vypočítáno dle počtu vzorků) bylo napipetováno do odměrného válce 8,1 ml 5M NaCl, 900  $\mu\text{l}$  1 M Tris-HCl (pH 7,4) a 9 ml formamidu. Roztok byl doplněn do objemu 40 ml MQ vodou (ultračistá voda připravena systémem Millipore). Následně bylo přidáno 450  $\mu\text{l}$  1% SDS. Objem válce byl doplněn do 45 ml MQ vodou. Také byl připraven prací pufr. Pro namíchání pracího pufru o množství 500 ml bylo napipetováno 30,8 ml 5M NaCl, 10 ml 1M Tris-HCl a 5 ml EDTA. Roztok byl doplněn do objemu 450 ml MQ vodou. Následně bylo přidáno 5 ml 1% SDS a roztok byl doplněn na konečný objem 500 ml MQ vodou.

##### (iii) Zředění próby na cílovou koncentraci

Byly použity oligonukleotidové próby značené fluorochromem Cy3 (indokarbocyaninové barvivo) cílené na 16S rRNA. Pro detekci domény *Archaea* byla

použita próba ARCH915 5'-GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT-3' (Raskin et al. 1994) a pro detekci metanogenních archeí próba MPB1 5'-CAT GCA CCW CCT CTC AGC-3' (Jupraputtasri et al. 2005). Obě próby byly ředěny MQ vodou na koncentraci  $c = 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ .

#### (iv) Příprava hybridizační směsi

Do mikrozkušavky (Eppendorf, objem 1,5 ml) bylo pro každou sondu odpipetováno vždy  $20 \times 18 \mu\text{l}$  hybridizačního roztoku a  $20 \times 2 \mu\text{l}$  jednotlivé sondy. Byly použity dvě mikrozkušavky. Vzniklý roztok byl promíchán a uložen do temna.

#### (v) Vlastní hybridizace

Díly jednotlivých vzorků byly umístěny vedle sebe na podložní sklo. Na jednom podložním skle byl hybridizován pouze jeden typ sondy. Celkem bylo připraveno 10 podložních skel. Od každého vzorku bylo na polovinu dílů (tj. na 2 díly z každé lahvičky) napipetováno  $20 \mu\text{l}$  hybridizační směsi pro archea na každý díl. Na druhou polovinu bylo napipetováno  $20 \mu\text{l}$  hybridizační směsi pro metanogenní archea na každý díl. Podložní skla byla vložena do 50ml zkumavek, které byly vystlány buničitou vatou zvlhčenou 4 ml hybridizačního pufru. Důkladně uzavřené zkumavky byly ve vodorovné poloze vloženy do inkubátoru. Zde byly inkubovány při teplotě  $46 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 3 hodin.

#### (vi) Vymývání

Během hybridizace byly pro každou zkumavku s hybridizovanými vzorky připraveny zkumavka s 50 ml pracího pufru a zkumavka s destilovanou vodou. Tyto zkumavky byly vloženy do vodní lázně předehřáté na teplotu  $48 \text{ }^\circ\text{C}$ . Po uplynutí tří hodin byly z inkubátoru postupně zkumavky vytahovány, bylo vyjmuto podložní sklo a rychle přemístěno do předehřáté zkumavky s pracím pufrem. Zkumavka s díly filtru byla umístěna zpět do vodní lázně, kde probíhalo vymývání v klidu po dobu 15 minut. Po uplynutí této doby byly díly filtrů promyty v destilované vodě ohřáté na  $48 \text{ }^\circ\text{C}$  a následně ve studené destilované vodě. Díly filtrů byly položeny na filtrační papír, kde se nechaly usušit. Celý postup se opakoval s dalšími zkumavkami.

#### (vii) Barvení DAPI

Zcela uschlé díly filtrů byly poté obarveny  $15 \mu\text{l}$  fluorochromu DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol) po dobu 10 minut ve tmě (Porter a Feig 1980). Po této době byly díly filtrů střídavě promyty v destilované vodě a etanolu. Poslední fází byla vždy

destilovaná voda. Sušení filtrů probíhalo ve tmě. Takto obarvené vzorky byly položeny na podložní sklo do roztoku Citifluor – Vecta Shield (poměr 4:1) a překryty krycím sklem. Po takovéto úpravě je možné vzorky při teplotě -20 °C přechovávat i několik dní bez toho, že by došlo k výraznému snížení fluorescence.

(viii) Snímání a vyhodnocení

Z každého dílu filtru bylo v epifluorescenčním mikroskopu Olympus BX 60 přes imerzní objektiv (zvětšení 1000krát) vyfoceno 10 náhodných dvojic polí, tedy celkem 20 dvojic pro jednu lahvičku pro každou пробу. Každá dvojice obsahovala jeden snímek pro celkový počet buněk a druhý snímek pro počet buněk obarvených sondou pro archea nebo sondou pro metanogenní archea. Vyhodnocení těchto snímků bylo provedeno v programu NIS-Elements (Laboratory Imaging). Abundance vzorku byla na základě zjištěných hodnot vypočítána dle vzorce

$$N = \frac{n \cdot F}{P \cdot V}$$

kde:

n.....průměrný počet bakterií na snímek

F.....plocha filtru (resp. vnitřní průměr filtračního komína)

P.....plocha, kterou stanovujeme

V.....objem přefiltrovaný přes filtr

Výsledky abundancí byly vyjádřeny na plochu cm<sup>2</sup>. Relativní zastoupení archeí a metanogenních archeí byla vyjádřena v procentech.

#### 3.5.4. Stanovení biovolumu a biomasy

Ze snímků nafocených na epifluorescenčním mikroskopu Olympus BX 60 (viz kapitola 3.5.3. Stanovení mikrobiální abundance (DAPI), abundance archeí a metanogenních archeí a jejich relativní zastoupení (FISH)) byly v programu NIS-Elements naměřeny hodnoty 500 jednotlivých buněk každého vzorku (plocha, obvod, délka, šířka, maximální a minimální průmět) ze kterých byl vyhodnocen průměrný biovolum v μm<sup>3</sup>. Ten byl následně použit k výpočtu biomasy. Biomasa byla vyjádřena v jednotkách nanogram uhlíku na plochu cm<sup>2</sup>.

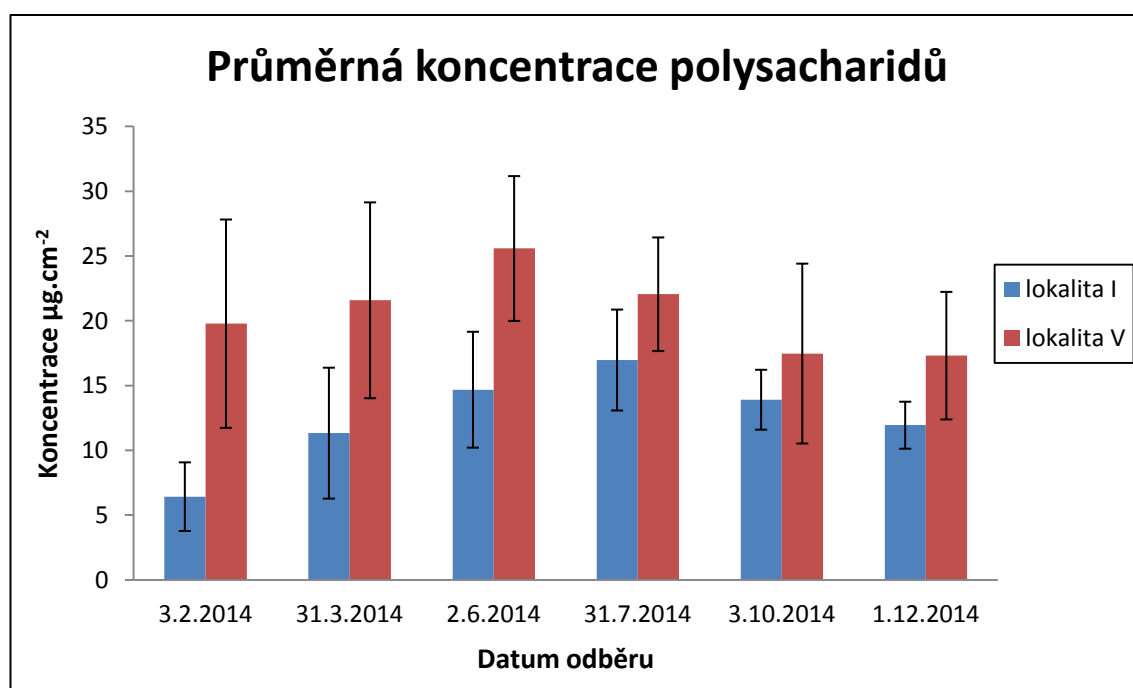
### 3.6. Analýza dat

Ke statistickému vyhodnocení dat byl použit program NCSS 2007 (Hintze 2009). Při porovnávání hodnot koncentrace polysacharidů, množství celkového organického uhlíku, mikrobiální abundance, abundance a relativního zastoupení Archeí a metanogenních archeí, biomasy, biovolumu a teploty mezi jednotlivými lokalitami během celého výzkumu byl použit dvouvýběrový t-test. Vztahy mezi jednotlivými parametry byly ověřovány lineární regresí a korelací. K zobrazení hodnot biovolumu při jednotlivých odběrech byly použity krabicové grafy vytvořené v softwaru R (R Core Team 2015). Výsledky hodnot získané během jednoho odběru byly zapsány ve tvaru průměr  $\pm$  SD, průměrná hodnota během celého výzkumu ve tvaru průměr  $\pm$  SE.

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Stanovení koncentrace polysacharidů

Hodnoty koncentrací narůstaly již od prvního měření na obou lokalitách. U lokality I koncentrace narůstala až do čtvrtého odběru. Zde dosahovala hodnoty  $16,98 \pm 3,89 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Poté docházelo k poklesu. Hodnoty koncentrací u lokality V narůstaly do třetího odběru. Nejvyšší naměřená hodnota byla  $25,59 \pm 5,58 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Poté došlo k úbytku. Největší nárůst koncentrace byl u obou lokalit zaznamenán během prvního odběru. Průměrná hodnota koncentrace polysacharidů u lokality I dosahovala  $12,55 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2} \pm \text{SE} = 1,48 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , u lokality V  $20,63 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2} \pm \text{SE} = 1,28 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  (obr. 4). Statisticky signifikantně bylo prokázáno větší množství polysacharidů na  $\text{cm}^2$  na kuličkách z lokality V ( $t = -4,14$ ,  $p = 0,002$ ).



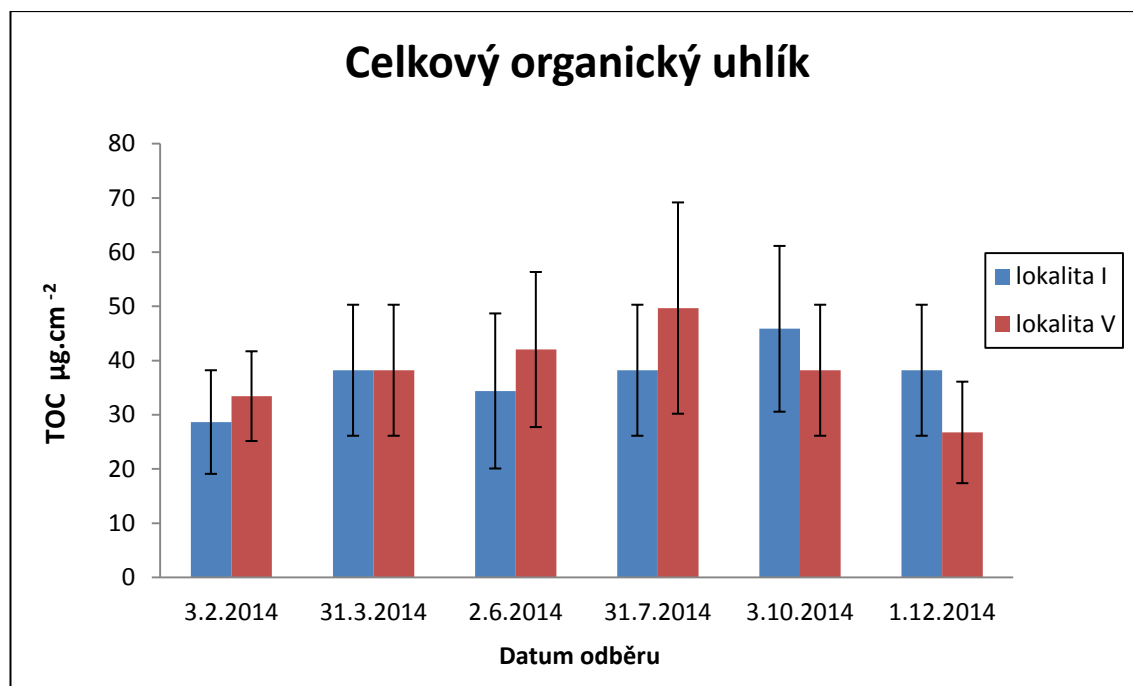
**Obrázek 4:** Průměrná koncentrace polysacharidů biofilmu na dvou sledovaných lokalitách. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku.

### 4.2. Stanovení celkového organického uhlíku

U lokality I hodnoty celkového organického uhlíku narůstaly až do pátého odběru, mimo třetí odběr kdy došlo k menšímu úbytku, poté klesaly. Při pátém odběru byla získána nejvyšší hodnota  $45,86 \pm 15,29 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . U lokality V hodnoty celkového organického uhlíku narůstaly do třetího odběru, zde byla naměřena hodnota  $49,68 \pm$



19,48  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Poté došlo k úbytku. Největší nárůst byl zaznamenán u obou lokalit během prvního odběru. Průměrná hodnota celkového organického uhlíku během celé doby inkubace byla u lokality I  $37,26 \pm \text{SE} = 2,45 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  a u lokality V  $38,06 \pm \text{SE} = 3,16 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  (obr. 5). Nebyl prokázán statisticky signifikantní rozdíl mezi množstvím celkového organického uhlíku na  $\text{cm}^2$  na kuličkách u lokality I a lokality V ( $t = -0,20$ ,  $p = 0,843$ ).



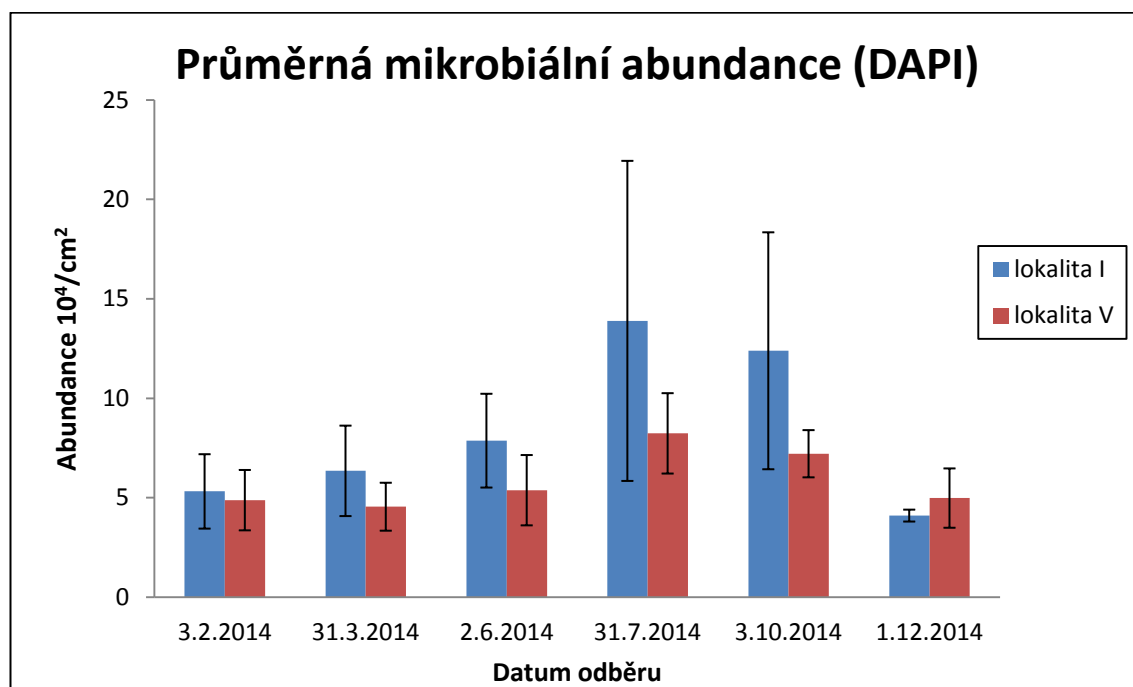
**Obrázek 5:** Celkový organický uhlík (TOC) biofilmu na dvou sledovaných lokalitách. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku.

Procentuální zastoupení jednotlivých složek uhlíku biofilmu je uvedeno pro lokalitu I v příloze 4, pro lokalitu V v příloze 5. Na lokalitě I tvoří polysacharidy 8–18 % a bakterie 5–20 % celkového organického uhlíku. Na lokalitě V polysacharidy představují 17–23 % a bakterie 2–11% celkového organického uhlíku. Neidentifikovaná složka převládala na obou lokalitách.

