

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra ekologie a životního prostředí



Srovnání tvorby biofilmu na skleněných kuličkách různé velikosti inkubovaných v toku

Hana Vinklerová

Bakalářská práce

předložená

na Katedře ekologie a životního prostředí

Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

jako součást požadavků

na získání titulu Bc. v oboru

Ochrana a tvorba životního prostředí

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

Olomouc 2013

Vinklerová H. (2013): Srovnání tvorby biofilmu na skleněných kuličkách různé velikosti inkubovaných v toku. Bakalářská práce, Katedra ekologie a životního prostředí, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého Olomouc, 22 s., v češtině.

Abstrakt

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo srovnat tvorbu biofilmu na skleněných kuličkách o průměru 5 mm a 10 mm. Následně si práce kladla za cíl posoudit, který ze substrátů je vhodnější pro vývoj biofilmu a který ze zkoumaných parametrů by byl vhodným indikátorem detekce růstu biofilmu.

Celý výzkum probíhal od září 2012 do února 2013, kdy na skleněných kuličkách, inkubovaných v potoku Sitka, byly sledovány tyto čtyři parametry: (i) koncentrace polysacharidů, (ii) koncentrace proteinů, (iii) celkové množství organické hmoty a (iv) bakteriální abundance biofilmu.

Jako spolehlivé indikátory růstu biofilmu se jeví koncentrace polysacharidů a množství celkové organické hmoty. Bakteriální abundance byla vyhodnocena jako méně spolehlivý indikátor. Naprosto nevhodným indikátorem se zdá být koncentrace proteinů. Co se týče vhodnosti substrátu pro růst biofilmu, nebyl prokázán vliv průměru substrátu na jeho růst.

Klíčová slova: bakteriální abundance, organická hmota, polysacharidy, potok Sitka, proteiny, růst biofilmu

Vinklerová H. (2013): Comparison of biofilm development on glass beads of different size incubated in the stream. Bachelor's thesis, Department of Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Science, Palacky University in Olomouc, 22 pp., in Czech.

Abstract

The aim of this bachelor thesis was to compare the formation of a biofilm on glass beads with the diameter of 5 mm and 10 mm. Subsequently, the thesis focused on evaluation of the most suitable substrate for the development of a biofilm, and which of the investigated parameters would be the most appropriate indicator for the detection of the growth of the biofilm.

The whole research was conducted from September 2012 to February 2013, when on the glass beads, incubated in the stream Sitka, on which we monitored four parameters: (i) the concentration of polysaccharides, (ii) the protein concentration, (iii) the total amount of organic matter and (iv) the bacterial abundance of the biofilm.

As reliable indicators of the growth of the biofilm, we consider the concentration of polysaccharides and the total amount of organic matter. Bacterial abundance was evaluated as a less reliable indicator. The most inappropriate indicator was the concentration of proteins. With respect to the suitability of a substrate for the growth of the biofilm, there was demonstrated no effect of the diameter of the substrate to its growth.

Key words: bacterial abundance, biofilm growth, organic matter, polysaccharides, proteins, Sitka stream

Prohlášení

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

V Olomouci 4. května 2013

Podpis:

Obsah

Seznam obrázků	vii
Seznam příloh	viii
Poděkování	ix
1. ÚVOD.....	1
2. CÍLE PRÁCE	3
3. MATERIÁL A METODY.....	4
3.1. Příprava.....	4
3.2. Lokalita	4
3.3. Odběr	5
3.4. Laboratorní část	5
3.4.1. Stanovení koncentrace polysacharidů dle Duboise.....	5
3.4.2. Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové	6
3.4.3. Stanovení abundance bakterií v biofilmu pomocí DAPI	6
3.4.4. Stanovení celkového množství organické hmoty.....	8
3.5. Analýza dat	8
4. VÝSLEDKY	9
4.1. Koncentrace polysacharidů.....	9
4.2. Koncentrace proteinů.....	9
4.3. Bakteriální abundance	10
4.4. Celkové množství organické hmoty	11
4.5. Vztahy mezi parametry	12
5. DISKUSE	15
5.1. Koncentrace polysacharidů.....	15
5.2. Koncentrace proteinů.....	16
5.3. Bakteriální abundance	16
5.4. Celkové množství organické hmoty	17
5.5. Vztahy mezi parametry	17
5.6. Velikost substrátu	18
6. SOUHRN.....	19
7. LITERATURA	20
8. PŘÍLOHY	23

Seznam obrázků

Obrázek 1: Potok Sitka.....	4
Obrázek 2: Průměrná koncentrace polysacharidů biofilmu na různých kuličkách během čtyř odběrů	9
Obrázek 3: Průměrná koncentrace proteinů biofilmu na různých kuličkách během čtyř odběrů	10
Obrázek 4: Průměrná bakteriální abundance biofilmu na různých kuličkách během čtyř odběrů	10
Obrázek 5: Celkové množství organické hmoty biofilmu na různých kuličkách během čtyř odběrů	11
Obrázek 6: Vztah mezi koncentrací polysacharidů a organickou hmotou biofilmu u kuličky M	12
Obrázek 7: Vztah mezi organickou hmotou a koncentrací polysacharidů biofilmu u kuličky V	13
Obrázek 8: Vztah mezi organickou hmotou a bakteriální abundancí biofilmu u kuličky M.....	13
Obrázek 9: Vztah mezi bakteriální abundancí a polysacharidy biofilmu u kuličky M	14

Seznam příloh

Příloha 1: Obrazová příloha.....	23
Příloha 2: Zastoupení jednotlivých složek biofilmu během experimentu	24
Příloha 3: Neprůkazné vztahy mezi zkoumanými parametry	25

Poděkování

Nejprve bych chtěla poděkovat svému vedoucímu práce doc. RNDr. Martinu Rulikovi, Ph.D. za cenné rady a připomínky, za poskytnutí literatury a hlavně za trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Lence Brablcové, Ph.D., Mgr. Ivě Buriánkové, Ph.D., a Mgr. Pavlíně Badurové za pomoc při zpracování vzorků. Děkuji také zaměstnancům Katedry ekologie a životního prostředí za poskytnutí vhodných podmínek při práci v laboratoři. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat celé své rodině, přátelům a svému příteli za psychickou podporu a vytvoření klidného prostředí pro psaní této bakalářské práce.

1. ÚVOD

Bakterie díky své přizpůsobivosti představují nejúspěšnější formu existence života na Zemi (Schindler 2008). V přírodních populacích mají bakterie tendenci přisedat k různým povrchům (Rulík et al. 2011) a existovat ve formě biofilmu. Život v biofilmu je pro bakterie výhodnější a ve většině prostředí představuje základní způsob jejich přirozeného výskytu (Costerton a Lappin-Scott 2003, Schindler 2008, Rulík et al. 2011).

Všechny pevné povrchy v tocích jsou kolonizovány biofilmy (Ainsworth a Goulder 2000), které mají klíčovou roli v koloběhu živin a demineralizaci (Schiller et al. 2007). Pro svou schopnost odnímat z vody různé organické a anorganické látky, včetně polutantů, představují biofilmy klíčový prvek v procesu říčního samočištění (Rulík et al. 2011).

Biofilmy byly pozorovány dlouho předtím, než měli lidé vhodné přístroje k jejich bližšímu zkoumání. Přelomem ve výzkumu byla polovina roku 1800, kdy Robert Koch vyvinul metodu výroby živného média pro růst a izolaci čistých kultur mikroorganismů. Výzkum biofilmů probíhal pomalu až do roku 1990, kdy nastal jeho velký rozmach (Costerton 2004).