### 4.3. Stanovení mikrobiální abundance (DAPI), abundance archeí a metanogenních archeí a jejich relativní zastoupení (FISH)

Hodnoty mikrobiální abundance na lokalitě I postupně narůstaly až do čtvrtého odběru, kdy byla získána největší hodnota  $13,89 \cdot 10^4 / \text{cm}^2 \pm 8,05 \cdot 10^4 / \text{cm}^2$ . Následně nastal její pokles. Na lokalitě V hodnoty mikrobiální abundance taktéž narůstaly, mimo druhý odběr, kdy došlo k mírnému poklesu. Největší hodnota byla stejně jako u lokality I získána při čtvrtém odběru,  $8,24 \cdot 10^4 / \text{cm}^2 \pm 2,02 \cdot 10^4 / \text{cm}^2$ . Průměrná hodnota

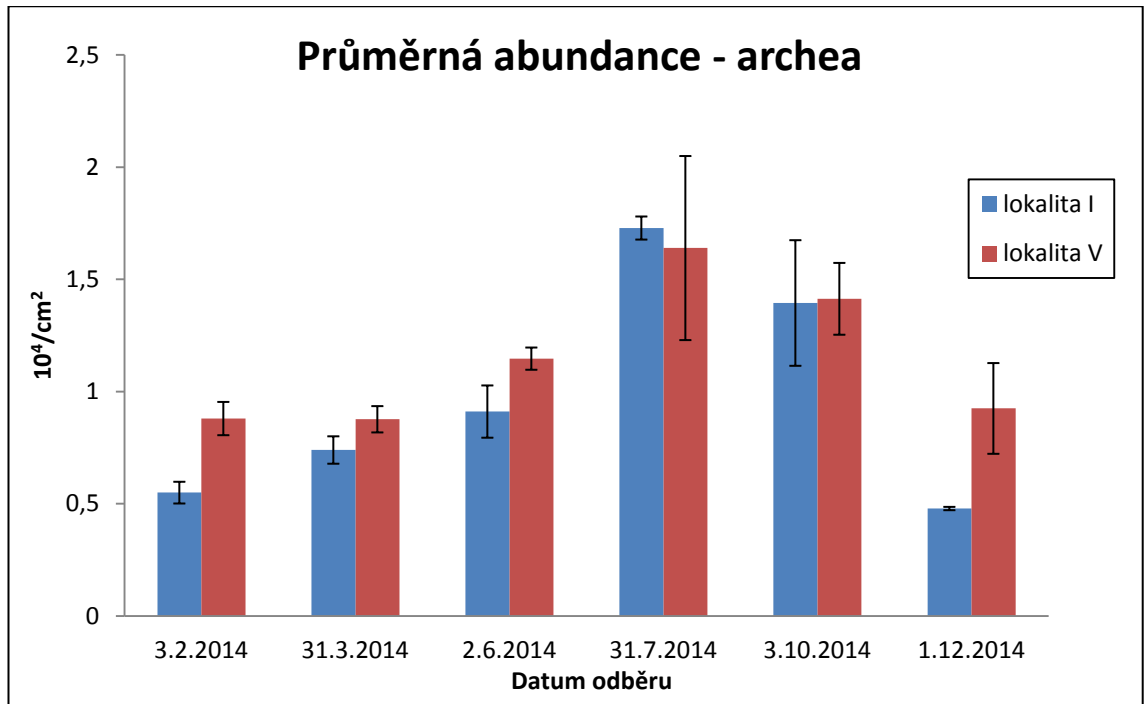
mikrobiální abundance během celé doby inkubace byla na lokalitě I  $8,32 \cdot 10^4/\text{cm}^2 \pm \text{SE} = 1,47 \cdot 10^4/\text{cm}^2$  a na lokalitě V  $5,87 \cdot 10^4/\text{cm}^2 \pm \text{SE} = 0,56 \cdot 10^4/\text{cm}^2$  (obr. 6). Rozdíl mezi mikrobiální abundancí na lokalitě I a lokalitě V je na hranici statistické významnosti ( $t = 1,95$ ,  $p = 0,057$ ).



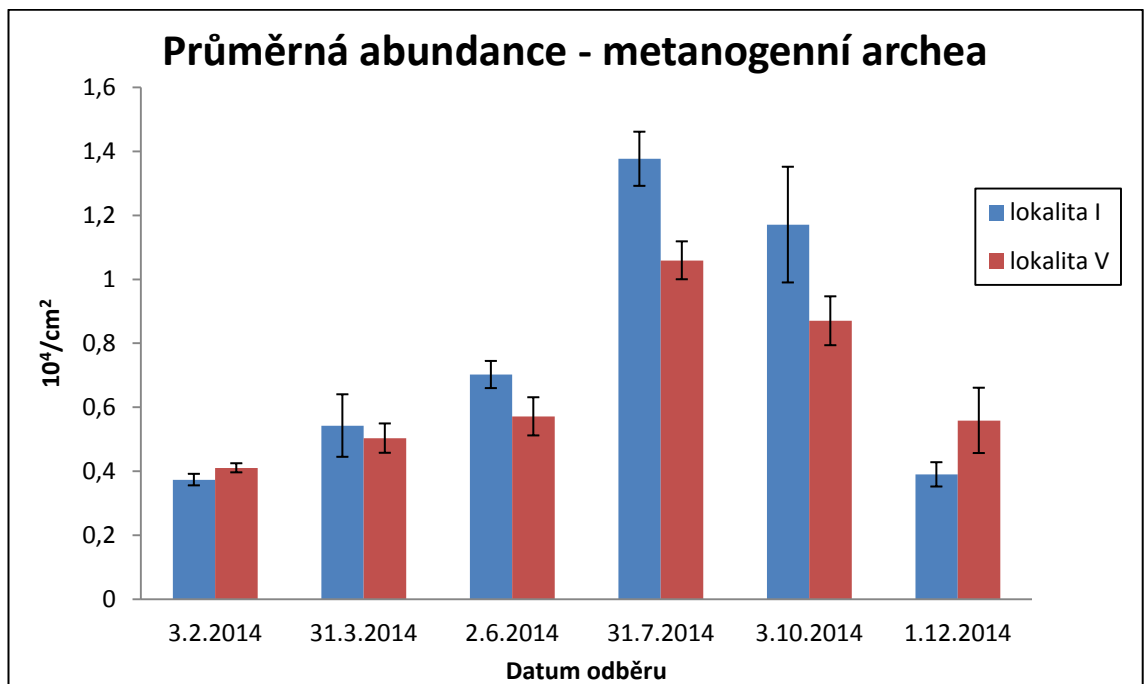
**Obrázek 6:** Průměrná mikrobiální abundance biofilmu na dvou sledovaných lokalitách. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku.

Na obou lokalitách byl detekován výskyt archeí včetně metanogenních archeí. Hodnoty abundance archeí na lokalitě I narůstaly od prvního až do čtvrtého odběru, kdy byla získána nejvyšší hodnota abundance  $1,73 \pm 0,28 \cdot 10^4/\text{cm}^2$ . Během následujících dvou odběrů nastal pokles hodnot. Průměrná hodnota abundance během celého výzkumu byla  $0,97 \pm \text{SE} = 0,18 \cdot 10^4/\text{cm}^2$ . Na lokalitě V byl trend růstu stejný až na téměř nezatelný pokles při druhém odběru. Nejvyšší hodnota byla naměřena při čtvrtém odběru, a to  $1,41 \pm 0,29 \cdot 10^4/\text{cm}^2$ . Průměrná hodnota abundance během celého výzkumu byla  $1,15 \pm \text{SE} = 0,12 \cdot 10^4/\text{cm}^2$  (obr. 7). Nebyl prokázán statisticky signifikantní rozdíl mezi abundancí archeí na lokalitě I a lokalitě V ( $t = -0,75$ ,  $p = 0,472$ ). U abundance metanogenních archeí je vidět na obou lokalitách stejný trend růstu. Hodnoty narůstají již od prvního odběru. Při čtvrtém odběru dosahují maximálních hodnot: lokalita I  $1,38 \pm 0,08 \cdot 10^4/\text{cm}^2$ , lokalita V  $1,06 \pm 0,06 \cdot 10^4/\text{cm}^2$ . Poté dochází k poklesu hodnot abundance. Průměrná hodnota abundance během celého výzkumu byla na lokalitě I  $0,76 \pm \text{SE} = 0,16 \cdot 10^4/\text{cm}^2$ , na lokalitě V  $0,66 \pm \text{SE} =$

$0,09 \cdot 10^4 / \text{cm}^2$  (obr. 8). Nebyl prokázán statisticky signifikantní rozdíl mezi abundancí metanogenních archeí na lokalitě I a lokalitě V ( $t = 0,49$ ,  $p = 0,639$ ).



**Obrázek 7:** Průměrná abundance archeí během celého výzkumu na dvou sledovaných lokalitách. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku.



**Obrázek 8:** Průměrná abundance metanogenních archeí během celého výzkumu na dvou sledovaných lokalitách. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku.

V tabulce 2 je znázorněno procentuální zastoupení archeí a metanogenních archeí během jednotlivých odběrů. U metanogenních archeí, na obou lokalitách, je vidět vzrůstající procentuální zastoupení až do čtvrtého odběru, kdy procento zastoupení dosahuje nejvyšší hodnoty (na lokalitě I  $9,91 \pm 0,61$  % a na lokalitě V  $12,86 \pm 0,72$  %). Poté procentuální zastoupení klesá. U celkových hodnot archeí je taktéž na obou lokalitách vidět vzrůstající procentuální zastoupení. Nejvyšší procento zastoupení na lokalitě I je detekováno při čtvrtém odběru  $12,45 \pm 0,37$  %. Na lokalitě V je tomu již při třetím odběru  $21,34 \pm 0,92$  %. Poté dochází u obou lokalit k poklesu. V rámci porovnávání dvou lokalit je viditelný rozdíl jak u procentuálního zastoupení archeí, tak i metanogenních archeí. Na lokalitě V bylo vždy procentuální zastoupení vyšší: tento rozdíl byl statisticky signifikantní pro celkové zastoupení archeí ( $t = -14,61$ ,  $p < 0,001$ ) i pro metanogenní archea ( $t = -2,87$ ,  $p = 0,017$ ). Průměrná hodnota procentuálního zastoupení archeí během celého výzkumu byla na lokalitě I  $11,5 \pm SE = 0,26$  % a na lokalitě V  $19,46 \pm SE = 0,43$  %. Průměrná hodnota procentuálního zastoupení metanogenních archeí během celého výzkumu byla na lokalitě I  $8,89 \pm SE = 0,38$  % a na lokalitě V  $11,06 \pm SE = 0,57$  %.

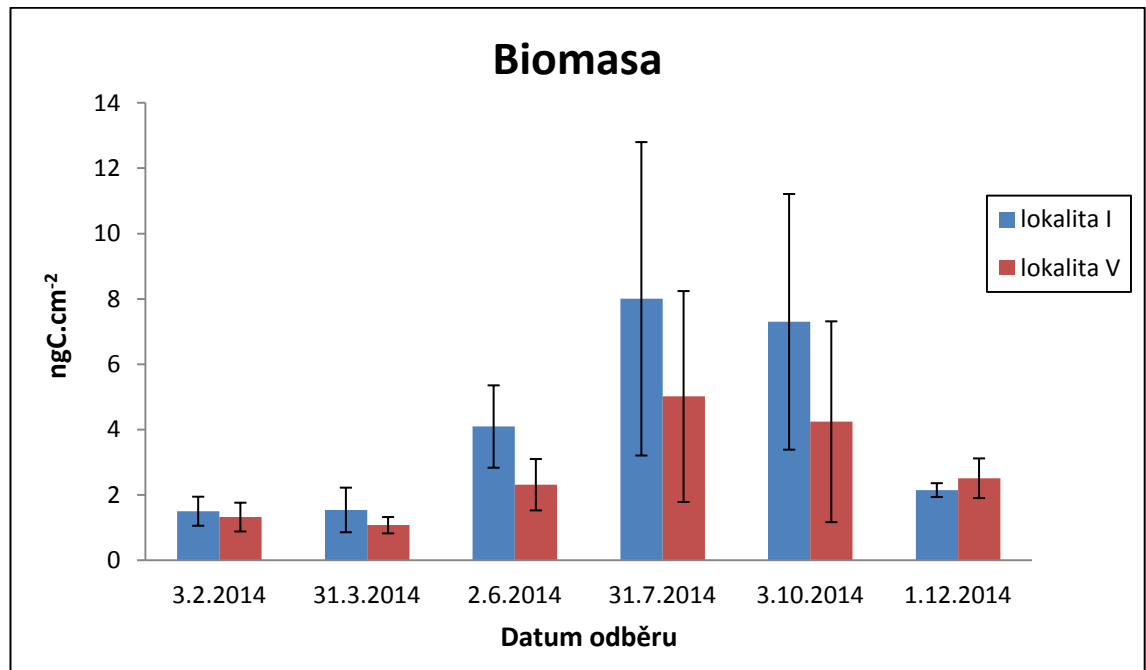
**Tabulka 2.** Procentuální zastoupení archeí (ARCH) a metanogenních archeí (MA) v mikrobiálním společenstvu během jednotlivých odběrů. Pro každý odběr je uveden průměr z pěti naměřených hodnot  $\pm$  SD.

Datum odběru	Lokalita I		Lokalita V	
	ARCH (%)	MA (%)	ARCH (%)	MA (%)
3.2.2014	$10,35 \pm 0,91$	$7,02 \pm 0,34$	$18,05 \pm 1,52$	$8,41 \pm 0,29$
31.3.2014	$11,65 \pm 0,96$	$8,54 \pm 1,54$	$19,28 \pm 1,29$	$11,06 \pm 1,01$
2.6.2014	$11,58 \pm 1,48$	$8,92 \pm 0,54$	$21,34 \pm 0,92$	$10,62 \pm 1,11$
31.7.2014	$12,45 \pm 0,37$	$9,91 \pm 0,61$	$19,91 \pm 4,98$	$12,86 \pm 0,72$
3.10.2014	$11,26 \pm 2,26$	$9,45 \pm 1,46$	$19,6 \pm 2,22$	$12,17 \pm 1,06$
1.12.2014	$11,68 \pm 0,18$	$9,5 \pm 0,93$	$18,57 \pm 4,06$	$11,21 \pm 2,05$

#### 4.4. Stanovení biomasy a biovolumu

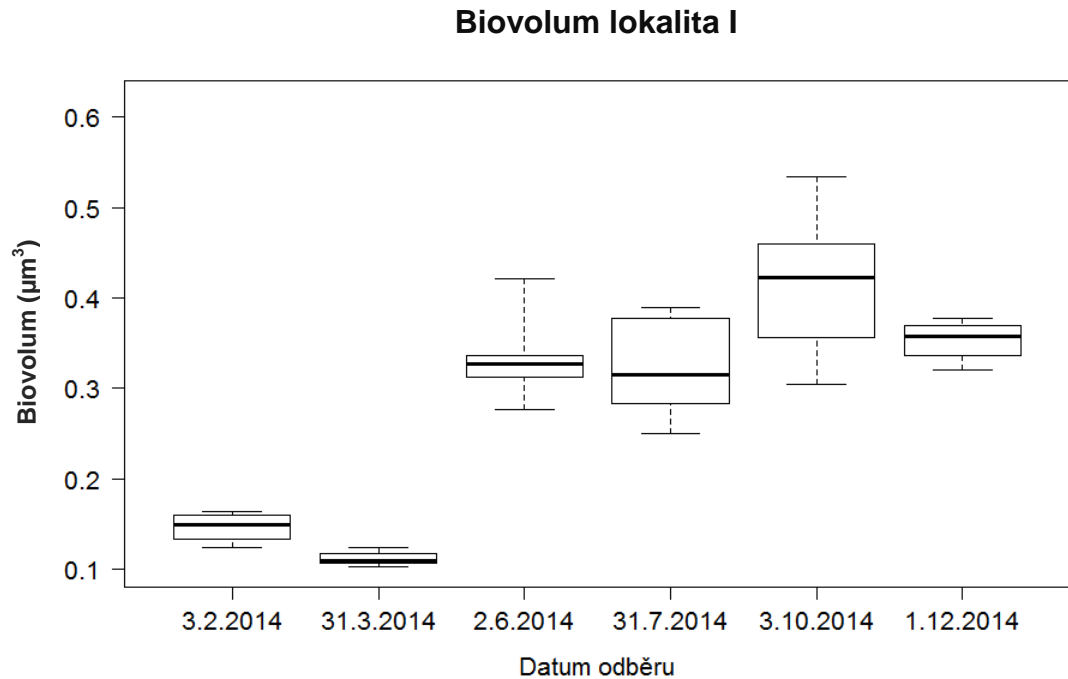
Hodnoty biomasy na lokalitě I i lokalitě V vykazovaly rostoucí trend až do čtvrtého odběru, kdy byly naměřeny nejvyšší hodnoty (na lokalitě I  $8,01 \pm 4,79$  ngC.cm<sup>-2</sup> a na lokalitě V  $5,01 \pm 3,22$  ngC.cm<sup>-2</sup>). Poté došlo k úbytku biomasy, který probíhal u obou lokalit až do konce výzkumu. Průměrná hodnota biomasy během celého sledovaného období byla na lokalitě I  $4,1 \pm SE = 0,77$  ngC.cm<sup>-2</sup>, na lokalitě V  $2,75 \pm SE$

= 0,56 ngC.cm<sup>-2</sup> (obr. 9). Nebyl prokázán statisticky signifikantní rozdíl mezi hodnotami biomasy na lokalitě I a lokalitě V ( $t = 0,99$ ,  $p = 0,342$ ).

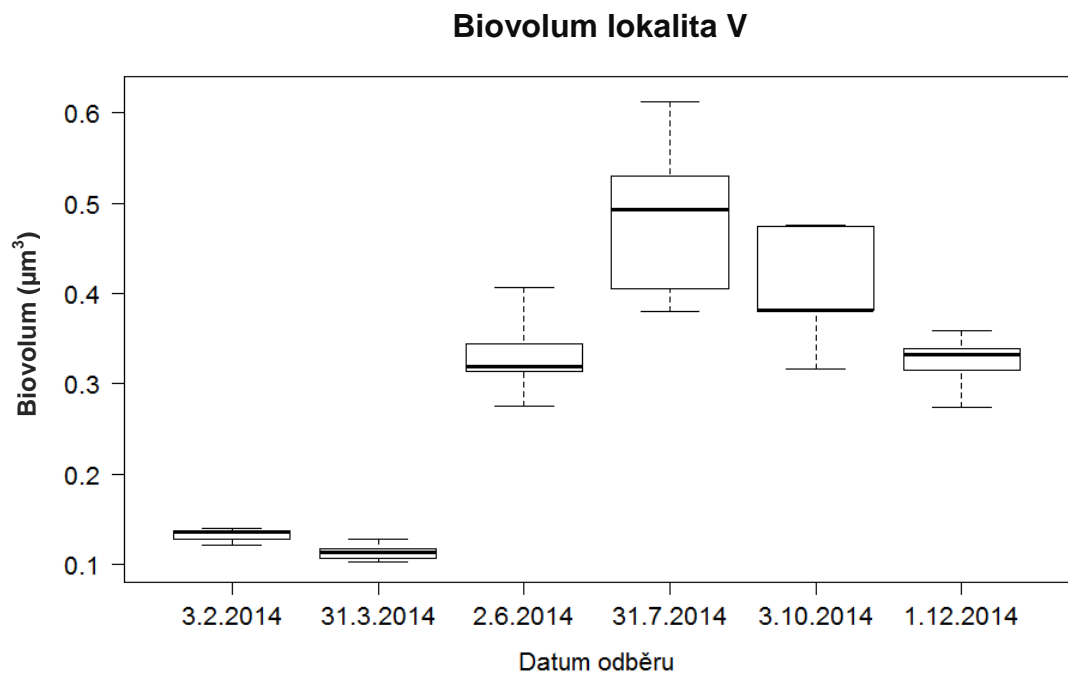


**Obrázek 9:** Bakteriální biomasa biofilmu na dvou sledovaných lokalitách. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku.

Hodnoty biovolumu na lokalitě I vzrůstaly od prvního až do pátého odběru, mimo druhého a čtvrtého, u kterých došlo oproti předešlému odběru k mírnému poklesu. Při pátém odběru byly naměřeny nejvyšší hodnoty (medián 0,42  $\mu\text{m}^3$ ). U posledního odběru došlo k poklesu hodnoty. Průměrná hodnota mediánu biovolumu na lokalitě I během celého výzkumu byla  $0,28 \pm \text{SE} = 0,046 \mu\text{m}^3$  (obr. 10). Na lokalitě V hodnoty biovolumu narůstaly taktéž od prvního odběru, ale oproti lokalitě I jen do čtvrtého odběru, kdy medián dosahoval nejvyšší hodnoty 0,49  $\mu\text{m}^3$ . V následujících odběrech hodnoty klesaly. Stejně jako u lokality I došlo i na lokalitě V při druhém odběru k mírnému snížení hodnoty oproti předešlému odběru. Průměrná hodnota mediánu biovolumu na lokalitě V během celého výzkumu byla  $0,3 \pm \text{SE} = 0,054 \mu\text{m}^3$  (obr. 11). Nebyl prokázán statisticky signifikantní rozdíl mezi hodnotami biovolumu na lokalitě I a lokalitě V ( $t = 0,94$ ,  $p = 0,354$ ).



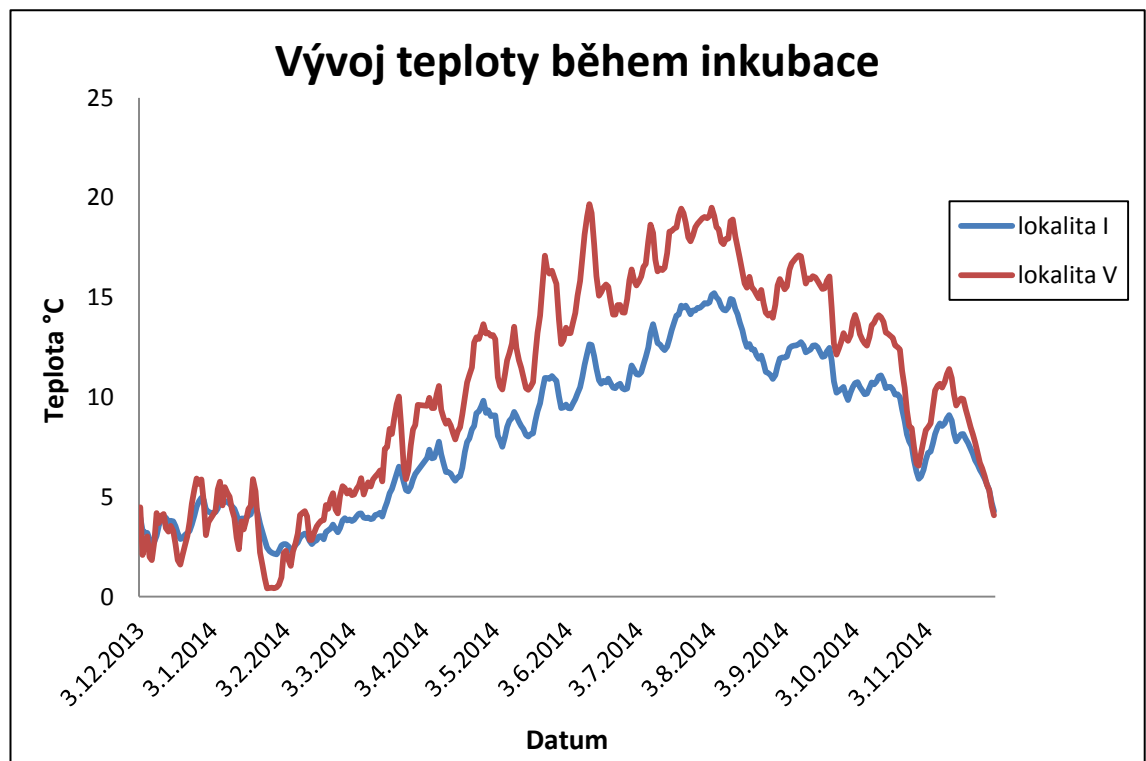
**Obrázek 10:** Buněčný objem (biovolum) pro 1 buňku na lokalitě I během jednotlivých odběrů. Každý odběr sestává z pěti naměřených hodnot. Silná čára značí medián, nad ní a pod ní je horní a dolní kvartil, vousy označují maximální a minimální naměřené hodnoty.



**Obrázek 11:** Buněčný objem (biovolum) pro 1 buňku lokalitě V během jednotlivých odběrů. Každý odběr sestává z pěti naměřených hodnot. Silná čára značí medián, nad ní a pod ní je horní a dolní kvartil, vousy označují maximální a minimální naměřené hodnoty.

#### 4.5. Teplota

Dne 3. 8. 2014 byly na obou lokalitách naměřeny nejvyšší teploty – na lokalitě I 15,11 °C a na lokalitě V 19,5 °C. Průměrně nejteplejší měsíc na lokalitě I byl měsíc červenec s 13,26 °C ± 1,17 °C, nejchladnější byl měsíc prosinec s 3,63 °C ± 0,63 °C. Pro lokalitu V byl nejteplejším měsícem taktéž červenec s 17,71 °C ± 1,18 °C, nejchladnějším byl leden s 3,34 °C ± 1,8 °C. Průměrná roční teplota na lokalitě I byla 8,22 °C ± 3,75 °C, na lokalitě V byla 10,58 °C ± 5,37 °C. Statisticky signifikantně byla prokázána vyšší teplota na lokalitě V ( $t = -6,84$ ,  $p < 0,001$ ) (obr. 12).

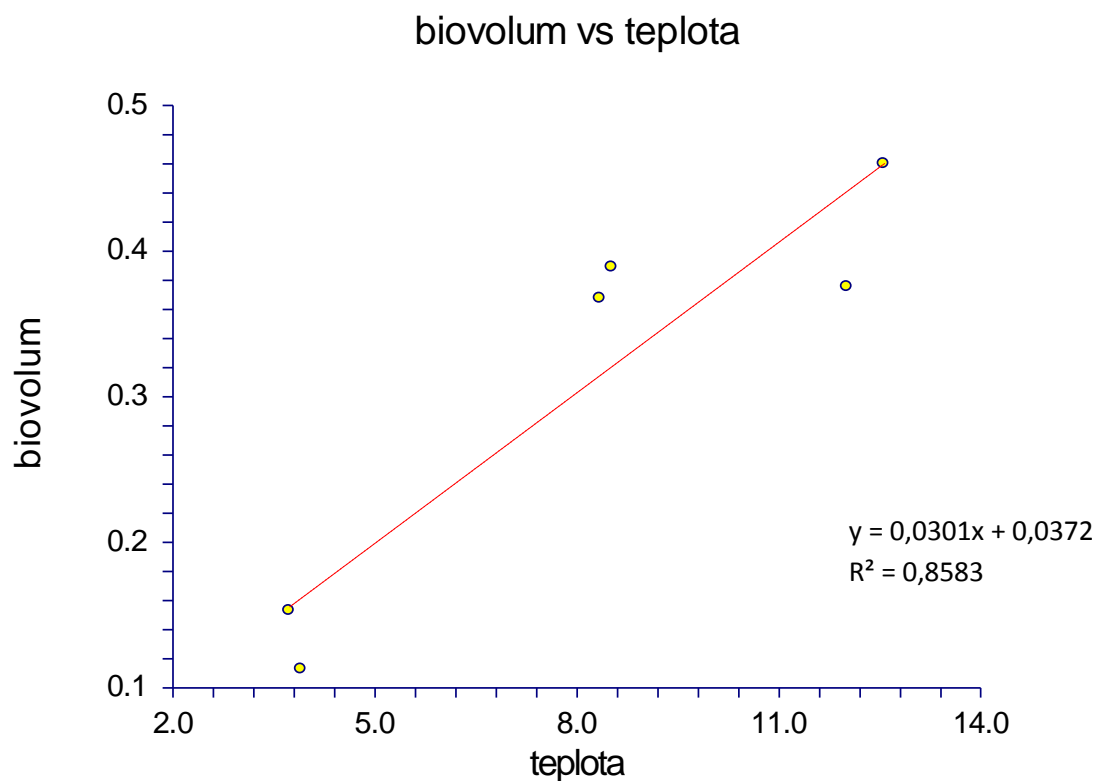


**Obrázek 12:** Vývoj teploty na dvou lokalitách po dobu celé inkubace

#### 4.6. Vztahy mezi parametry a teplotou

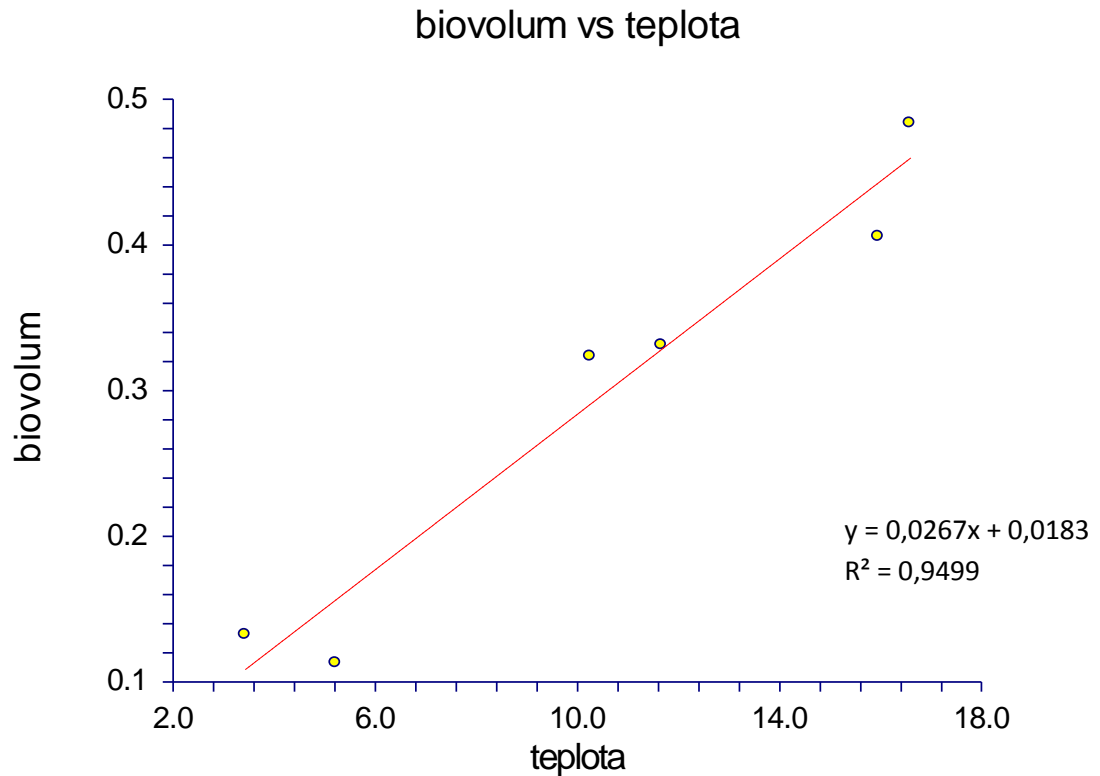
Statisticky signifikantně byl prokázán předpokládaný vztah, korelace, mezi mikrobiální abundancí a biomasou na obou lokalitách, lokalita I ( $t = 7,46$ ,  $p = 0,002$ ) (Příloha 6) a lokalita V ( $t = 7,8$ ,  $p = 0,002$ ) (Příloha 7), biomasou a biovolumem na lokalitě V ( $t = 5,98$ ,  $p = 0,004$ ) (Příloha 8). Dále byla statisticky signifikantně prokázána korelace mezi biomasou a abundancí archeí na obou lokalitách, lokalita I ( $t = 7,01$ ,  $p = 0,02$ ) (Příloha 9), lokalita V ( $t = 6,45$ ,  $p = 0,003$ ) (Příloha 10) a mezi biomasou a abundancí metanogenních archeí taktéž na obou lokalitách, lokalita I ( $t = 9,29$ ,  $p < 0,001$ ) (Příloha 11), lokalita V ( $t = 7,88$ ,  $p = 0,002$ ) (Příloha 12). Také byla

prokázána mezi mikrobiální abundancí a abundancí archeí na obou lokalitách, lokalita I ( $t = 18,36$ ,  $p < 0,001$ ) (Příloha 13), lokalita V ( $t = 11,21$ ,  $p < 0,001$ ) (Příloha 14) i mezi mikrobiální abundancí a metanogenními archeí opět na obou lokalitách, lokalita I ( $t = 17,18$ ,  $p < 0,001$ ) (Příloha 15), lokalita V ( $t = 9,4$ ,  $p < 0,001$ ) (Příloha 16). Dále byla statisticky signifikantně prokázána korelace mezi teplotou a (i) mikrobiální abundancí na lokalitě V ( $t = 3,62$ ,  $p = 0,022$ ) (Příloha 17), (ii) biomasou na obou lokalitách, lokalita I ( $t = 4,6$ ,  $p = 0,01$ ) (Příloha 18) a lokalita V ( $t = 5,93$ ,  $p = 0,004$ ) (Příloha 19), (iii) biovolumem na obou lokalitách, lokalita I ( $t = 4,92$ ,  $p = 0,008$ ) (obr. 13) a lokalita V ( $t = 8,71$ ,  $p = 0,001$ ) (obr. 14), (iv) abundancí archeí na lokalitě V ( $t = 4,34$ ,  $p = 0,012$ ) (Příloha 20) a (v) abundancí metanogenních archeí na obou lokalitách, lokalita I ( $t = 3,03$ ,  $p = 0,039$ ) (Příloha 21) a lokalita V ( $t = 3,24$ ,  $p = 0,032$ ) (Příloha 22).



**Obrázek 13:** Vztah mezi teplotou (°C) a biovolumem (μm<sup>3</sup>) na lokalitě I





**Obrázek 14:** Vztah mezi teplotou (°C) a biovolumem ( $\mu\text{m}^3$ ) na lokalitě V

Na hranici statistické významnosti byla zjištěna korelace mezi teplotou a polysacharidy na lokalitě I ( $t = 2,75$ ,  $p = 0,051$ ), teplotou a mikrobiální abundancí na lokalitě I ( $t = 2,57$ ,  $p = 0,062$ ), teplotou a abundancí archeí na lokalitě I ( $t = 2,58$ ,  $p = 0,061$ ), polysacharidy a abundancí archeí ( $t = 2,46$ ,  $p = 0,069$ ) včetně metanogenních archeí na lokalitě I ( $t = 2,59$ ,  $p = 0,061$ ), množstvím celkového organického uhlíku a abundancí archeí na lokalitě V ( $t = 2,39$ ,  $p = 0,079$ ). Mezi ostatními parametry nebyl statisticky signifikantní vztah prokázán.

## 5. DISKUSE

Cílem této práce bylo porovnat vývoj biofilmu na skleněných kuličkách zakopaných na dvou lokalitách potoku Sitka pomocí zkoumaných parametrů. Dále pak zjistit, zda existují vztahy mezi zjištěnými hodnotami parametrů a naměřenými hodnotami teplot vody. Všechny zkoumané parametry na obou lokalitách vykazovaly podobný růstový trend. Hodnoty parametrů narůstaly až do bodu, kterým byl převážně čtvrtý odběr. Při následných odběrech došlo k poklesu hodnot. Vliv na růst jednotlivých parametrů měla teplota vody. Překvapivým výsledkem bylo prokázání závislosti hodnot biovolumu na teplotě vody. Statisticky signifikantně byla na lokalitě V větší koncentrace polysacharidů, větší relativní zastoupení archeí včetně metanogenních archeí a vyšší teplota vody. Na lokalitě I byla statisticky signifikantně větší mikrobiální abundance.