Biofilm je společenství mikroorganismů, jehož buňky jsou ireverzibilně přichycené k podkladu nebo k okolním buňkám, jsou zapuštěné v matici extracelulárních polymerních látek, kterou si sami produkují, a mají odlišný fenotyp s ohledem na rychlost růstu a transkripci genů (Donlan a Costerton 2002, Schindler 2008). Matrice biofilmů je velmi důležitá. Dnes se již ví, že je klíčovým strukturálním parametrem pro stabilitu a integritu biofilmu, zároveň slouží jako útočiště mikrobiálních společenstev před vysycháním a smykovým napětím (Ramasamy a Zhang 2005). Jejimi hlavními složkami jsou voda, mikrobiální buňky, látky anorganické a organické. Významnou roli představují exopolysacharidy (Sutherland 2001b). Frølund et al. (1996) ukazují, že exopolysacharidy jsou složeny z různých organických látek. Z provedených studií bylo zjištěno, že u čistých kultur bakterií převažují polysacharidy (Zhang et al. 1998, Sim et al. 2000), zatímco u biofilmů nacházejících se v aktivním kalu převažují proteiny (McSwain et al. 2005). V malém množství se vyskytují uronové kyseliny, DNA (Liu a Fang 2002, Tsuneda et al. 2003) huminové látky a lipidy (Comte et al. 2006, D'Abzac et al. 2010).

Tvorba biofilmu je proces několika následných kroků: (i) adheze, (ii) kolonizace (iii) akumulace, (iv) stádium klimaxu mikrobiálních buněk a (v) oddělení mikrobiálních buněk, který je definován prostorovým a časovým měřítkem (Jenkinson a Lappin-Scott 2001). Celý vývoj biofilmu můžeme označit jako cyklický proces, jelikož na místech zaniklého biofilmu vzniká biofilm nový (Tarjányi-Szikora et al. 2013). Sabater a Romaní (1996) a Romaní et al. (2008) uvádí, že při ponoření nového substrátu do proudu dochází k tvorbě biofilmu již po několika hodinách. Volně pohybující se buňky se přichycují pomocí adhezínů, které mají na svém těle, na pevný povrch. Poté dochází ke změně jejich chování, fenotypu a začnou produkovat velké množství polysacharidů, ze kterých se vytvoří hlenová matrice. Buňky se množí a vytváří se mikrokolonie (Schindler 2008). Z biofilmu se buňky také uvolňují. Přejíždějí do planktonního stavu, jsou odnášeny okolní kapalinou a kolonizují další povrch. K odtrhávání buněk dochází působením mechanických sil a určitých chemických látek z okolí. Další významnou roli v odtrhávání hrají *quorum sensing* signální molekuly, které detekují hustotu populace a omezují ji. Odtrhávání buněk však může být chápáno i jako strategie, kdy bakterie kolonizují nové niky ještě dříve, než se pro ně prostor a živiny stanou limitujícími (Rulík et al. 2011).

Romaní a Sabater (1999), Romaní et al. (2008) a Proia et al. (2012) se ve svých výzkumech shodují, že nejrychlejší nárůst biofilmu probíhá po prvních sedmi dnech až do třetího týdne, kdy se nárůst biofilmu zpomaluje. Přibližně po čtyřicátém dnu se biofilm dostává do stabilní fáze, kdy už nenarůstá. Růst biofilmu zkoumal také Tarjányi-Szikora et al. (2013), a to po dobu 97 dní. Během prvních 45 dní dosáhl podobných výsledků jako již předtím Romaní a Sabater (1999), Romaní et al. (2008) a Proia et al. (2012). Poté došlo ke slabému útlumu, následovanému druhou kolonizací a nárůstem. Z toho bychom mohli usoudit, že délka jednoho vývojového cyklu biofilmu se pohybuje kolem 45 dní. Nárůst faktorů po 45. dni indikujících růst biofilmu zaznamenali také Artigas et al. (2012), kteří studovali biofilm po dobu 60 dní.

O vlivu velikosti částice, na níž se biofilm vyvíjí, toho zatím nebylo mnoho publikováno. Existují však studie, které zkoumají růst bakterií na různých velikostech sedimentu. Meyer et al. (1987), Axmanová et al. (2006) a De Troch et al. (2006) poukazují na to, že čím je částice sedimentu menší, tím větší počet bakterií se na ní vyskytuje.

2. CÍLE PRÁCE

1. Cílem této práce je srovnat tvorbu biofilmu na dvou různě velkých skleněných kuličkách o průměru 5 mm a 10 mm.
2. Pomocí zkoumaných parametrů: (i) koncentrace polysacharidů, (ii) koncentrace proteinů, (iii) abundance bakterií a (iv) celkové organické hmoty biofilmu určit, která z uvedených velikostí kuliček je pro biofilm z hlediska tvorby výhodnější.
3. Posoudit, který z výše uvedených parametrů by mohl být dobrým indikátorem růstu biofilmu při jeho dalším studiu.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Příprava

Pro výzkum byly použity skleněné kuličky o průměru 5 mm (tzv. malé, M) a 10 mm (tzv. velké, V). Tyto kuličky byly před vlastní inkubací dezinfikovány 36% HCl, promyty destilovanou vodou a přesypány do PE lahvíček o objemu 250 ml, kterým byly po obvodu vyvrtány otvory. Jedna lahvíčka obsahovala 150 kuliček, z toho bylo 30 kuliček V. Následně bylo na víčko lahvíčky připevněno lanko. Celkem bylo takto připraveno 20 lahvíček.

3.2. Lokalita

K inkubaci skleněných kuliček byl vybrán potok Sitka nacházející se 6 km severně od Olomouce. Sitka je přirozeně meandrující potok třetího řádu, 35 km dlouhý, pramenící v pohoří Hrubý Jeseník v nadmořské výšce 650 m n. m. Plocha povodí je 118,81 km², průměrný roční odtok činí 0,81 m³.s⁻¹. Šířka koryta se pohybuje od 4 do 6 m. Potok Sitka se vlévá 5 km severně od Olomouce do řeky Oskavy, která je levým přítokem řeky Moravy.



Obrázek 1: Potok Sitka

3.3. Odběr

Lahvičky byly umístěny do toku Sitka 24.9.2012. Na kovovou tyč byly zavěšeny pomocí lanek tak, aby se dotýkaly koryta potoku. Celkem byly naplánovány čtyři odběry, při kterých bylo pokaždé z toku odebráno pět lahviček. Odběry proběhly 29.10. a 26.11.2012, 7.1. a 15.2.2013. Odebrané lahvičky byly převezeny v uzavíratelné plastové nádobě do laboratoře. Kuličky byly očištěny od bahna, šterku a dalších nečistot, které se v lahvičce společně s nimi nacházely. Čištění bylo prováděno v minimálním množství vody tak, aby nedošlo k poškození biofilmu. Očištěné kuličky byly během zpracování skladovány 2–3 dny při teplotě *in situ*, zalité destilovanou vodou.

3.4. Laboratorní část

Růst říčního biofilmu byl studován sledováním čtyř parametrů: (i) koncentrace polysacharidů v biofilmu dle metody Duboise, (ii) koncentrace proteinů v biofilmu dle metody Bradfordové, (iii) abundance bakterií v biofilmech stanovené pomocí DAPI a (iv) celkového množství organické hmoty.

3.4.1. Stanovení koncentrace polysacharidů dle Duboise (Dubois et al. 1956)

Pomůcky:

- skleněné zkumavky
- pipeta 1000–5000 μl + špičky
- pipeta 100–1000 μl + špičky
- kádinky 100 ml
- kyvety

Chemikálie:

- D-glukosa
- 5% vodní roztok fenolu
- 96% H_2SO_4

Postup:

Ze zásobního roztoku D-glukosy byly nejprve připraveny kalibrační roztoky o koncentracích 0–100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Z každé lahvičky bylo odebráno do skleněných zkumavek zvlášť 5 kuliček V a 10 kuliček M. Do zkumavek s 1 ml kalibračních roztoků a do zkumavek se skleněnými kuličkami byly přidány vždy 1 ml 5% roztoku fenolu a 5 ml koncentrované H_2SO_4 . Vzniklá směs byla ihned protřepána a nechala se odstát 30

minut při laboratorní teplotě. Po této době byla změřena na spektrofotometru absorbance všech vzorků při vlnové délce 490 nm. V programu Standard Curves byly z vytvořené kalibrační křivky získány hodnoty koncentrací $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Zjištěné hodnoty koncentrací byly přepočítány na cm^2 .