### 5.1. Polysacharidy

Ke stanovení polysacharidů jsem použila metodu dle Duboise (Dubois et al. 1956). Tato metoda je považována za spolehlivou. Ve své práci tuto metodu použili například Romaní et al. (2008), Proia et al. (2012) a Guo et al. (2014). Nejsou mi známy práce o hyporheickém biofilmu, které by uváděly koncentraci polysacharidů vyjádřenou na plochu. Své výsledky jsem porovnála s pracemi studující biofilm v toku. Upřednostnila jsem však ty, u kterých je využit umělý materiál, abych vyloučila vliv dalších proměnných (zejména živin uvolňujících se ze substrátu (Fischer 2003)). Mé výsledky koncentrace polysacharidů byly výrazně nižší než hodnoty, které získali Romaní et al. (2004) na keramických dlaždicích ve Španělsku (tok Fuirosos). Mé hodnoty koncentrací na lokalitě V po prvním odběru (tzn. po 63 dnech inkubace) byly nižší než koncentrace získané ze skleněných dlaždic po 60 dnech (Artigas et al. 2012) nebo po 52 dnech (Proia et al. 2012) inkubace v toku Fuirosos. Zároveň mé hodnoty byly vyšší než v toku Walzbach, který se nachází v Německu (Artigas et al. 2012). Tyto rozdíly mohou být způsobeny různými teplotami v daných oblastech, různým obsahem živit rozpuštěných ve vodě nebo jinými faktory. Potok Sitka se nachází v klimaticky chladnější oblasti než potoky Fuirosos a Walzbach, teplota zde tedy nejspíš pozorovaný rozdíl nezpůsobila. Nabízí se proto vysvětlení vlivem rozpuštěných živin nebo typu povrchu, na kterém byl biofilm inkubován. Podle Meyer et al. (1987) a De Troch et al. (2006) narůstají biofilmy lépe na menších částicích. V úvahu bychom mohli brát i vliv světla v návaznosti s výskytem řas, které produkují polysacharidy. V podmínkách

dostatečného světla totiž tvoří řasy společně s extracelulární polymerní matricí dominantní složku biomasy biofilmu (Rulík et al. 2011). Možné je i kombinované působení uvedených faktorů.

## 5.2. Celkový organický uhlík

Výsledky celkového organického uhlíku jsem porovnávala s výzkumem Rulík et al. (2007). Hodnoty mnou naměřené při třetím odběru (tzn. po šesti měsících) byly o 1–2 řády vyšší na obou lokalitách než hodnoty, které získali Rulík et al. 2007 z hyporheického biofilmu inkubovaném na šterku o průměru 22 mm po 6 měsících inkubace. Své vyšší hodnoty celkového organického uhlíku přisuzuji vlivu velikosti částic, který je již výše uveden. Vliv uvolňujících se živin z přírodního substrátu (Fischer 2003) a tím i pádem i rychlejší růst zde nemůžeme brát v úvahu.

Získané hodnoty procentuálního zastoupení jednotlivých složek celkového organického uhlíku jsem porovnávala s výsledky Koutný a Rulík (2007). Jak procentuální zastoupení polysacharidů v celkovém organickém uhlíku na lokalitě V, tak převládající neidentifikovaná složka na obou lokalitách byly podobné s touto prací. Procentuální zastoupení složky uhlíku, kterou tvoří bakterie, je vyšší, než uvádí Rulík a Koutný (2007).

## 5.3. Abundance

Hodnoty mikrobiální abundance, ke kterým jsem ve své práci dospěla, byly nižší než publikované hodnoty Rulík et al. (2007). Tyto hodnoty byly získány ze skleněných kuliček o průměru 22 mm inkubovaných ve dně vodního toku a byly o 1–2 řády na plochu  $\text{cm}^2$  vyšší (Rulík et al. 2007). Za předpokladu tvrzení, kdy na menších částicích substrátu se nachází větší počet bakterií (Meyer et al. 1987, De Troch et al. 2006, Santmire a Leff 2007), bych měla dospět k opačnému výsledku, jelikož mé kuličky byly jen o průměru 5 mm. To se však nestalo. Podobný trend růstu abundance v závislosti na teplotě jako já zaznamenal ve své práci na velmi drobných skleněných kuličkách inkubovaných ve dně toku Bärlocher a Murdoch (1989). Mé hodnoty byly opět nižší o 1–2 řády na plochu  $\text{cm}^2$ . Zde už ale srovnání souhlasí se zmíněným předpokladem vyšší abundance na menších částicích. Mnou získané výsledky byly podobné s výsledky Claret (1998), která zkoumala tvorbu biofilmu na sklíčkách umístěných v sedimentu vodního toku. Avšak hodnoty abundance v citované práci byly dosaženy během několika dní, hodnoty abundance mnou uvedené jsou získány

několikaměsíční inkubací. Jako možnou příčinu nízkých hodnot bych usuzovala na skrytou chybu během laboratorního zpracování vzorků, např. nedostatečná účinnost sonikace.

V porovnání se studii tvorby biofilmu provedenými volně v toku byly mé výsledky opět nižší. Hodnot abundance v řádu  $10^5$  dosahovali ve své práci na přírodním substrátu Kröpfel et al. (2006). Tyto hodnoty byly získány po 6 týdnech inkubace. V tomto kontextu by se dalo usuzovat, že na výsledky má vliv materiál, na kterém se biofilm vytváří. Na přírodním substrátu biofilm roste rychleji než na umělém (Rulík et al. 2007) v důsledku vyplavování minerálních živin (Fischer 2003). Romaní a Sabater (1999), kteří zkoumali tvorbu biofilmu na keramických dlaždicích, došli k výsledkům v řádu  $10^{10}$  po 60 dnech výzkumu.

#### **5.4. Relativní zastoupení archeí a metanogenních archeí**

Své výsledky procentuálního zastoupení jsem porovnávala s pracemi Buriánková et al. (2012) a Brablcová et al. (2015), které porovnávaly jednotlivé lokality potoku Sitka. Mnou naměřené zastoupení metanogenních archeí na obou lokalitách a archeí na lokalitě I bylo přibližně o 3 procentní body vyšší, než uvádí Brablcová et al. (2015). Mé zastoupení archeí na lokalitě V bylo nižší přibližně o 6 procentních bodů, než je uvedeno v citované práci. Výsledky mých hodnot procentuálního zastoupení archeí a metanogenních archeí se pohybovaly v rozmezí, které uvádí Buriánková et al. (2002). Obecně větší procentuální zastoupení na lokalitě V je zřejmé jak z mých výsledků, tak i v práci Brablcová et al. (2015)

Při porovnání mých výsledků s jinými studii byly hodnoty procentuálního zastoupení archeí na lokalitě I podobné jako hodnoty v sedimentu toku Bystřice nacházející se poblíž Olomouce (Brablcová et al. 2013). Jiné studie z vodních toků uvádějící relativní zastoupení archeí a metanogenních archeí patrně neexistují, proto jsem čerpala i z prací provedených v jiných ekosystémech. Ve srovnání s těmito studii bylo mé procentuální zastoupení archeí větší než procentuální zastoupení na sedimentu jezera Rotsee ve Švýcarsku (Zepp-Falz et al. 1999), jezera Grosse Fuchskuhle v Německu (Casper et al. 2003) nebo na půdě sibiřské tundry (Kobabe et al. 2004).

Významným zjištěním byla detekce metanogenních archeí na obou lokalitách již během prvního odběru. Metanogenní archea vyžadují k růstu specifické podmínky, kterými jsou anoxické prostředí s extrémně nízkým redoxním potenciálem. Detekce, již

při prvním odběru poukazuje na ideální prostředí pro metanogeny, které vykazují obě lokality.

### 5.5. Biomasa a biovolum

Získané hodnoty byly výrazně nižší v porovnání s biomasou nacházející se na kamenech nebo na kořenech pod vodní hladinou toku Bystřice (Brablcová et al. 2013). Mé hodnoty se pohybovaly v jednotkách nanogramů uhlíku na plochu  $\text{cm}^2$ , hodnoty Brablcové et al. (2013) v jednotkách mikrogramů uhlíku na plochu  $\text{cm}^2$  – to znamená rozdíl o tři řády. Na nízkých hodnotách se velmi pravděpodobně podílel vliv substrátu, jehož význam je již dříve uveden.

Rozpětí mnou naměřených hodnot biovolumu bylo užší než rozpětí 0.008–1.46  $\mu\text{m}^3$  sedimentu toku Sitka (Koutný a Rulík 2007) a než 0.01–3.0  $\mu\text{m}^3$  sedimentu toku Bystřice (Brablcová et al. 2013). Zároveň však mnou naměřené průměrné hodnoty byly vyšší než u předešlých dvou. Rozpětí mých hodnot biovolumu bylo podobné s prací Šestanović et al. (2005) ze sedimentu Kaštelského zálivu (Jaderského moře), ale průměrná hodnota biovolumu zde byla opět nižší než mnou zjištěná průměrná hodnota. Užší rozpětí v hodnotách biovolumu (od 0.07 do 0.22  $\mu\text{m}^3$ ) a nižší průměrnou hodnotu zaznamenali v sedimentu Tokijského zálivu Kuwae a Hosokawa (1999).

### 5.6. Vztah mezi parametry a teplotou

Na základě získaných vztahů jsem dospěla k následujícím závěrům. S rostoucí mikrobiální abundancí narůstá biomasa. Narůstá i abundance archeí včetně metanogenních archeí. Velký význam na všechny tyto parametry má teplota. Teplota je považována za klíčový parametr řídící aktivitu a růst všech mikroorganismů (Sjöstedt et al. 2012). V mé práci byla také překvapivě zjištěna korelace mezi teplotou a biovolumem. Je zajímavé, že sezónní studie vykazují odlišný vztah teploty a biovolumu. Studie provedená v severním Baltickém moři poukazuje na to, že buňky dosahují většího objemu při nižších teplotách (Andersson et al. 1986). K opačnému závěru dospěli ve své práci Albright a McCrae (1987) na kanadském východním pobřeží nebo Ribes et al. (1999) v severozápadním Středozemním moři. Naproti tomu La Ferla et al. (2012) ve svém výzkumu ve Středozemním moři neprokázali vliv teploty na objem buňky. Ve sladkých vodách prozatím o vlivu teploty na biovolum není mnoho známo. Chrzanowski (1985) a Chrzanowski et al. (1988) poukazují na negativní závislost biovolumu na růstu teploty. Objevuje se i neprůkaznost vlivu teploty

na biovolum (Sime-Ngando et al. 1991). Mnou zjištěný vztah se shoduje s Albright a McCrae (1987) a Ribes et al. (1999). Na růst biovolumu ovšem mohou mít vliv i jiné faktory než jen teplota vody. Těmito faktory mohou být například množství živin (Young 2007) nebo predace (Andersson et al. 1986). Do budoucna by určitě stálo za uvážení se této problematice dále věnovat.

### **5.7. Porovnání lokality I a V**

U všech zkoumaných parametrů na obou lokalitách je vidět podobný růstový trend. Hodnoty nejdříve narůstají (mimo pár výkyvů, které mohou být způsobené nějakou skrytou proměnnou) až do bodu, kterým byl převážně čtvrtý odběr (u polysacharidů na lokalitě V to byl třetí odběr, u biovolumu a celkového organického uhlíku na lokalitě I to byl pátý odběr). V následujících odběrech docházelo k postupnému poklesu hodnot jednotlivých parametrů. Hlavním důvodem tohoto poklesu je dle mého názoru rozpad biofilmu, který byl způsoben dosažením kritického množství buněk a masy biofilmu (Rulík et al. 2011). Pokud by se jednalo o autotrofní biofilm, v mém případě tomu však nebylo, souvisel by tento růstový trend s vývojem řas. Největší nárůst autotrofního biofilmu probíhá během jara a léta, kdy jeho zásobní produkty dosahují maxima (Blenkinsopp et al. 1991). Vysvětlením toho trendu u heterotrofního biofilmu by mohla být přítomnost rozsivek v hyporheické zóně potoku Sitka (Rulík et al. 2007).

Při porovnávání hodnot parametrů mezi lokalitou I a V bylo statisticky signifikantně zjištěno větší množství polysacharidů na lokalitě V. Rozdíl mezi hodnotami mikrobiální abundance se nacházel na hranici statistické významnosti. Pokud budeme tyto výsledky brát v úvahu, byly hodnoty větší na lokalitě I. Ke stejnému tvrzení došli Brablčová et al. (2015). Hodnoty relativního zastoupení jak archeí, tak i metanogenních archeí byly opět větší na lokalitě V. Vyšší hodnoty parametrů na lokalitě V se dají přisuzovat většímu množství živin, které se na lokalitě nachází (viz tabulka 1) a prokázané vyšší hodnotě teploty na lokalitě. Rozdílnost teplot vody na lokalitě I a V uvádí i Rulík et al. (2013).

Na základě vyhodnocení všech výsledků a provedení statistických analýz nemohu jednoznačně určit lokalitu, na které bylo biofilmu více nebo která by byla vhodnější pro vývoj biofilmu. Mohu však konstatovat, že lokality se od sebe liší teplotou vody, koncentrací polysacharidů, mikrobiální abundancí a relativním zastoupením archeí včetně metanogenních archeí.

## 6. SOUHRN

Hyporheické biofilmy jsou základní součástí ekosystému vodních toků a mají nezastupitelnou roli v procesu říčního samočištění. Cílem této práce bylo porovnat tvorbu biofilmu na skleněných kuličkách o průměru 5 mm zakopaných na dvou lokalitách (lokalita I a lokalita V) potoku Sitka. Dalším cílem této práce bylo zjistit, zda existují vztahy mezi hodnotami jednotlivých parametrů a naměřenými hodnotami teploty vody.

Začátkem prosince roku 2013 byly na dvou vybraných lokalitách do dna potoku Sitka zakopány do hloubky 10 cm polyethylenové lahvičky. Lahvičky obsahovaly vždy 500 skleněných kuliček, které sloužily jako umělý substrát pro vývoj biofilmu. Celkem 35 lahviček na každé lokalitě bylo inkubováno do prosince roku 2014. Každé dva měsíce probíhal odběr, při kterém bylo odebráno vždy 5 lahviček z každé lokality. Na každé lokalitě bylo také umístěno teplotní čidlo (datalogger Minikin), které zaznamenávalo teploty vody po celou dobu výzkumu. Na kuličkách z každé lahvičky bylo prováděno stanovení koncentrace polysacharidů, množství celkového organického uhlíku, mikrobiální abundance, relativního zastoupení archeí včetně metanogenních archeí, biomasy a biovolumu. Většina parametrů byla vyjádřena na plochu  $\text{cm}^2$ . Po následném vyhodnocení výsledků byl u všech parametrů na obou lokalitách pozorován stejný růstový trend. Hodnoty všech parametrů narůstaly až do bodu, kterým byl převážně čtvrtý odběr (31. 7. 2014). Při následných odběrech docházelo k poklesu hodnot jednotlivých parametrů. Tento pokles byl zřejmě způsoben rozpadem biofilmu zapříčiněným dosažením kritického množství buněk a masy biofilmu.

Dle výsledků statistické analýzy dat se nedá určit, která ze dvou lokalit byla vhodnější pro vývoj biofilmu nebo na které bylo biofilmu více. Statisticky signifikantně byla na lokalitě V větší koncentrace polysacharidů, větší relativní zastoupení archeí včetně metanogenních archeí a vyšší teplota vody. Na lokalitě I byla statisticky signifikantně větší mikrobiální abundance. Ze zjištěných vztahů plynou následující závěry. S rostoucí mikrobiální abudancí narůstá i biomasa biofilmu. S nárůstem mikrobiální abundance souvisí i nárůst abundance archeí včetně metanogenních archeí. Významný vliv na zkoumané parametry má teplota. Závislost růstu biovolumu na teplotě by si určitě zasloužila větší pozornost. Ve sladkých vodách o této závislosti není mnoho známo a výsledky jednotlivých prací se neshodují.

## 7. LITERATURA

- Ainsworth A. M., Goulder R. (2000): Downstream change in leucine aminopeptidase activity and leucine assimilation by epilithic microbiota along the River Swale, northern England. *Sci. Total Environ.*, 251/252: 191–204.
- Albright L. J., McCrae S. K. (1987): Annual cycle of bacterial specific biovolumes in Howe Sound, a Canadian west coast fjord sound. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 2739–2744.
- Andersson A., Larsson U., Hagström A. (1986): Size-selective grazing by microflagellates on pelagic bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 33: 51–57.
- Artigas J., Fund K., Kirchen S., Morin S., Obst U., Romani A. M., Sabater S., Schwartz T. (2012): Patterns of biofilm formation in two streams from different bioclimatic regions: analysis of microbial community structure and metabolism. *Hydrobiologia*, 695: 83–96.
- Azeredo J., Lazarova V., Oliveira R. (1999): Methods to extract the exopolymeric matrix from biofilms: a comparative study. *Wat. Sci. Tech.*, 39, 7: 243–250.
- Bärlocher F., Murdoch J. H. (1989): Hyporheic biofilms – a potential food source for interstitial animals. *Hydrobiologia*, 184: 61–67.
- Blenkinsopp S. A., Gabbott P. A., Freeman C., Lock M. A. (1991): Seasonal trends in river biofilm storage products and electron transport system activity. *Freshwat. Biol.*, 26: 21–34.
- Boulton A. J., Findlay S., Marmonier P., Stanley E. H., Valett H. M. (1998): The functional significance of the hyporheic zone in streams and rivers. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29: 59–81.
- Boulton A. J. (2007): Hyporheic rehabilitation in rivers: restoring vertical connectivity. *Freshwat. Biol.* 52, 632–650.
- Brabcová L., Buriánková I., Badurová P., Rulík M. (2013): The phylogenetic structure of microbial biofilms and free-living bacteria in a small stream. *Folia Microbiol.*, 58: 235–243.



- Brablcová L., Buriánková I., Badurová P., Chaudhary P. P, Rulík M. (2015): Methanogenic archaea diversity in hyporheic sediments of a small lowland stream. *Anaerob.*, 32: 24-31.
- Branda S. S., Vik A., Friedman L., Kolter R. (2005): Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.*, 13, 1: 20–26.
- Buriánková I., Brablcová L., Mach V., Hýblová A., Badurová P., Cupalová J., Čáp L., Rulík M. (2012): Methanogens and methanotrophs distribution in the hyporheic sediments of a small lowland stream. *Fundam. Appl. Limnol.*, 181/2: 87–102.
- Casper P., Chan O. C., Furtado A. L. S., Adams, D. D. (2003): Methane in an acidic bog lake: The influence of peat in the catchment on the biogeochemistry of methane. *Aquat. Sci.*, 65: 36–46.
- Claret C. (1998): A Method Based on Artificial Substrates to Monitor Hyporheic Biofilm Development. *Internat. Rev. Hydrobiol.*, 83: 135–143.
- Comte S., Guibaud G., Baudu M. (2006): Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation properties. Part I. Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods. *Enzyme Microb. Technol.*, 38: 237–247.
- Costerton J. W. (2004): A short history of the development of the biofilm concept. In: *Microbial Biofilms*, Ghannoum M.A., O'Toole (eds.), ASM Press, Washington, DC.
- D'Abzac P., Bordas F., Van Hullebusch E., Lens P. N. L., Guibaud G. (2010): Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from anaerobic granular sludges: comparison of chemical and physical extraction protocols. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85: 1589–1599.
- De Troch M., Houthoofd L., Chepurnov V., Vanreusel A. (2006): Does sediment grain size affect diatom grazing by harpacticoid copepods? *Mar. Env. Res.*, 61: 265–277.
- Donlan R. M., Costerton J. W. (2002): Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15: 167–193.

- Dubois M, Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. (1956): Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28: 350–356.
- Findlay S., Sinsabaugh R. L. (2003): Response of hyporheic biofilm metabolism and community structure to nitrogen amendments. *Aquat. mikrob. ecol.*, 33: 127–136.
- Fischer H. (2003): The role of biofilms in the uptake and transformation of dissolved organic matter. In: *Aquatic ecosystems: Interactivity of dissolved organic matter*, Findlay S. E. G., Sinsabaugh R. L. (eds.), Academic Press, USA.
- Fischer H., Kloep F., Wilczek S., Pusch M. T. (2005): A river's liver – microbial processes within the hyporheic zone of a large lowland river. *Biogeochemistry*, 76: 349–371.
- Flemming H. C., Wingender J. (2010): The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microb.*, 8: 623–633.
- Frølund B., Palmgren R., Keiding K., Nielsen P. H. (1996): Extraction of extracellular polymers from activated sludge using cation exchange resin. *Water Res.*, 30: 1749–1758.
- Garcia L., Patel B. K. C., Ollivier B. (2000): Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe*, 6: 205–226.
- Guo X., Liu J., Xiao B. (2014): Evaluation of the damage of cell wall and cell membrane for various extracellular polymeric substance extractions of activated sludge. *Journal of Biotech.*, 188: 130–135.
- Hall-Stoodley L., Stoodley P. (2002): Developmental regulation of microbial biofilms. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13: 228–233.
- Hancock P. J., Boulton A. J., Humphreys W. F. (2005): Aquifers and hyporheic zones: Towards an ecological understanding of groundwater. *Hydrogeol. J.*, 13: 98–111.
- Hintze J. (2009): NCSS. NCSS, LLC. Kaysville, Utah. Dostupné online: <http://www.ncss.com>.

- Horáková M., Lischke P., Grunwald A. (1989): Chemické a fyzikální metody analýzy vod. SNTL, Praha.
- Chrzanowski T. H. (1985): Seasonality, abundance, and biomass of bacteria in a southwestern reservoir. *Hydrobiolog.*, 127: 117–123.
- Chrzanowski T. H., Crotty R. D., Hubbard G. J. (1988): Seasonal variation in cell volume of epilimnetic bacteria. *Microb. Ecol.*, 16: 155–163.
- Jahid I. K., Ha S. D. (2012): A Review of Microbial Biofilms of Produce: Future Challenge to Food Safety. *Food Sci. Biotechnol.*, 21(2): 299–316.
- Jenkinson H. F., Lappin-Scott H. M. (2001): Biofilms adhere to stay. *Trends Microbiol.*, 9: 9–10.
- Jupraputtasri W., Boonapatcharoen N., Cheevadhanarak S., Chaiprasert P., Tanticharoen M., Techkarnjanaruk S. (2005): Use of an alternative archaea-specific probe for methanogen detection. *J. Microbiol. Meth.*, 61: 95–104.
- Karunakaran E., Mukherjee J., Ramalingam B., Biggs C. A. (2011): Biofilmology: a multidisciplinary review of the study of microbial biofilms. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 90: 1869–1881.
- Kawanishi R., Inoue M., Dohi R., Fujii A., Miyake Y. (2013): The role of the hyporheic zone for a benthic fish in an intermittent river: a refuge, not a graveyard. *Aquat. Sci.*, 75: 425–431.
- Kobabe S., Wagner D., Pfeifer E. M. (2004): Characterisation of microbial community composition of a Siberian tundra soil by fluorescence in situ hybridization. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 50: 13–23.
- Koutný J., Rulík M. (2007): Hyporheic Biofilm Particulate Organic Carbon in a Small Lowland Stream (Sitka, Czech Republic): Structure and Distribution. *Internat. Rev. Hydrobiol.*, 92: 402–412.
- Kröpfl K., Vladár P., Szabó K., Ács É., Borsodi A. K., Szikora S., Caroli S., Záray G. (2006): Chemical and biological characterisation of biofilms formed on different substrata in Tisza river (Hungary). *Environ. Pollut.* 144: 626- 631.

- Kuwae T., Hosokawa Y. (1999): Determination of Abundance and Biovolume of Bacteria in Sediments by Dual Staining with 49,6-Diamidino-2-Phenylindole and Acridine Orange: Relationship to Dispersion Treatment and Sediment Characteristics. *Appl. Envir. Microb.*, 65: 3407–3412.
- La Ferla R., Maimone G., Azzaro M., Conversano F., Brunet C., Cabral A.S., Paranhos R. (2012): Vertical distribution of the prokaryotic cell size in the Mediterranean Sea. *Helgol. Mar. Res.*, 66: 635–650.
- Laspidou C. S., Rittmann B. E. (2002): A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water Res.*, 36, 11: 2711–2720.
- Liu H., Fang H. H. P. (2002): Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *Biotechnol.*, 95: 249–256.
- Liu Y, Whitman W. B. (2008): Metabolic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of the Methanogenic Archaea. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1125: 171–189.
- Lock M. A. (1993): Attached microbial communities in river. In: *Aquatic mikrobiology: an ecological approach*. Ford T. E. (ed.), Blackwell, Oxford.
- Mack W. N., Mack J. P., Ackerson A. O. (1975): Microbial film development in a trickling filter. *Microb. Ecol.*, 2: 215–216.
- Meyer J. L., Edwards R. T., Risley R. (1987): Bacterial growth on dissolved organic carbon from a blackwater river. *Microb. Ecol.*, 13: 13–29.
- Pal A., Paul A. K. (2008): Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation. *Indian J. Microbiol.*, 48: 49–64.
- Pernthaler J., Glöckner F. O., Schönhuber W., Amann R. I. (2001): Fluorescence in situ hybridization. In: *Methods in Microbiology: Marine Microbiology*, Paul J. (ed.), Academic Press Ltd, London.
- Porter J., Feig Y. (1980): The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, 25, 5: 943–948.

- Proia L., Romani' A. M., Sabater S. (2012): Nutrients and light effects on stream biofilms: a combined assessment with CLSM, structural and functional parameters. *Hydrobiol.*, 695: 281–291.
- R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Dostupné online: <http://www.R-project.org/>.
- Ramasamy P., Zhang X. (2005): Effects of shear stress on the secretion of extracellular polymeric substances in biofilms. *Water Sci. Technol.*, 52: 217–223.
- Raskin L., Stromley J. M., Rittmann B. E., Stahl D. A. (1994): Group-specific 16SrRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Appl. Environ. Microb.*, 60, 4: 1232–1240.
- Ribes M., Coma R., Gili J. (1999): Seasonal variation of particulate organic carbon, dissolved organic carbon and the contribution of microbial communities to the live particulate organic in a shallow near-bottom ecosystem at the Northwestern Mediterranean Sea. *J. Plankton Res.*, 21: 1077–1100.
- Romani' A. M., Sabater S. (1999): Effect of primary producers on the heterotrophic metabolism of a stream biofilm. *Freshw. Biol.*, 41: 729–736.
- Romani' A. M., Giorgi A., Acuna V., Sabater S. (2004): The influence of substratum type and nutrient supply on biofilm organic matter utilization in streams. *Limnol. Oceanogr.*, 49, 5: 1713–1721.
- Romani' A. M., Fund K., Artigas J., Schwarz T., Sabater S., Obst U. (2008): Relevance of Polymeric Matrix Enzymes During Biofilm Formation. *Microb. Ecol.*, 56: 427–436.
- Romani' A. M. (2010): Freshwater Biofilms. In: *Biofouling*, Dürr S., Thomason J. C. (eds.), Blackwell Publishing, Oxford.
- Romani' A. M., Amalfitano S., Artigas J., Fazi S., Sabater S., Xisca Timoner X., Ylla I., Zoppini A. (2013): Microbial biofilm structure and organic matter use in mediterranean streams. *Hydrobiolog.*, 719: 43–58.

- Rulík M., Výtisková M., Pouličková A. (2007): Is there a Difference between Surface Stream and Hyporheic Zone Biofilms? *Acta Univ. Carol., Environ.*, 21: 133–141.
- Rulík M., Holá V., Růžička F., Votava M. a kol. (2011): *Mikrobiální biofilmy*. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- Rulík M., Bednařík A., Mach V., Brablcová L., Buriánková I., Badurová P., Grátzová K. (2013): Methanogenic System of a Small Lowland Stream Sitka, Czech Republic. In: *Biomass Now – Cultivation and utilization*, Matovic M. D. (ed.), InTech, Rijeka.
- Sabater S., Romaní A. M. (1996): Metabolic changes associated with biofilm formation in an undisturbed Mediterranean stream. *Hydrobiologia*, 335: 107–113.
- Santmire J. A., Leff L. G. (2007): The influence of stream sediment particle size on bacterial abundance and community composition. *Aquat. Ecol.*, 41: 153–160.
- Sedláček I. (2007): *Taxonomie prokaryot*. Masarykova univerzita, Brno.
- Sheng G. P., Yu H. Q., Li X. Y. (2010): Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. *Biotechnol. Adv.*, 28: 882–894.
- Schindler J. (2008): *Ze života bakterií*. Academia, Praha.
- Sime-Ngando T., Bourdier G., Amblard C., Pinel-Alloul B. (1991): Short-term variations in specific biovolumes of different bacterial forms in aquatic ecosystems. *Microb. Ecol.*, 21: 211–226.
- Sjöstedt J., Hagström A., Ulla Li Zweifel U. L. (2012): Variation in cell volume and community composition of bacteria in response to temperature. *Aquat. Microb. Ecol.*, 66: 237–246.
- Stoodley P., Sauer K., Davies D. G., Costerton J. W. (2002): Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.*, 56: 187–209.
- Storey R. G., Fulthorpe R. R., Williams D. D. (1999): Perspectives and predictions on the microbial ecology of the hyporheic zone. *Freshw. Biol.* 41: 119–130.

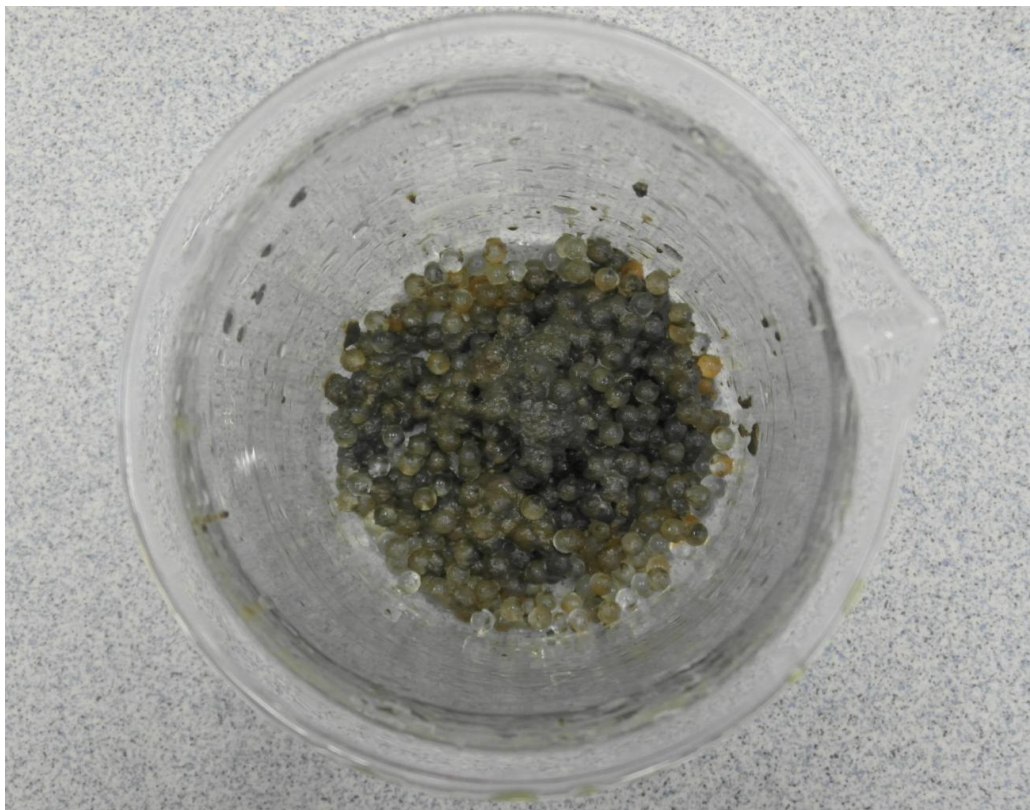
- Sutherland I. W. (2001b): The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.*, 9,5: 222–227.
- Šestanović S., Šolić M., Krstulović N., Bogner D. (2005): Volume, abundance and biomass of sediment bacteria in the eastern mid Adriatic Sea. *Acta adriat.*, 46: 177–191.
- Tarjányi-Szikora S., Oláh J., Makó M., Palkó G., Barkács K., Zárny G. (2013): Comparison of different granular solids as biofilm carriers. *Microchem. Journal.*, 107: 101–107.
- Tsuneda S., Aikawa H., Hayashi H., Yuasa A., Hirata A. (2003): Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. *FEMS Microb. Letters*, 223: 287–292.
- Von Schiller D., Marti E., Riera J. L., Sabater F. (2007): Effects of nutrients and light on periphyton biomass and nitrogen uptake in Mediterranean stress with contrasting land uses. *Freshw. Biol.*, 52: 891–906.
- Woese C. R., Fox G. E. (1977): Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5088–5090.
- Young K. D. (2007): Bacterial morphology: why have different shapes? *Curr Opin Microbiol.*, 10: 596–600.
- Zepp-Falz K., Holliger C., Grosskopf R., Liesack W., Nozhevnikova A. N., Müller B., Wehrli B., Hahn D. (1999): Vertical distribution of methanogens in the anoxic sediment of Rotsee (Switzerland). *Appl. Environ. Microb.*, 65: 2402–2408.