3.4.2. Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové (Bradford 1976)

Pomůcky:

- skleněné zkumavky
- pipeta 1000-5000 μl + špičky
- kádinky 100 ml
- kyvety

Chemikálie:

- BSA (Bovine Serum Albumine, hovězí sérový albumin)
- činidlo Bradfordové

Postup:

Nejprve byla vytvořena kalibrační křivka. Ze zásobního roztoku BSA byly vytvořeny kalibrační standardy v rozsahu 2,5–750 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Pět kuliček V a 10 kuliček M bylo zvlášť odebráno z každé lahvičky do skleněných zkumavek. Ke kuličkám a 100 μl připravených kalibračních standardů bylo přidáno 5 ml činidla Bradfordové. Vzniklá směs byla ihned protřepána a nechala se odstát 10 minut při laboratorní teplotě. Následně byla na spektrofotometru změřena absorbance všech vzorků při vlnové délce 590 nm. Poté v programu Standard Curves byly z vytvořené kalibrační křivky získány hodnoty koncentrací $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Zjištěné hodnoty koncentrací byly přepočítány na cm^2 .

3.4.3. Stanovení abundance bakterií v biofilmu pomocí DAPI (Porter a Feig 1980)

Pomůcky:

- pipeta 1000–5000 μl + špičky
- pipeta 100–1000 μl + špičky
- pipeta 10–100 μl + špičky
- membránové filtry Millipore (0,2 μm , GTTP)
- 50ml plastové uzavíratelné zkumavky
- 15ml plastové uzavíratelné zkumavky
- nůžky
- pinzeta

- podložní sklíčka
- krycí sklíčka
- injekční jehla a stříkačka
- Petriho misky
- filtrační papír

Chemikálie:

- 2% Formaldehyd
- DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol)
- detergent Triton
- hustotní médium Nycodenz
- etanol
- imerzní olej

Postup:

Do 50ml zkumavek bylo přeneseno vždy 8 kuliček V a 40 kuliček M. Tyto kuličky byly fixovány 10 ml 2% formaldehydu a následně sonikovány po dobu 30 s ve 3 cyklech při síle 13%. K sonikovaným vzorkům bylo přidáno 150 µl detergentu Triton a poté byly třepány po dobu 6 hodin při rychlosti 200 rpm. Z takto připravených vzorků bylo odebráno do 15ml zkumavek 8 ml vzorku a k němu zavedeny injekční jehlou do spodu zkumavky 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. Pomocí vakuové filtrace byly z každého vzorku přefiltrovány 3 ml supernatantu na membránový filtr, který pak byl vysušen položením na filtrační papír. Zcela uschlé filtry byly poté obarveny 15 µl DAPI po dobu 10 minut ve tmě. Po této době bylo nenavázané barvivo promyto střídavě v destilované vodě a etanolu. Poslední fází byla vždy destilovaná voda. Sušení filtrů probíhalo ve tmě. Usušený filtr byl položen s kapkou imerzního oleje na podložní sklíčko, na filtr bylo přiloženo krycí sklíčko. Z každého filtru bylo v epifluorescenčním mikroskopu Olympus BX 60 imerzním objektivem (zvětšení 1000krát) vyfoceno 30 náhodných polí. Vyhodnocení těchto snímků bylo provedeno v programu NIS-Elements.

Abundance bakterií v 1 ml vzorku byla na základě zjištěných hodnot vypočítána dle vzorce

$$N = \frac{n \cdot F}{V} \cdot 1,25$$

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 byly přepočítány na cm².

3.4.4. Stanovení celkového množství organické hmoty (Horáková et al. 1989)

Pomůcky:

- lžička
- keramické misky
- exsikátor
- kleště

Postup:

Do suchých keramických misek, které byly předem zváženy, bylo odebráno z každé lahvičky 5 kuliček V a 20 kuliček M. Tyto kuličky byly ponechány 24 hodin v sušárně při teplotě 100 °C. Vzniklá sušina byla po vychladnutí v exsikátoru zvážena. Dále byly kuličky žihány v laboratorní peci při teplotě 550 °C 2 hodiny a po vychladnutí v exsikátoru byly opět zváženy. Z rozdílu naměřených hodnot bylo zjištěno množství organické hmoty.

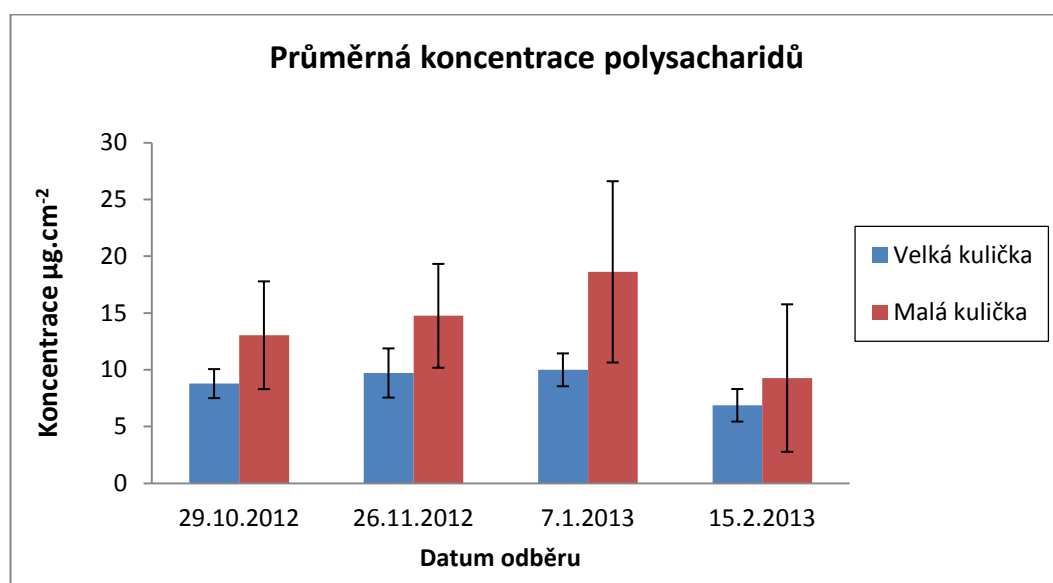
3.5. Analýza dat

Pro testování dat jsem použila software NCSS 2007. K vyhodnocení množství polysacharidů, proteinů, celkové organické hmoty a abundance bakterií biofilmu na různých kuličkách během celého výzkumu byla použita ANOVA. Vztahy mezi jednotlivými parametry byly analyzovány lineární regresí a korelací.

4. VÝSLEDKY

4.1. Koncentrace polysacharidů

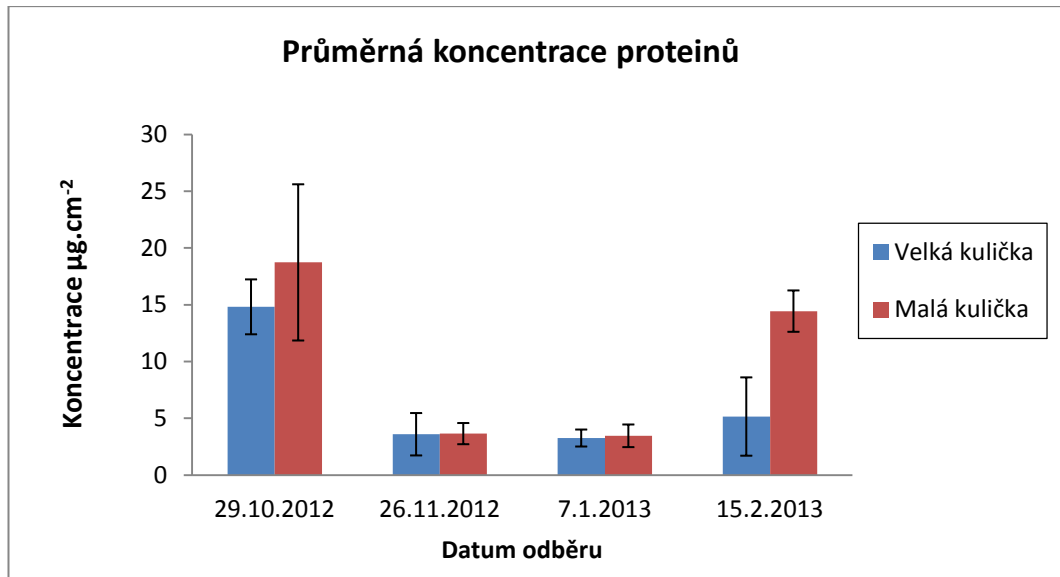
Hodnoty koncentrace polysacharidů narůstaly u kuličky M i V až do třetího měsíce inkubace. Největší nárůst byl pozorován během prvního měsíce. Po třech měsících růstu došlo k úbytku koncentrace polysacharidů. Průměrná hodnota koncentrace během celého výzkumu u kuličky M byla $13,73 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ a u kuličky V $8,70 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Statisticky signifikantně zde bylo prokázáno větší množství koncentrace na cm^2 u kuličky M (obr. 2).



Obrázek 2: Průměrná koncentrace polysacharidů biofilmu na různých kuličkách během čtyř odběrů

4.2. Koncentrace proteinů

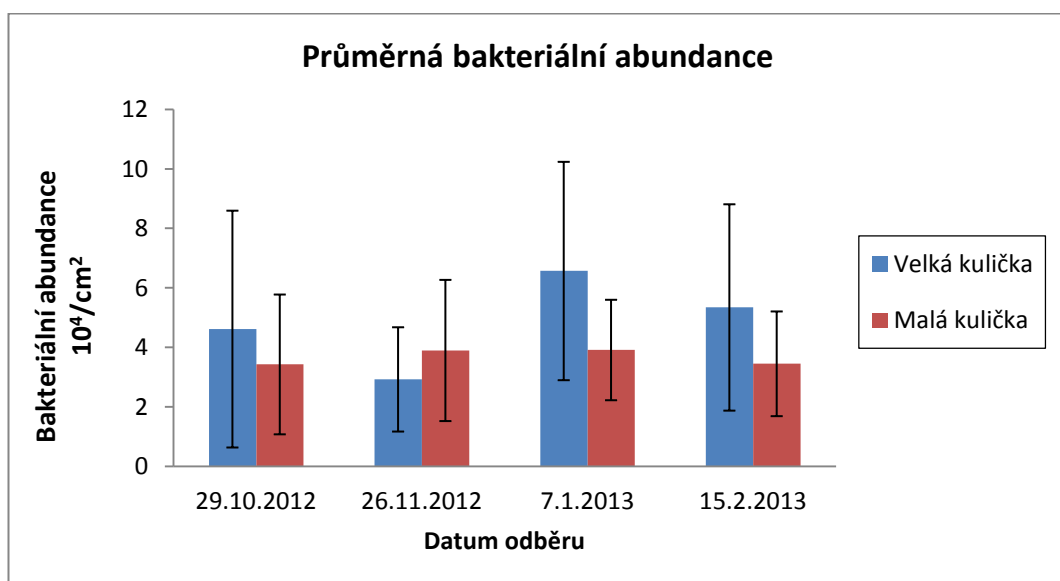
Nejvyšší nárůst koncentrace proteinů proběhl u obou kuliček během prvního měsíce inkubace. Druhý měsíc ovšem došlo k úbytku, který probíhal až do třetího měsíce výzkumu. Ve čtvrtém měsíci opět došlo k nárůstu koncentrace proteinů. Průměrná hodnota koncentrace během celého výzkumu byla u kuličky M $9,85 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ a u kuličky V $6,22 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Statisticky signifikantně zde bylo prokázáno větší množství koncentrace na cm^2 u kuličky M (obr. 3).



Obrázek 3: Průměrná koncentrace proteinů biofilmu na různých kuličkách během čtyř odběrů

4.3. Bakteriální abundance

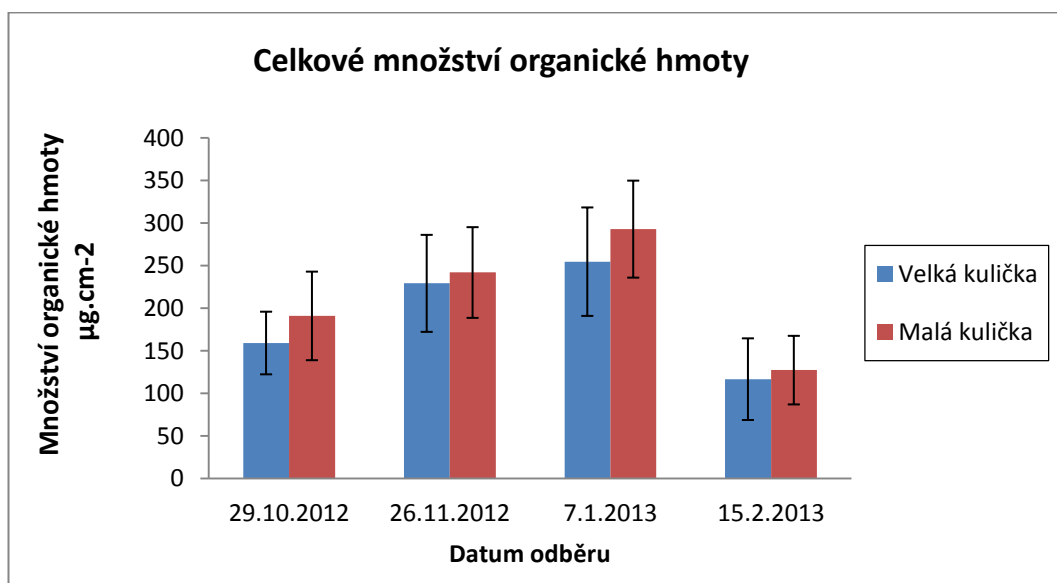
Nárůst počtu bakterií u kuličky M probíhal do třetího měsíce inkubace. Během čtvrtého měsíce došlo k úbytku bakterií. Největší nárůst proběhl během prvního měsíce. Kulička V vykazuje podobný růstový trend ovšem až u druhého měsíce, kdy došlo k úbytku bakteriální abundance. Průměrná hodnota bakteriální abundance během celého výzkumu u kuličky M byla $3,67 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ a u kuličky V $5,09 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Statisticky signifikantně zde nebylo prokázáno větší množství koncentrace na cm^2 u kuličky M ani u kuličky V (obr. 4).



Obrázek 4: Průměrná bakteriální abundance biofilmu na různých kuličkách během čtyř odběrů

4.4. Celkové množství organické hmoty

Růst organické hmoty probíhal u obou kuliček až do třetího měsíce inkubace, poté nastal její úbytek. Největší nárůst proběhl stejně jako u předchozích parametrů během prvního měsíce. Průměrná hodnota celkového množství organické hmoty během celého výzkumu byla u kuličky M $207,01 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ a u kuličky V $187,90 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Statisticky signifikantně zde nebylo prokázáno větší množství organické hmoty na cm^2 u kuličky M ani u kuličky V (obr. 5).