## 8. PŘÍLOHY

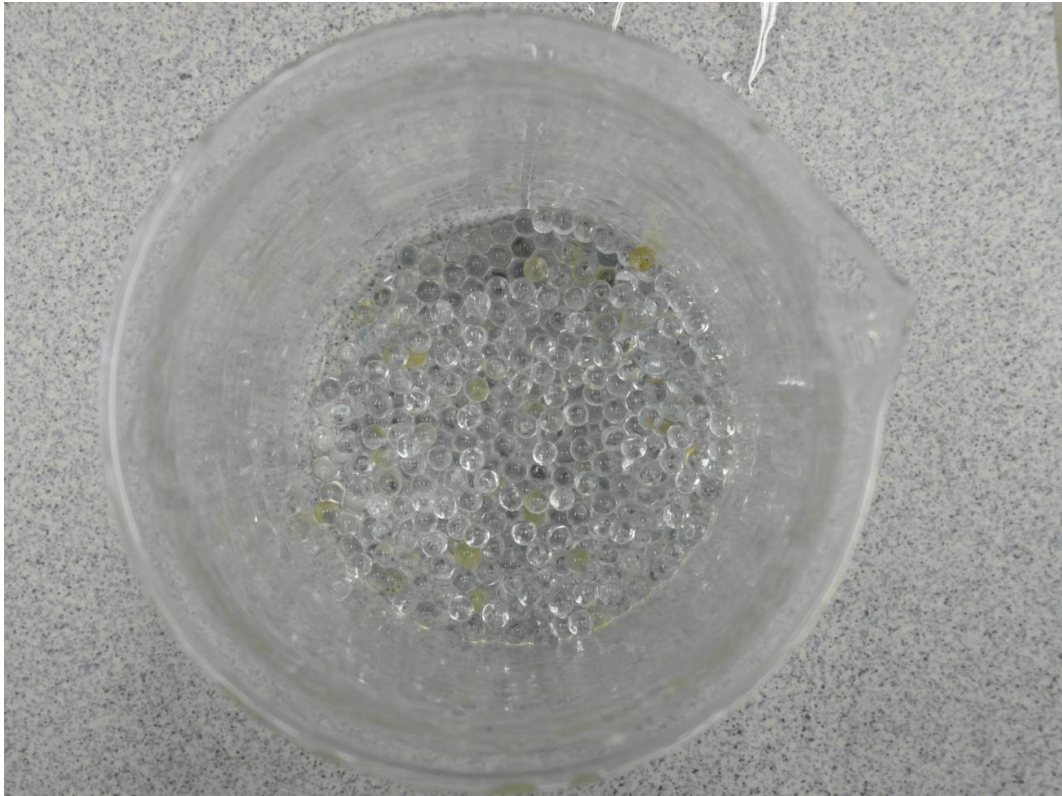
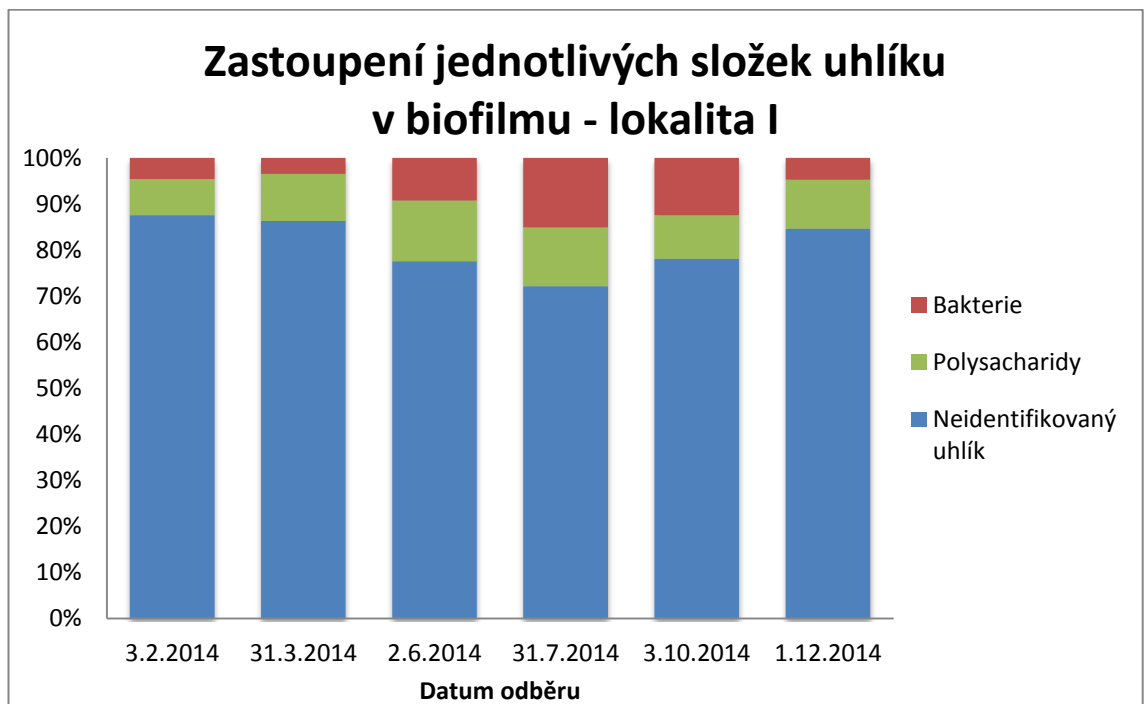
**Příloha 1:** Zakopané lahvičky v potoku Sitka



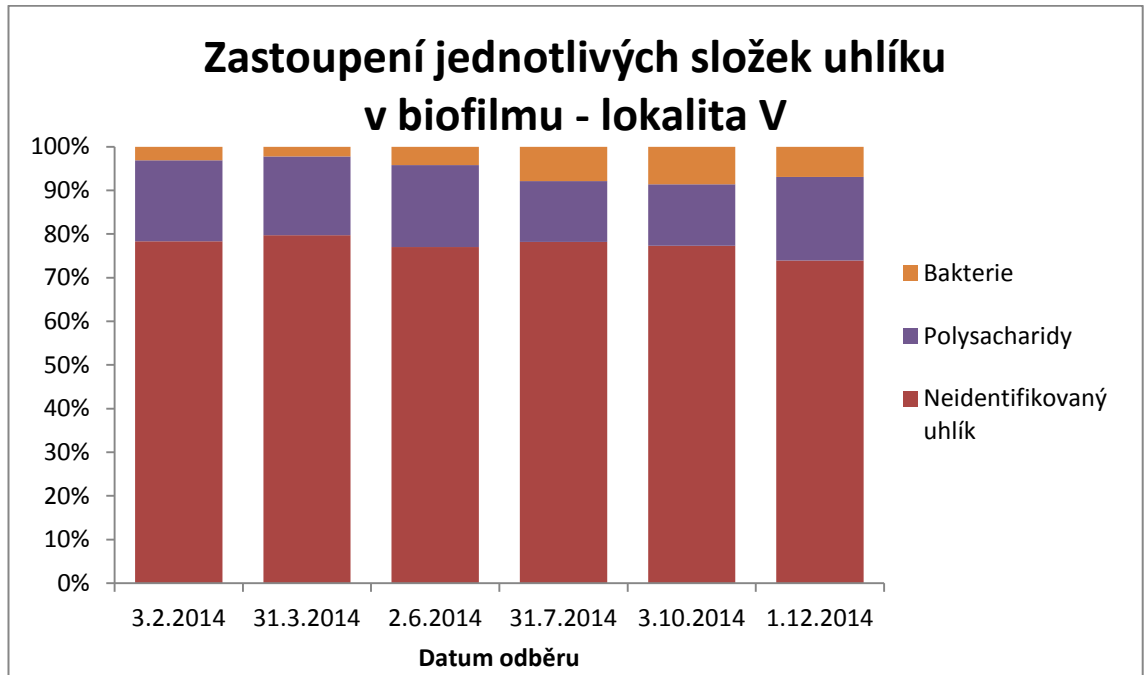
**Příloha 2:** Obsah lahvičky - čtvrtý odběr



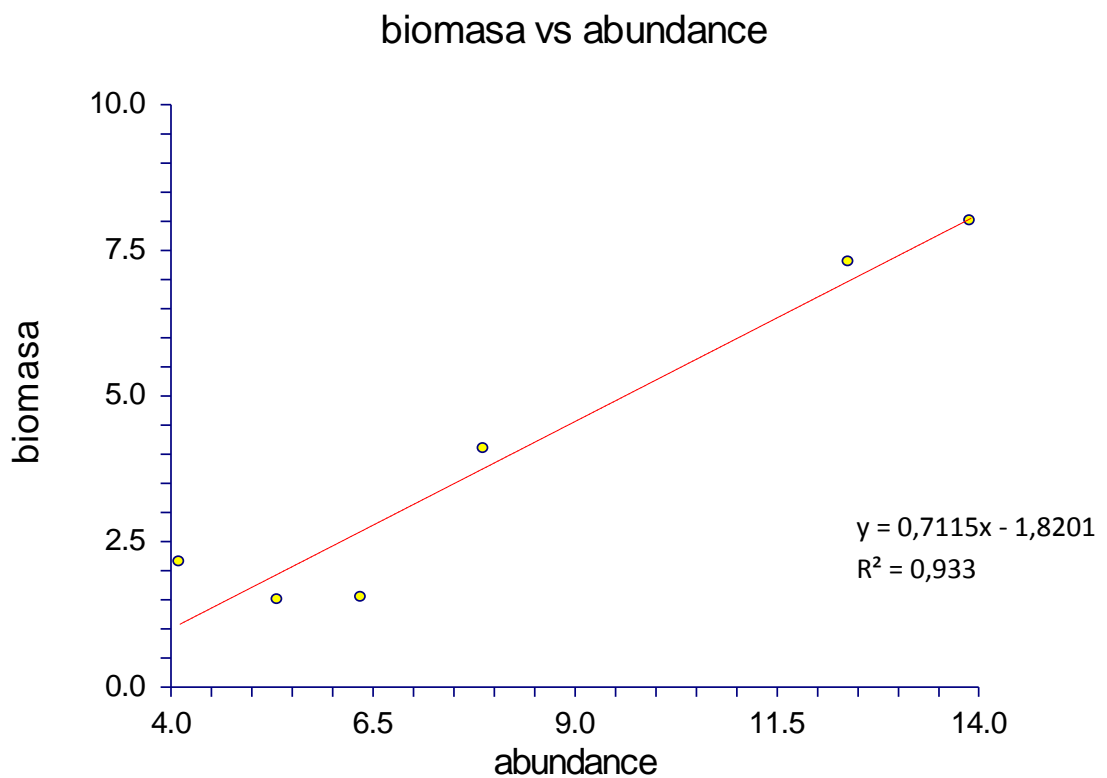


**Příloha 3:** Očištěné kuličky - čtvrtý odběr**Příloha 4:** Procentuální zastoupení jednotlivých složek celkového organického uhlíku biofilmu během celého výzkumu na lokalitě I

**Příloha 5:** Procentuální zastoupení jednotlivých složek celkového organického uhlíku biofilmu během celého výzkumu na lokalitě V

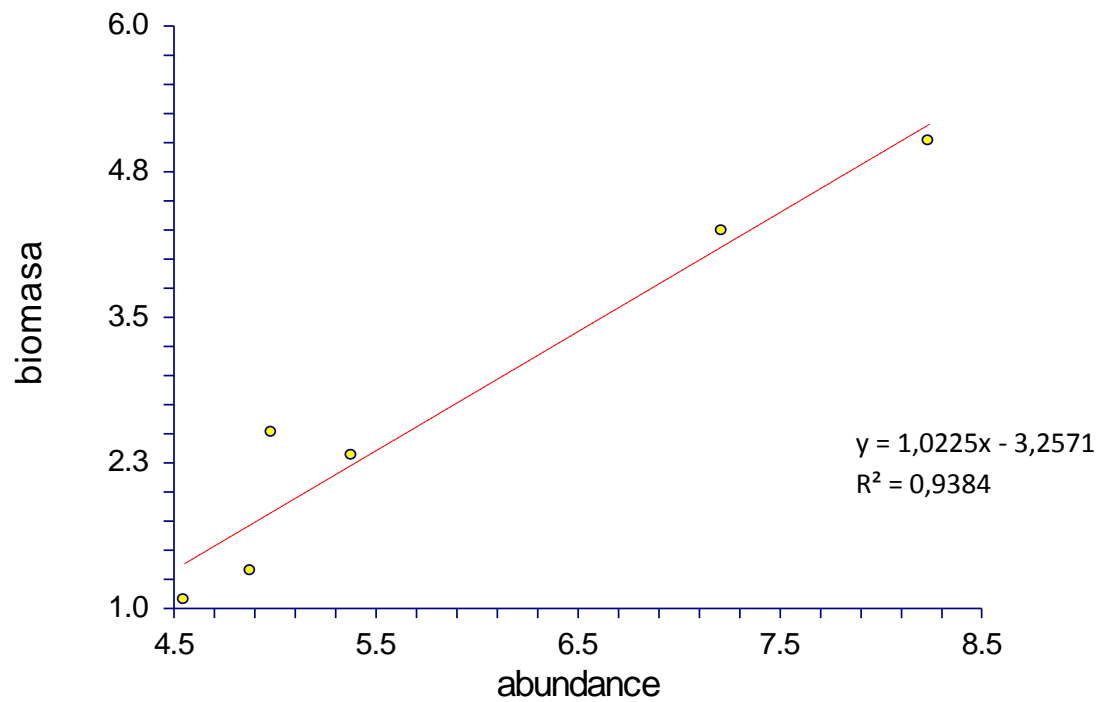


**Příloha 6:** Vztah mezi mikrobiální abundancí ( $10^4/\text{cm}^2$ ) a biomasou ( $\text{ngC}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) na lokalitě I