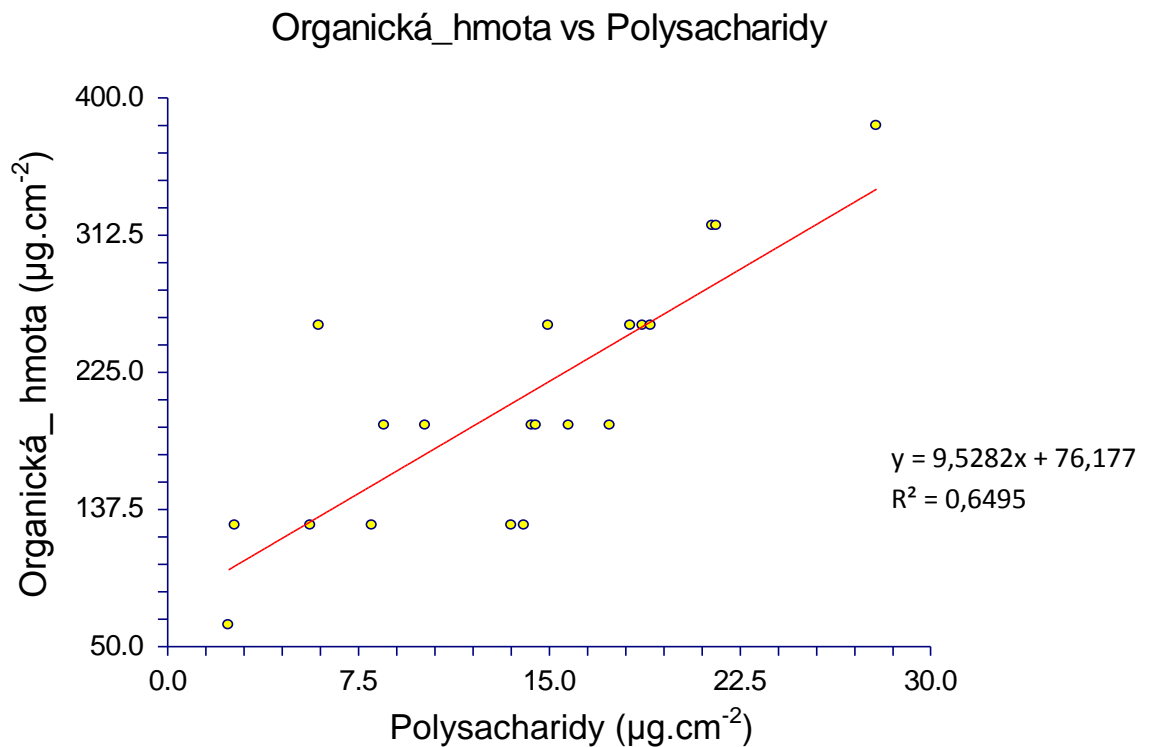


Obrázek 5: Celkové množství organické hmoty biofilmu na různých kuličkách během čtyř odběrů

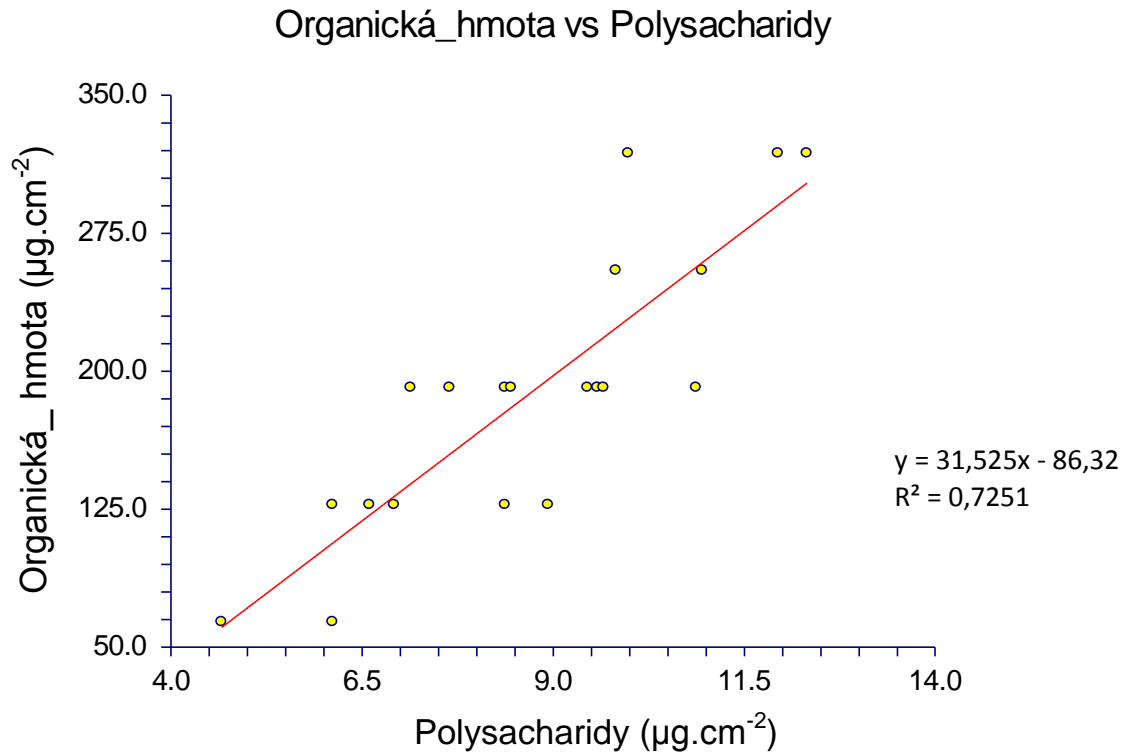
Znázornění množství jednotlivých složek biofilmu v rámci celého výzkumu je zobrazeno v příloze 2. U kuličky V se zastoupení proteinové složky pohybovalo od 1,23 do 9,27 %. Nejvyšší procentuální zastoupení měly proteiny v prvním měření. Zastoupení polysacharidové složky se pohybovalo v rozpětí od 3,90 do 5,88 %. Nejvyšší procentuální hodnota byla dosažena v posledním měření. U kuličky M se hodnoty proteinové složky pohybovaly v rozmezí od 1,17 do 11,33 %. Nejvyšší hodnota byla opět v posledním měření. Polysacharidová složka během celého výzkumu byla zastoupena v rozpětí od 6,09 do 7,27 %. Nejvyšší zastoupení bylo taktéž v posledním měření. Dominantní složku biofilmu u obou kuliček tvořila neidentifikovaná organická hmota.

4.5. Vztahy mezi parametry

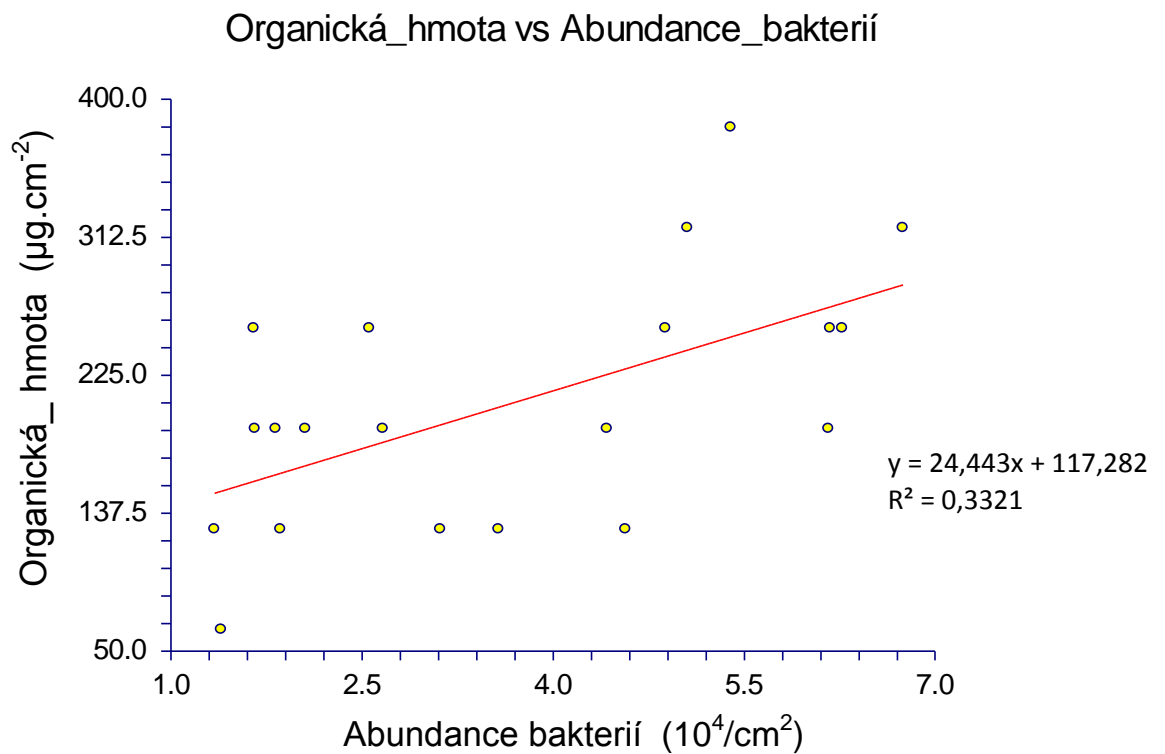
Při zkoumání vztahů mezi jednotlivými parametry byla statisticky signifikantně prokázána korelace mezi množstvím organické hmoty a koncentrací polysacharidů v biofilmu u obou kuliček ($p < 0,01$) (obr. 6, 7), dále mezi organickou hmotou a bakteriální abundancí u kuličky M ($p < 0,01$) (obr. 8), bakteriální abundancí a polysacharidy rovněž u kuličky M ($p < 0,01$) (obr. 9). Mezi ostatními parametry nebyl statisticky signifikantní vztah prokázán (Příloha 3).



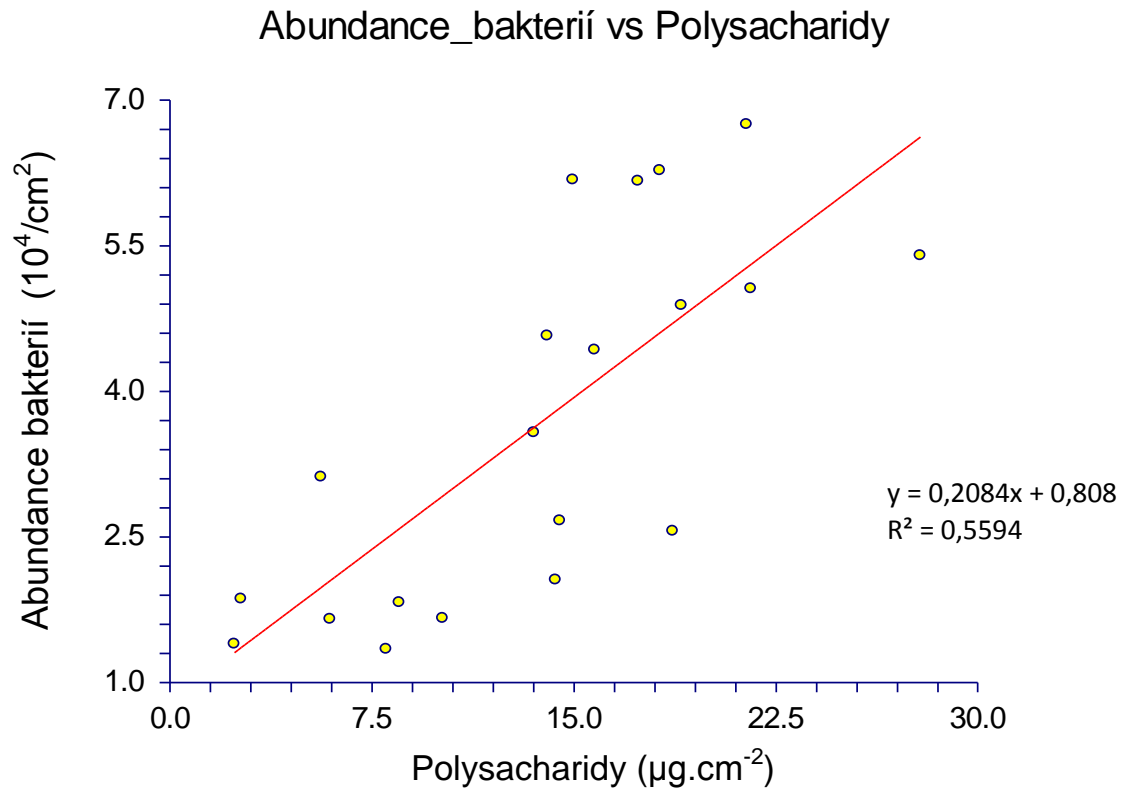
Obrázek 6: Vztah mezi koncentrací polysacharidů a organickou hmotou biofilmu u kuličky M



Obrázek 7: Vztah mezi organickou hmotou a koncentrací polysacharidů biofilmu u kuličky V



Obrázek 8: Vztah mezi organickou hmotou a bakteriální abundancí biofilmu u kuličky M



Obrázek 9: Vztah mezi bakteriální abundancí a polysacharidy biofilmu u kuličky M

5. DISKUSE

Cílem této práce bylo srovnat tvorbu biofilmu na dvou různě velkých skleněných kuličkách o průměru 5 mm a 10 mm pomocí zkoumaných parametrů (koncentrace polysacharidů, koncentrace bílkovin, abundance bakterií a celkové množství organické hmoty biofilmu). Dále bylo cílem této práce určit, která z kuliček je pro tvorbu biofilmu výhodnější a posoudit, který z výše uvedených parametrů by mohl být vhodným indikátorem růstu biofilmu. Signifikantně bylo prokázáno větší množství koncentrace polysacharidů a proteinů na cm^2 u kuličky M. U celkové organické hmoty nebylo statisticky prokázáno, zda je více $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ na kuličce M nebo V. Totéž zjištění bylo i pro bakteriální abundanci. Při porovnání parametrů mezi sebou byla zjištěna korelace mezi množstvím organické hmoty a koncentrací polysacharidů v biofilmu u obou kuliček, dále mezi organickou hmotou a bakteriální abundancí u kuličky M, bakteriální abundancí a koncentrací polysacharidů rovněž u kuličky M.

5.1. Koncentrace polysacharidů

Pro stanovení koncentrace polysacharidů na cm^2 jsem použila metodu dle Duboise. Metoda se zdá být spolehlivá a již delší dobu je hojně používána. Objevuje se nejen při zkoumání polysacharidů celého biofilmu (Romaní et al. 2008), ale i při detekování jednotlivých složek z exopolysacharidů (EPS) při porovnávání jednotlivých extrakčních metod EPS (Frølund et al. 1996, Comte et al. 2006, D'Abzac et al. 2010).

Koncentrace polysacharidů úzce souvisí s růstem biofilmu (Rulík et al. 2011). Dle získaných výsledků hodnoty koncentrace polysacharidů narůstaly až do třetího měsíce. Během prvního měsíce však došlo k největšímu nárůstu. Podobný trend zaznamenali ve své práci i Romaní et al. (2004), Romaní et al (2008) a Artigas et al (2012). Jejich koncentrace se však od mých naměřených hodnot lišily, mé hodnoty koncentrací byly vždy v průměru o 10 μg na cm^2 menší. Domnívám se, že hlavním důvodem proč se mé hodnoty lišily, je roční období, ve kterém můj výzkum probíhal. Většina z výše uvedených studií probíhala totiž během jara, kdy polysacharidy biofilmu dosahují maxima (Blenkinsopp et al. 1991). Po třech měsících růstu došlo k úbytku koncentrace polysacharidů. Tento stav můžeme vysvětlit několika způsoby. Nejvýznamnější vliv mohla mít neočekávaná povodeň, kdy převrstvením lahvíček sedimentem došlo k porušení biofilmu a odnosu vyprodukované hmoty. Dalším faktorem by mohla být také přítomnost predátorů (Sabater et al. 2002) nebo rozpad

biofilmu, který nastane po nasycení prostředí bakteriemi a kritickým nárůstem masy biofilmu (Rulík et al. 2011).

Statisticky signifikantně byla prokázána větší koncentrace polysacharidů na cm^2 u kuličky M, než u kuličky V. Tato skutečnost může být způsobena tím, že na kuličkách M byly větší bakteriální abundance než na kuličkách V (viz níže).