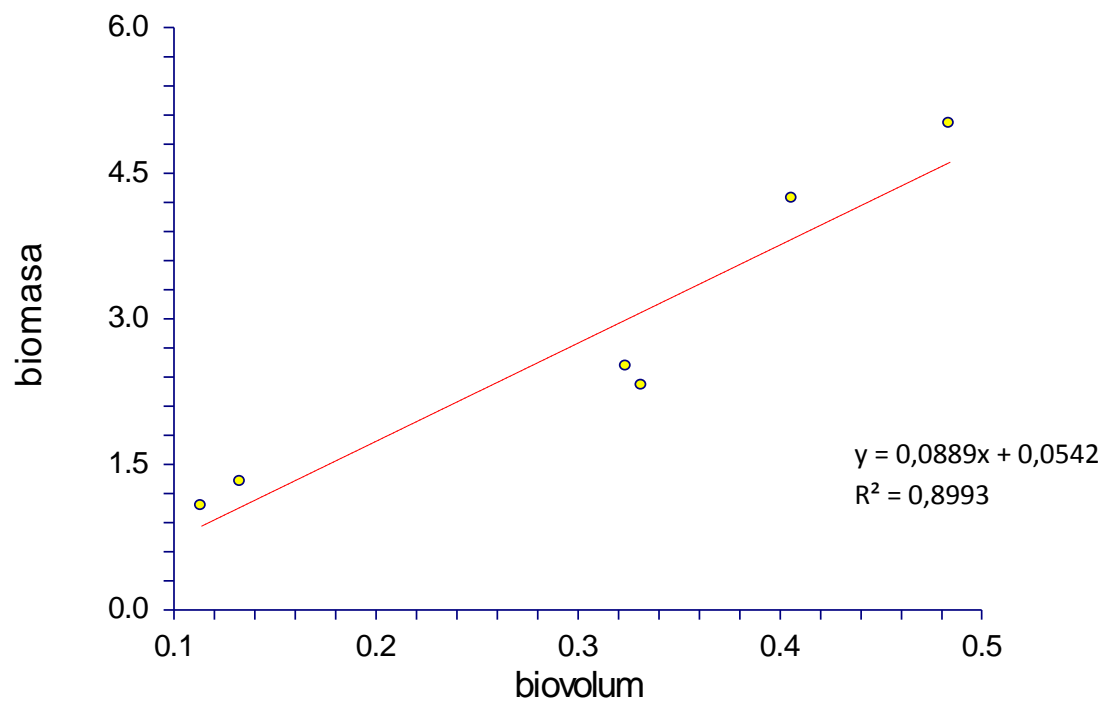


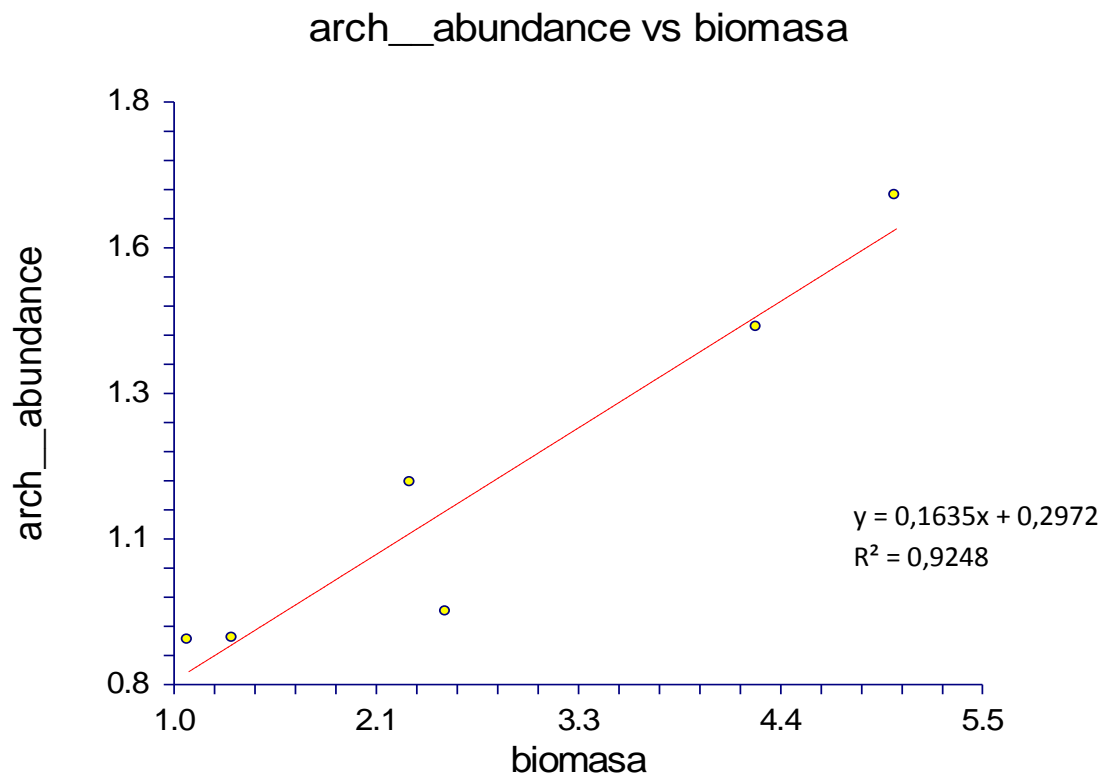
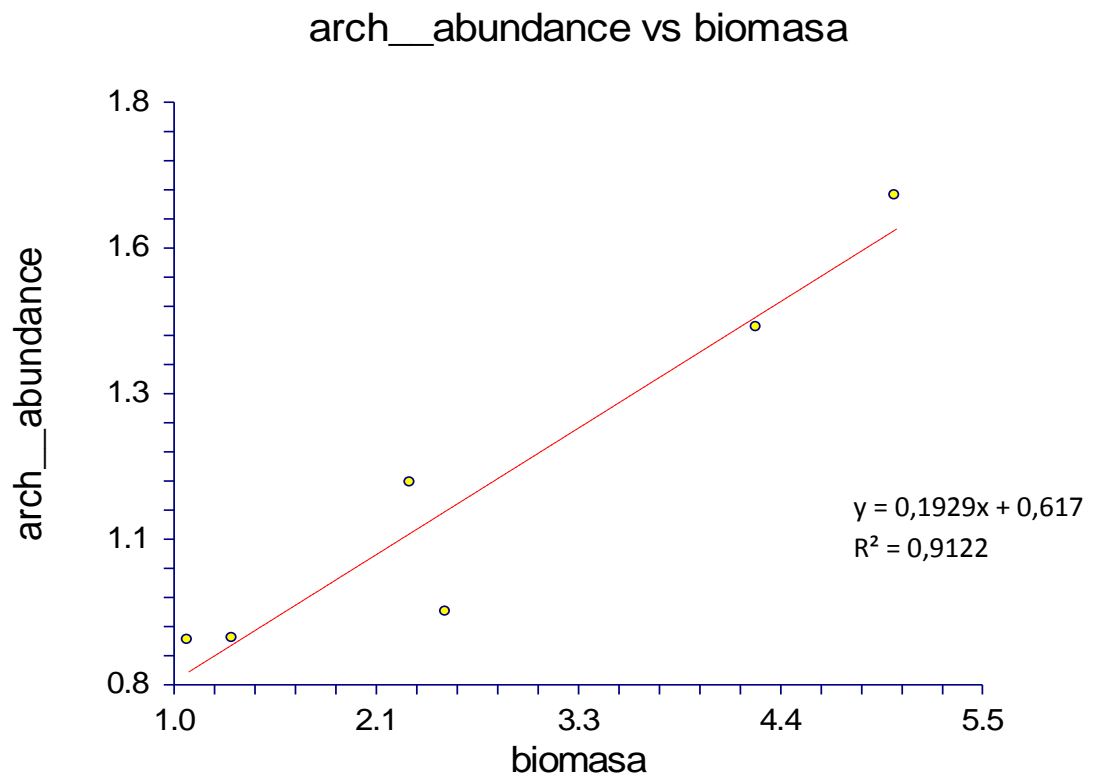
**Příloha 7:** Vztah mezi a mikrobiální abundancí ( $10^4/\text{cm}^2$ ) a biomasou ( $\text{ngC}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) na lokalitě V

## biomasa vs abundance

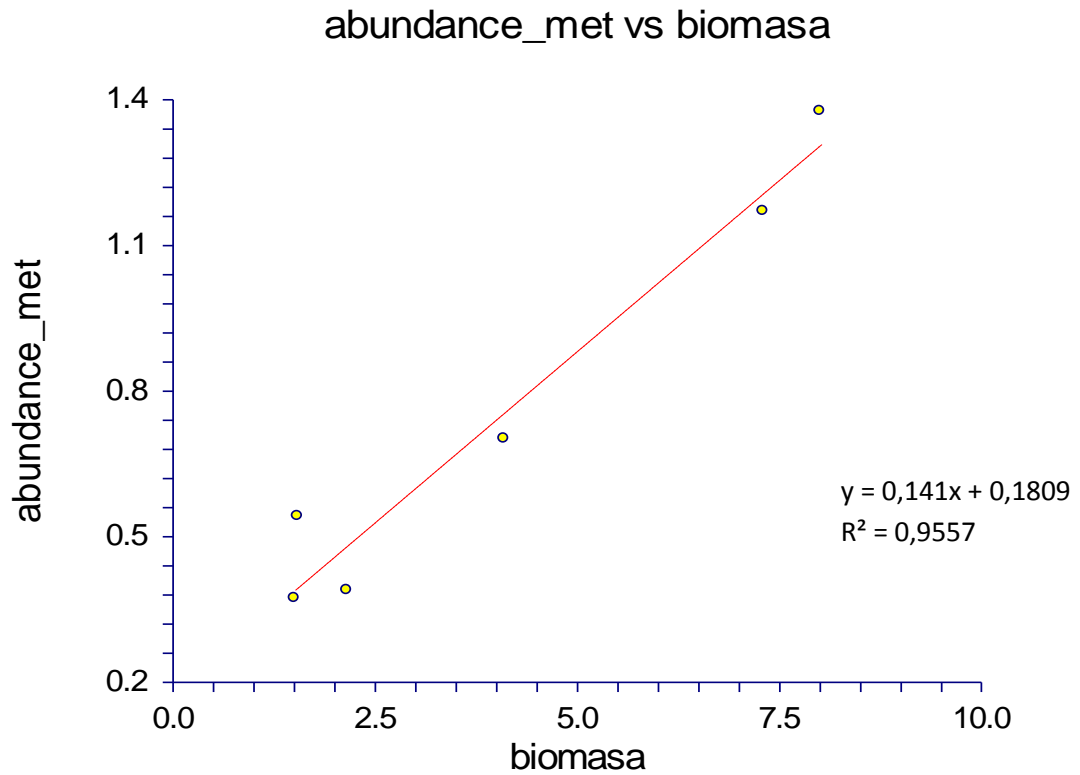
**Příloha 8:** Vztah mezi biovolumem ( $\mu\text{m}^3$ ) a biomasou ( $\text{ngC}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) na lokalitě V

## biomasa vs biovolum

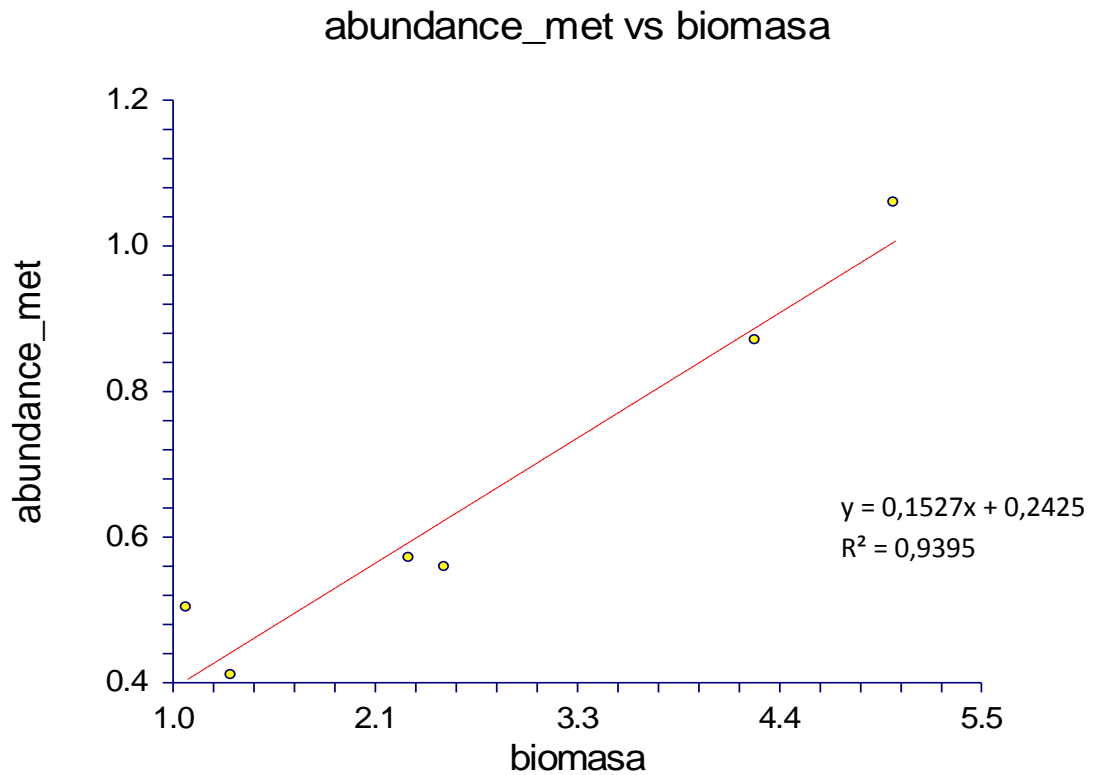


**Příloha 9:** Vztah mezi biomasou ( $\text{ngC.cm}^{-2}$ ) a abundancí archeí ( $10^4/\text{cm}^2$ ) na lokalitě I**Příloha 10:** Vztah mezi biomasou ( $\text{ngC.cm}^{-2}$ ) a abundancí archeí ( $10^4/\text{cm}^2$ ) na lokalitě V

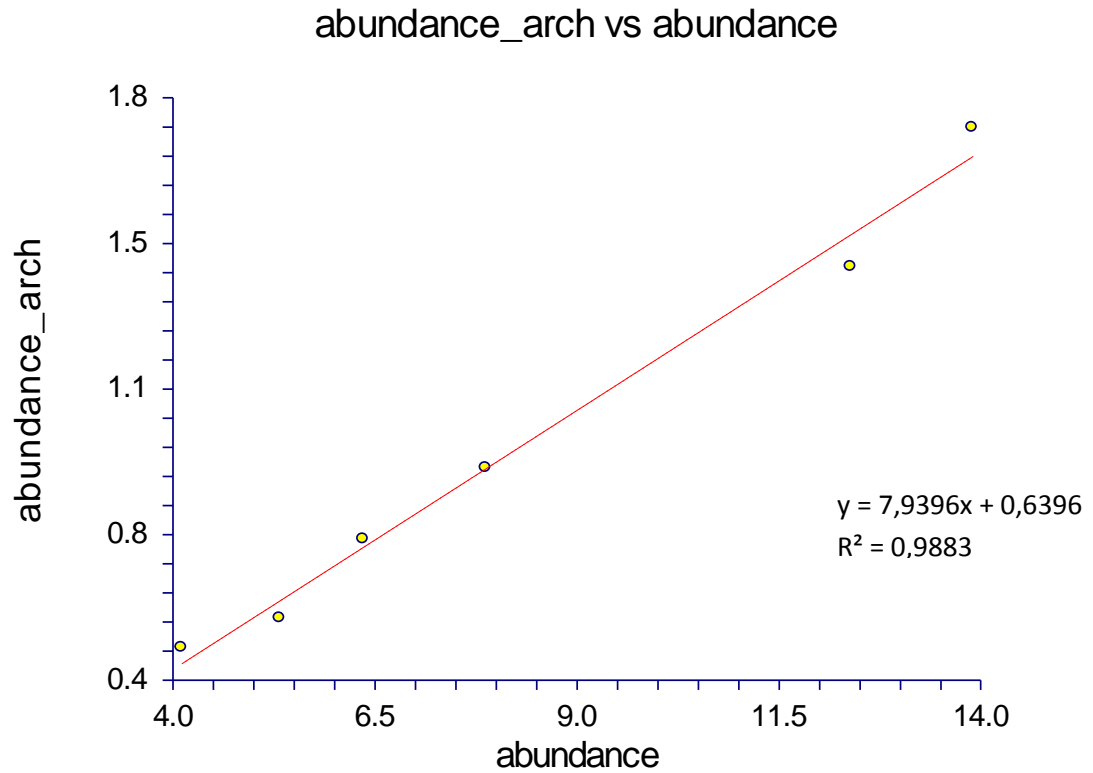
**Příloha 11:** Vztah mezi biomasou ( $\text{ngC.cm}^{-2}$ ) a abundancí metanogenních archeí ( $10^4/\text{cm}^2$ ) na lokalitě I



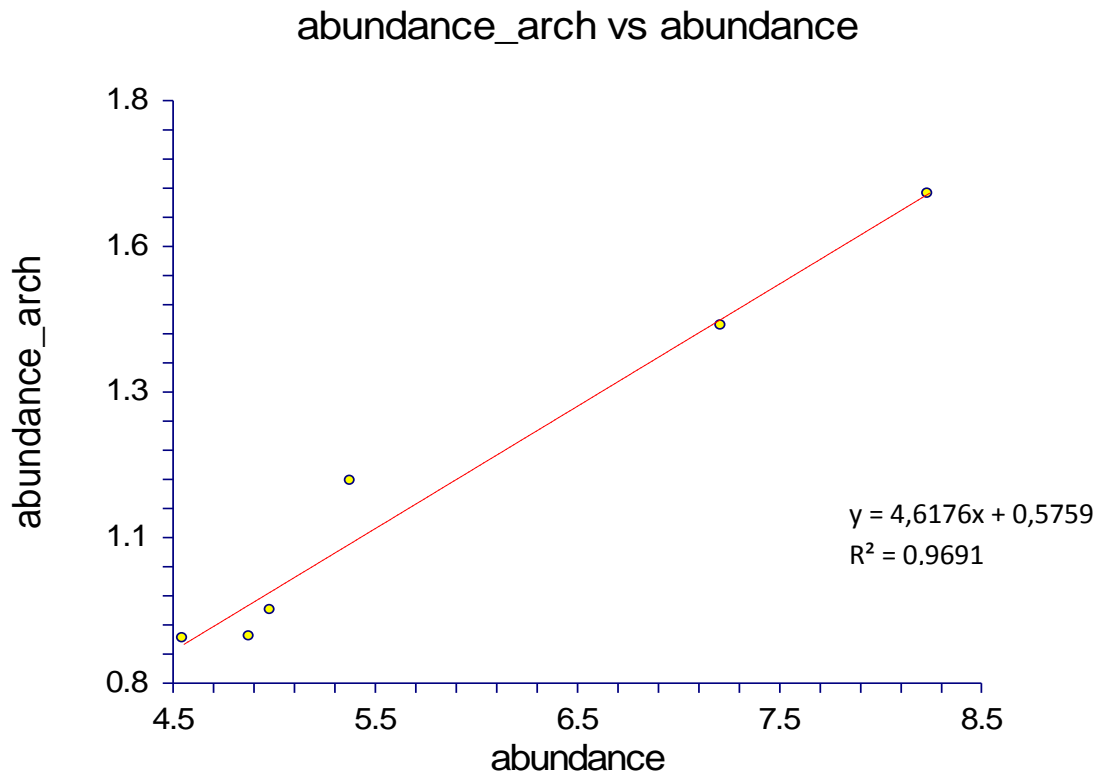
**Příloha 12:** Vztah mezi biomasou ( $\text{ngC.cm}^{-2}$ ) a abundancí metanogenních archeí ( $10^4/\text{cm}^2$ ) na lokalitě V



**Příloha 13:** Vztah mezi mikrobiální abundancí ( $10^4/\text{cm}^2$ ) a abundancí archeí ( $10^4/\text{cm}^2$ ) na lokalitě I

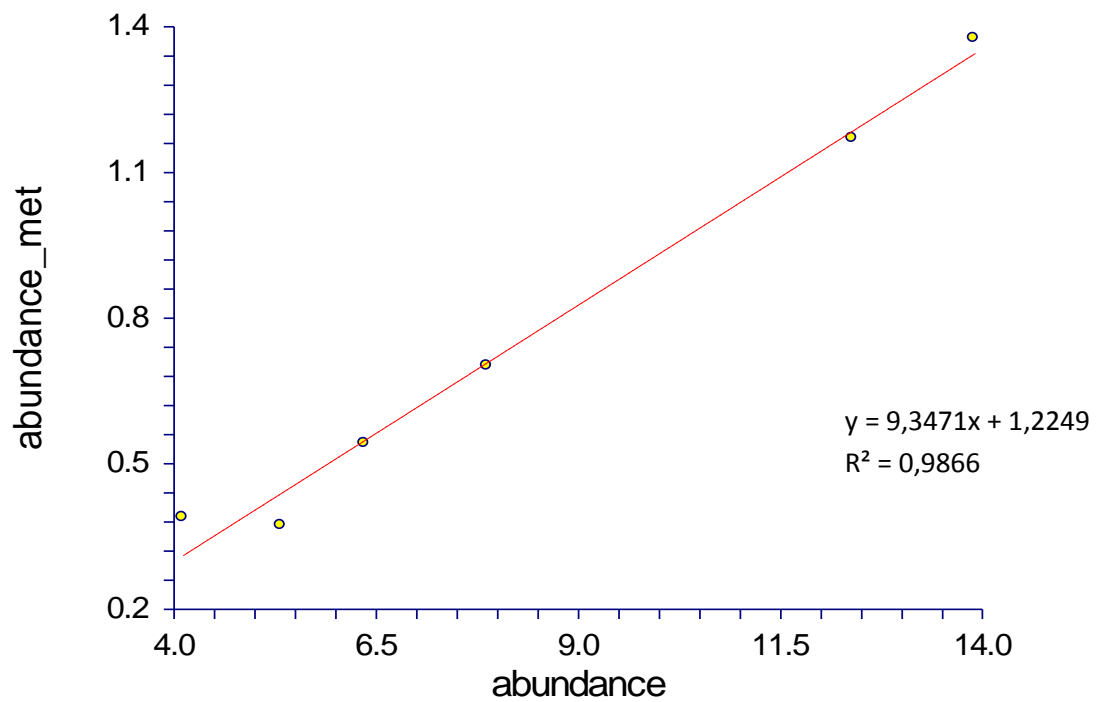


**Příloha 14:** Vztah mezi mikrobiální abundancí ( $10^4/\text{cm}^2$ ) a abundancí archeí ( $10^4/\text{cm}^2$ ) na lokalitě V



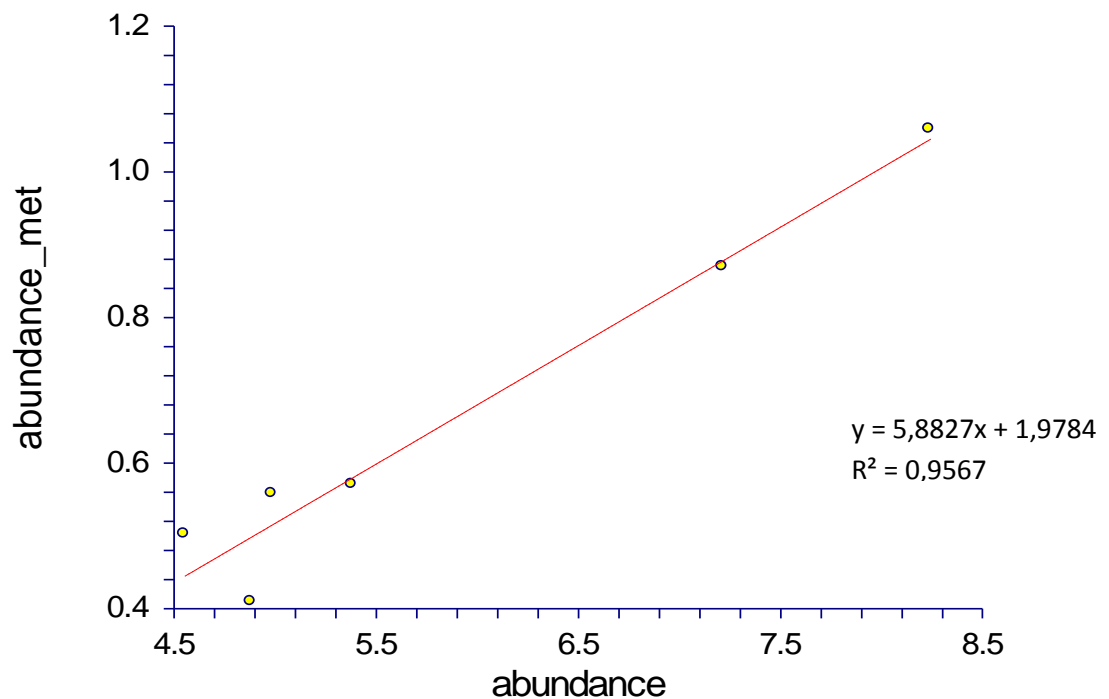
**Příloha 15:** Vztah mezi mikrobiální abundancí ( $10^4/\text{cm}^2$ ) a abundancí metanogenních archeí ( $10^4/\text{cm}^2$ ) na lokalitě I

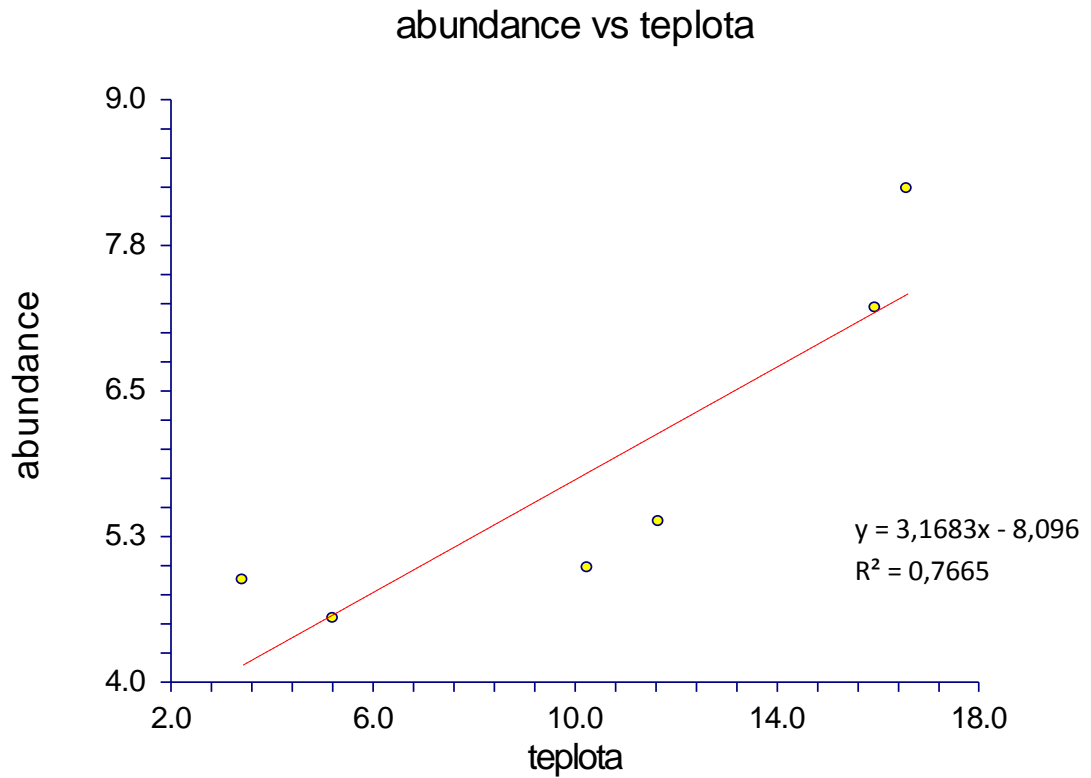
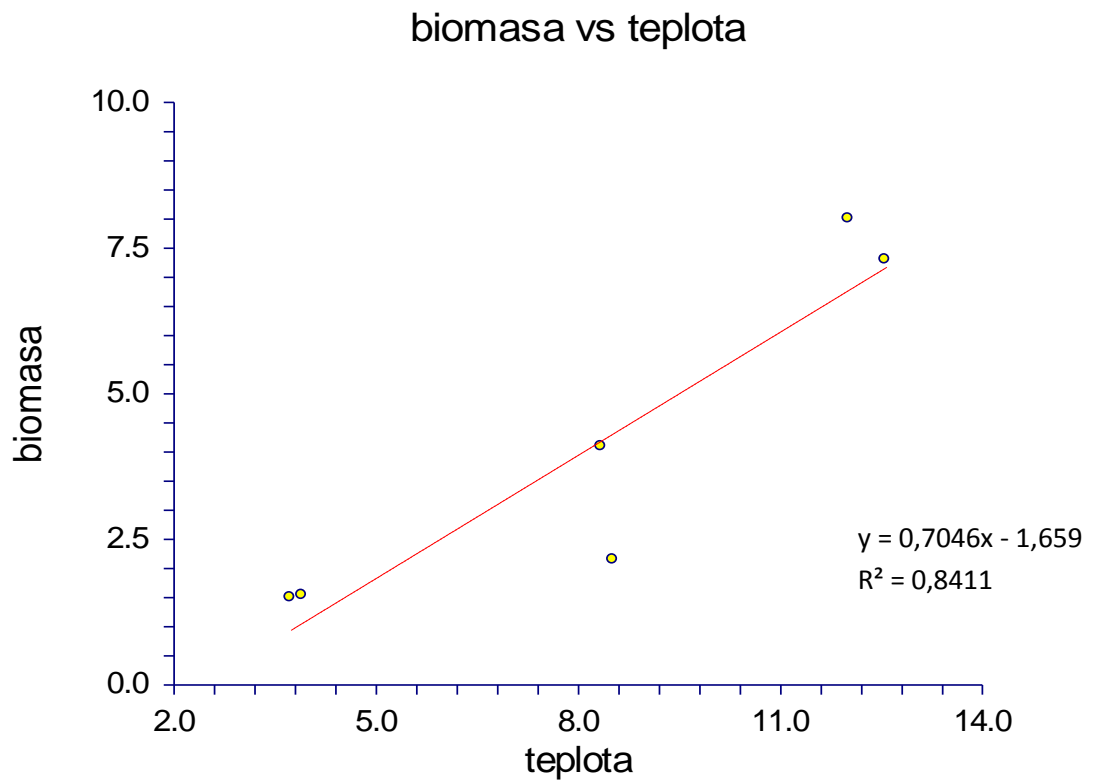
abundance\_met vs abundance



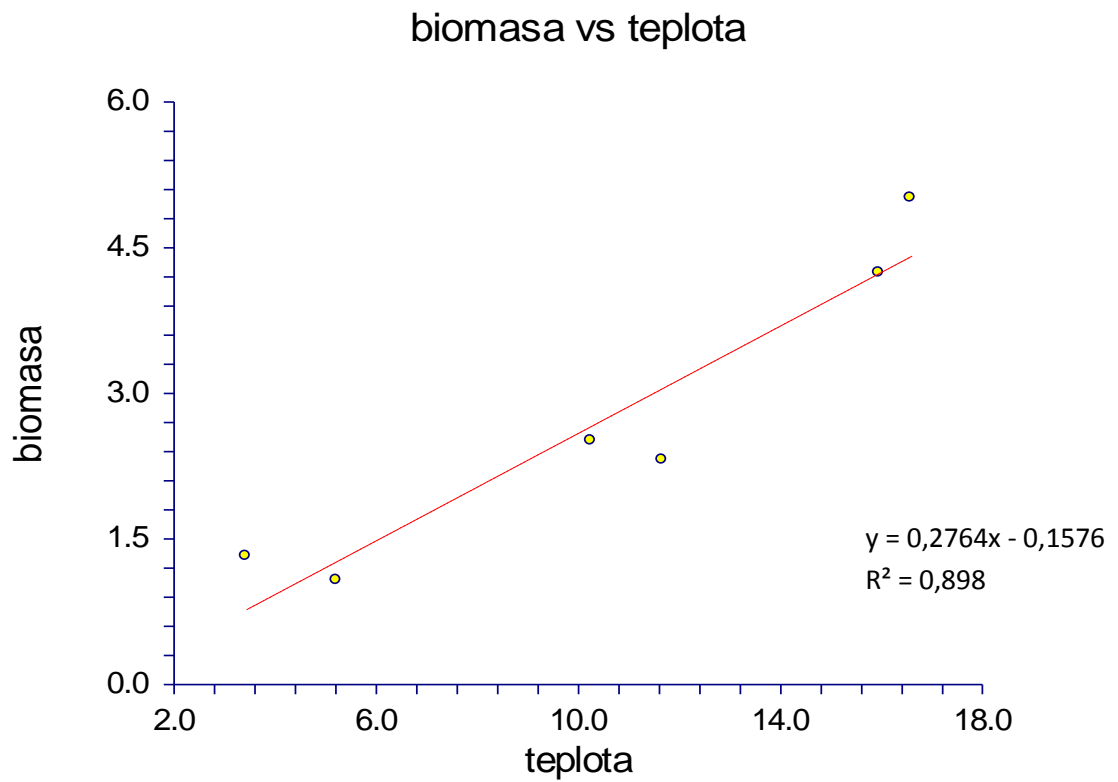
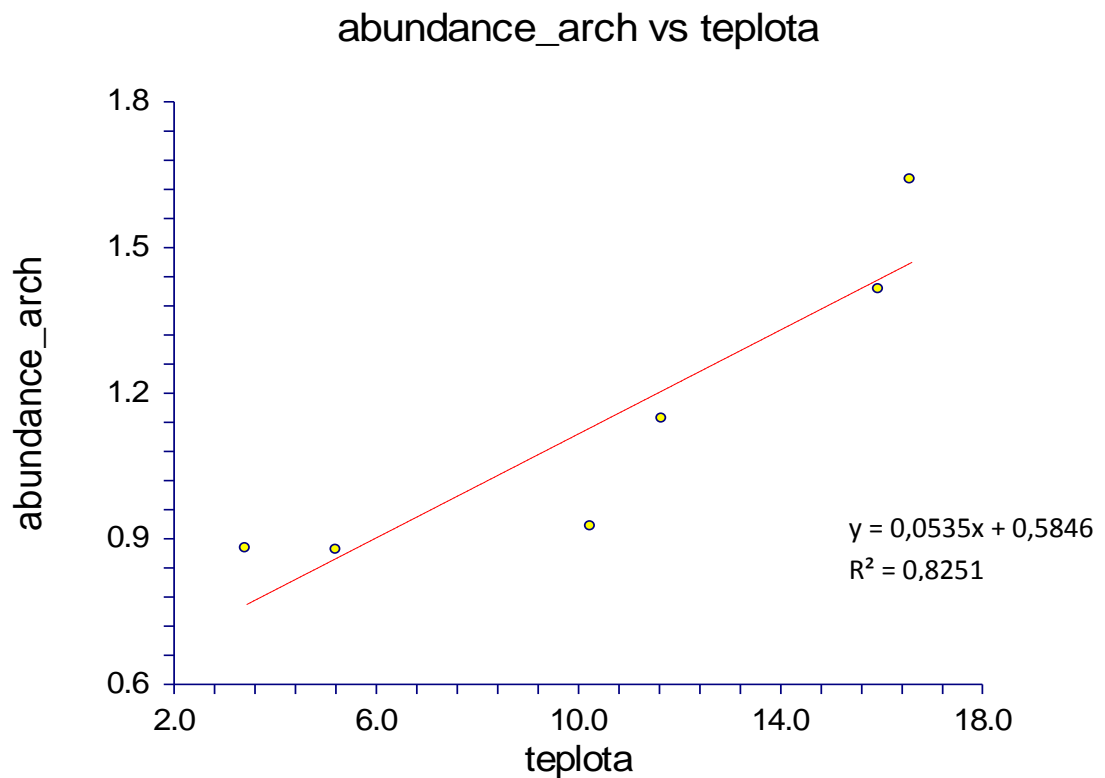
**Příloha 16:** Vztah mezi mikrobiální abundancí ( $10^4/\text{cm}^2$ ) a abundancí metanogenních archeí ( $10^4/\text{cm}^2$ ) na lokalitě V

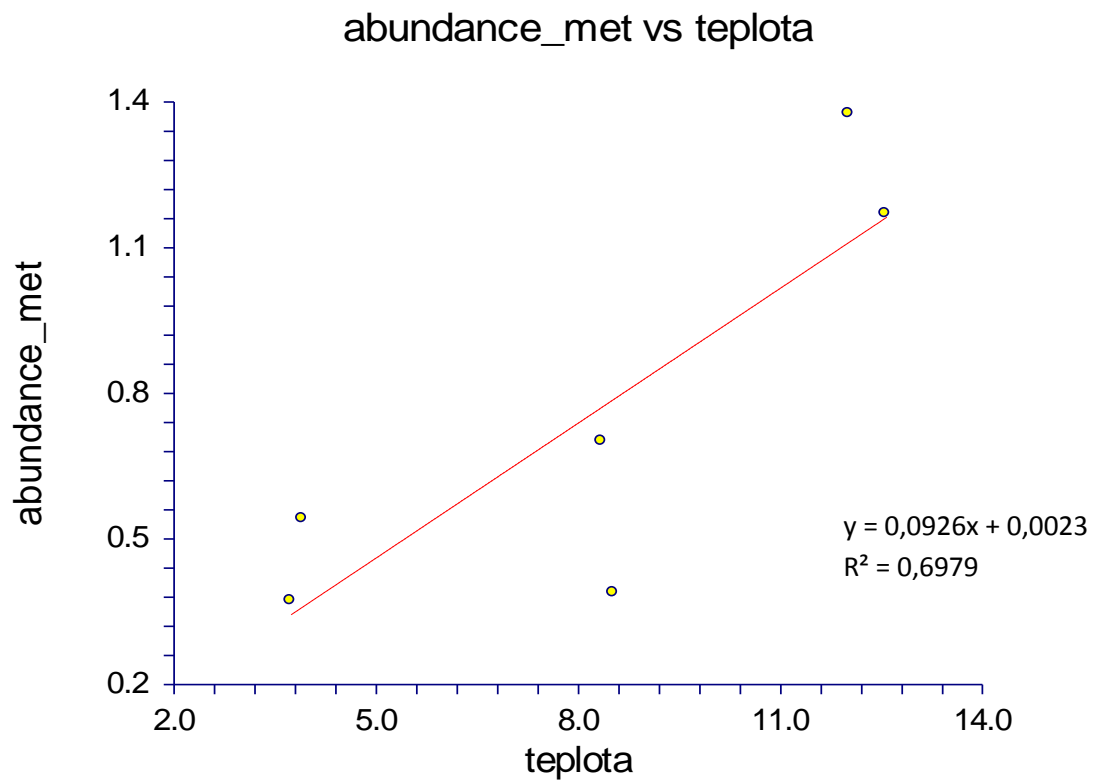
abundance\_met vs abundance



**Příloha 17:** Vztah mezi teplotou (°C) a mikrobiální abundancí ( $10^4/\text{cm}^2$ ) na lokalitě V**Příloha 18:** Vztah mezi teplotou (°C) a biomasou ( $\text{ngC} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) na lokalitě I



**Příloha 19:** Vztah mezi teplotou (°C) a biomasou (ngC.cm<sup>-2</sup>) na lokalitě V**Příloha 20:** Vztah mezi teplotou (°C) a abundancí archeí (10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup>) na lokalitě V

**Příloha 21:** Vztah mezi teplotou (°C) a abundancí metanogenních archeí ( $10^4/\text{cm}^2$ ) na lokalitě I**Příloha 22:** Vztah mezi teplotou (°C) a abundancí metanogenních archeí ( $10^4/\text{cm}^2$ ) na lokalitě V