5.2. Koncentrace proteinů

Stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové je spektrofotometrická metoda, která využívá vazby barviva Coomassie Brilliant Blue G250 na proteinové molekuly. Tato metoda je díky své citlivosti a jednoduchosti široce užívána (Kodíček et al. 2000). Ve svých výzkumech ji používají např. Frølund et al. (1996) a Spáčil et al. (1998).

Dle získaných hodnot koncentrací proteinů nejvyšší nárůst proběhl během prvního měsíce. Druhý měsíc ovšem došlo k úbytku, který probíhal až do třetího měsíce výzkumu. Ve čtvrtém měsíci opět došlo k nárůstu koncentrace proteinů. Mé výsledky se lišily od růstového trendu, který uvádí Artigas et al. (2012), kdy koncentrace proteinů narůstala až do konce výzkumu. Mé zjištěné hodnoty byly opět nižší v průměru o 5–10 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, což si opět vysvětluji ročním obdobím, ve kterém byl můj výzkum prováděn. Jak uvádí Blenkinsopp et al. (1991), koncentrace proteinů v biofilmu dosahuje maxima během jara. Jelikož během čtvrtého měsíce došlo k nárůstu koncentrace proteinů, nemohu zde potvrdit vliv neočekávaných povodní na biofilm. Naopak zde mohl již nastat nový nárůst bakterií, jelikož zvýšení koncentrace proteinů by mělo signalizovat zvýšení bakteriální abundance (Rulík et al. 2011).

Statisticky signifikantně byla prokázána větší koncentrace proteinů na cm^2 u kuličky M než u kuličky V. Jelikož koncentrace proteinů v biofilmu v podstatě odráží množství bakterií, souvisí tato hodnota pravděpodobně s vyššími bakteriálními abundancemi (viz níže).

5.3. Bakteriální abundance

Ke stanovení počtu bakterií jsem použila fluorochrom DAPI, barvivo s modrou fluorescencí, které se přednostně váže na DNA (Porter a Feig 1980).

Růstový trend abundance bakterií u kuličky M byl mírně narůstající, tedy podobný růstovému trendu, který pozorovali Romaní a Sabater (1999), Romaní (2004), Rulík et al. (2007), Artigas et al. (2012) a Proia et al. (2012). U kuličky V tomu tak nebylo, během druhého měsíce došlo k poklesu abundance bakterií. Počty bakterií se

v případě obou velikostí kuliček lišily od výsledků výše uvedených autorů. Mé výsledky byly v průměru 10^3 krát menší. Zároveň také nebyl prokázán předpoklad, že více bakterií se vyskytuje na menším substrátu, což uvádí ve svých studiích Meyer et al. (1987), Axmanová et al. (2006) a De Troch et al. (2006). Abundance bakterií se mezi oběma velikostmi kuliček statisticky signifikantně nelišily. Výsledky totiž v jednotlivých měsících měly velkou variabilitu, což mohlo být způsobeno nepředvídatelnou chybou během zpracování vzorků, např. sonikace nebyla u obou kuliček stejně účinná nebo nedošlo k navázání DAPI na všechny bakterie. Domnívám se, že hlavním důvodem odtrhávání bakterií z biofilmu byla povodeň, dále pak rozpad biofilmu, způsobený nasycením prostředí bakteriemi a kritickým nárůstem hmoty biofilmu (Rulík et al. 2011).

5.4. Celkové množství organické hmoty

Dle mých výsledků růst organické hmoty probíhal až do třetího měsíce, po němž nastal její úbytek. Tento úbytek, jak už bylo zmíněno v předchozích parametrech, bych přisuzovala nečekané povodni nebo rozpadu biofilmu. Největší nárůst proběhl stejně jako u předchozích parametrů během prvního měsíce, poté nárůst nebyl tak veliký. Organickou hmotu, avšak přepočítanou na celkový organický uhlík, zkoumali Hubáčková a Jindra (1998) a Rulík et al. (2007). Obě tyto práce zaznamenaly postupný nárůst hodnot. Hodnoty mnou naměřené byly opět nižší než hodnoty, které uvádí Hubáčková a Jindra (1998), v průměru o $0,07 \text{ mg.cm}^{-2}$. Zároveň byly vyšší než hodnoty uváděné Rulíkem et al. (2007), v průměru o $100 \text{ } \mu\text{g.cm}^{-2}$. Většinu organické hmoty tvořila neidentifikovaná složka, což je v souladu s výsledky Koutného a Rulíka (2007). Množství celkové organické hmoty se na obou kuličkách statisticky signifikantně nelišilo, což dle mého názoru souvisí s předchozími parametry.

5.5. Vztahy mezi parametry

Statistickou analýzou byla zjištěna korelace mezi množstvím organické hmoty a koncentrací polysacharidů v biofilmu u obou kuliček, dále mezi organickou hmotou a bakteriální abundancí u kuličky M, bakteriální abundancí a koncentrací polysacharidů rovněž u kuličky M. U ostatních nebyly vztahy prokázány.

Jelikož u množství organické hmoty a koncentrací polysacharidů byla prokázána korelace u obou kuliček, považovala bych tyto dva parametry za vhodné indikátory růstu biofilmu. Obecně jsou polysacharidy jednou složkou organické hmoty. Proto čím

větší bude koncentrace polysacharidů, tím větší množství organické hmoty bude biofilm obsahovat.

I když je bakteriální abundance ve studiích zjišťována velmi často, z mých zjištěných výsledků vystupuje jako méně vhodný indikátor růstu biofilmu. Sice byla prokázána korelace mezi bakteriální abundancí a koncentrací polysacharidů a mezi organickou hmotou a bakteriální abundancí, ale pouze u kuličky M. Proto tento parametr nepovažuji za nejvhodnější.

Proteiny nepovažuji za vhodný indikátor pro růst biofilmu. Předpokládala jsem vztah mezi koncentrací proteinů a bakteriální abundancí. Z mých zjištěných výsledků však tento vztah nevyplývá.

5.6. Velikost substrátu

Studie, zaměřující se na tvorbu biofilmu na různě velkých substrátech, se zabývají pouze bakteriální abundancí. Převládajícím názorem je, že na substrátu o menším průměru se vyskytuje více bakterií než na substrátu o průměru větším (Meyer et al. 1987, Axmanová et al. 2006, De Troch et al. 2006). Mé výsledky však tento předpoklad nepotvrdily.

Při statistické analýze ostatních parametrů byla zjištěna průkazně větší koncentrace polysacharidů a proteinů u kuličky M. Co se týká organické hmoty, nebyl prokázán rozdíl mezi kuličkami M a V. Jelikož považuji za hlavní indikátory růstu koncentraci polysacharidů a celkové množství organické hmoty, a jako méně vhodný indikátor bakteriální abundancí, nemohu z mých výsledků určit, který ze substrátů je pro růst biofilmu vhodnější.

6. SOUHRN

Biofilmy představují klíčový prvek v procesu říčního samočištění. Dále mají klíčovou roli v koloběhu živin a demineralizaci v toku. Cílem této práce bylo srovnat tvorbu biofilmu na skleněných kuličkách o průměru 5 mm (M) a 10 mm (V). Následně si práce kladla za cíl posoudit, který ze substrátů je vhodnější pro vývoj biofilmu a který ze zkoumaných faktorů by byl vhodný indikátorem detekce růstu biofilmu.

V potoku Sitka, nacházejícím se 6 km od Olomouce, bylo inkubováno 20 lahvíček. Každá lahvíčka obsahovala celkem 150 kuliček, z toho 30 bylo kuliček V. Proběhly čtyři odběry, při kterých bylo odebráno pokaždé 5 lahvíček. U každé lahvíčky a každé velikosti kuliček zvlášť bylo provedeno vyhodnocení zkoumaných parametrů (koncentrace polysacharidů, koncentrace proteinů, celkové množství organické hmoty a bakteriální abundance biofilmu). Všechny zkoumané parametry byly vyjádřeny na cm^2 . Dle získaných výsledků koncentrace polysacharidů na kuličky V i M narůstala až do třetího měsíce, po kterém nastal úbytek koncentrace. Zároveň byla prokázána signifikantně větší koncentrace na cm^2 u kuličky M. Stejný růstový trend vykazovalo i množství organické hmoty u obou kuliček, a také bakteriální abundance u kuličky M. Signifikantně zde nebylo prokázáno větší množství bakteriální abundance a množství organické hmoty u kuličky M na cm^2 . Úbytek parametrů během posledního měsíce byl zřejmě způsoben kombinovaným vlivem nečekané povodně a rozpadu biofilmu. Dále je tu také možnost přítomnosti predátorů. Nízké hodnoty jednotlivých parametrů byly patrně způsobeny roční dobou. Růstový trend koncentrace proteinů u obou kuliček a bakteriální abundance kuličky V vykazovaly jiný trend, než je uváděn v literatuře. Zároveň u koncentrace proteinů bylo signifikantně prokázáno větší množství u kuličky M.

Dle statistického vyhodnocení dat byly určeny za spolehlivé indikátory růstu biofilmu tyto dva parametry: (i) koncentrace polysacharidů a (ii) množství celkové organické hmoty. Bakteriální abundance byla vyhodnocena jako méně spolehlivý indikátor růstu biofilmu. Naprosto nevhodným indikátorem se zdá být koncentrace proteinů. Co se týče vhodnosti substrátu pro růst biofilmu, nemůže být řečeno, zda biofilm lépe roste na substrátu o menším průměru (což byl předpoklad zjištěný několika studiemi) než na substrátu o větším průměru. Dle mých výsledků nemá průměr substrátu vliv na růst biofilmu.

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.
- 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.
- Axmanová Š., Koutný J., Cupalová J., Rulík M. (2006): Bacterial growth and community composition in fractions of dissolved organic carbon of different molar mass from interstitial water. *Folia Microbiol.*, 51: 439–444.
- 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.
- Bradford M. M. (1976): Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248–254.
- 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., Lappin-Scott M. (eds.) (2003): *Microbial Biofilms*, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Costerton J. W. (2004): A short history of the development of the biofilm concept. In: *Microbial Biofilms*, Ghannoum MA, 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., Chepurinov 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: 350–6.
- 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.
- Horáková M., Lischke P., Grunwald A. (1989): *Chemické a fyzikální metody analýzy vod*. SNTL, Praha.
- Hubáčková J., Jindra J. (1998): Změny kvality pitné vody při dopravě – informace o výsledcích úkolu. Sborník semináře AOV B, Praha 1998, s. 13–19.
- Jenkinson H. F., Lappin-Scott H. M. (2001): Biofilms adhere to stay. *Trend in Microbiol.*, 9: 9–10.
- Kodíček M., Valentová O. (eds.) (2000): *Laboratorní cvičení z biochemie*. Nakladatelství Olomouc, Olomouc.
- 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.
- Liu H., Fang H.H.P. (2002): Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *Biotechnol.*, 95: 249–256.
- McSwain B. S., Irvine R. L., Hausner M., Wilderer P. A. (2005): Composition and Distribution of Extracellular Polymeric Substances in Aerobic Flocs and Granular Sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 1051–1057.
- Meyer J. L., Edwards R. T., Risley R. (1987): Bacterial growth on dissolved organic carbon from a blackwater river. *Microb. Ecol.*, 13: 13–29.
- Porter J., Feig Y. (1980): The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, 25, 5: 943–947.
- Proia L., Romaní A. M., Sabater S. (2012): Nutrients and light effects on stream biofilms: a combined assessment with CLSM, structural and functional parameters. *Hydrobiologia*, 695: 281–291.
- Ramasamy P., Zhang X. (2005): Effects of shear stress on the secretion of extracellular polymeric substances in biofilms. *Water Sci. Technol.*, 52: 217–223.
- Romaní A. M., Sabater S. (1999): Effect of primary producers on the heterotrophic metabolism of a stream biofilm. *Freshw. Biol.*, 41: 729–736.

- Romaní A., 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.
- Romaní 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.
- 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.
- Sabater S., Romaní A. M. (1996): Metabolic changes associated with biofilm formation in an undisturbed Mediterranean stream. *Hydrobiologia*, 335: 107–113.
- Sabater S., Guasch H., Romaní A. M., Muñoz I. (2002): The effect of biological factors on the efficiency of river biofilms in improving water quality. *Hydrobiologia*, 469: 149–156.
- Schiller D. V., 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.
- Schindler J. (2008): Ze života bakterií. Academia, Praha.
- Sims I. M., Middleton K., Lane A. G., Cairns A. J., Basic A. (2000): Characterization of extracellular polysaccharides from suspension cultures of members of the poaceae. *Planta*, 210: 261–268.
- Spáčil R., Rulík M. (1998): Measurements of proteins in the hyporheic zone of Sitka stream, Czech Republic. *Acta Univ. Palacki. Olomouc. Fac. rer. nat., Biol.*, 36: 75–82.
- Sutherland I. W. (2001b): The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.*, 9,5: 222–227.
- Tarjányi-Szikora S., Oláh J., Makó M., Palkó G., Barkács K., Záray 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.
- Zhang X., Bishop P. L., Kupferle M. J. (1998): Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. *Water Sci. Technol.*, 37: 345–348.

8. PŘÍLOHY

Příloha 1: Obrazová příloha

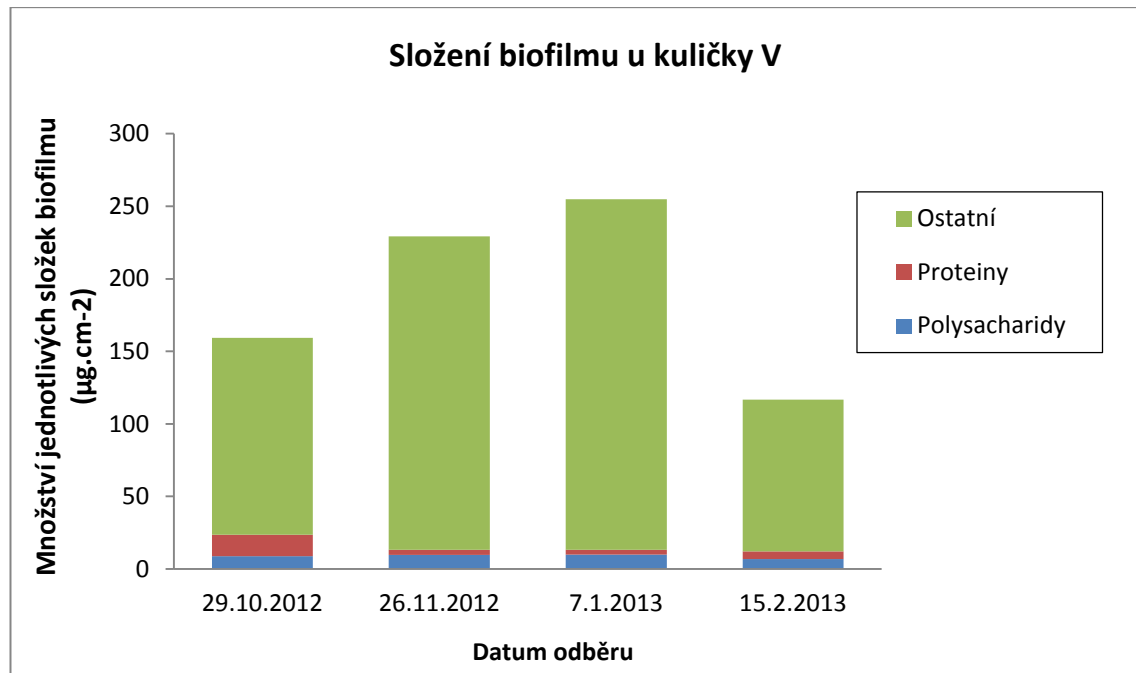


Obsah lahvičky po prvním měsíci inkubace

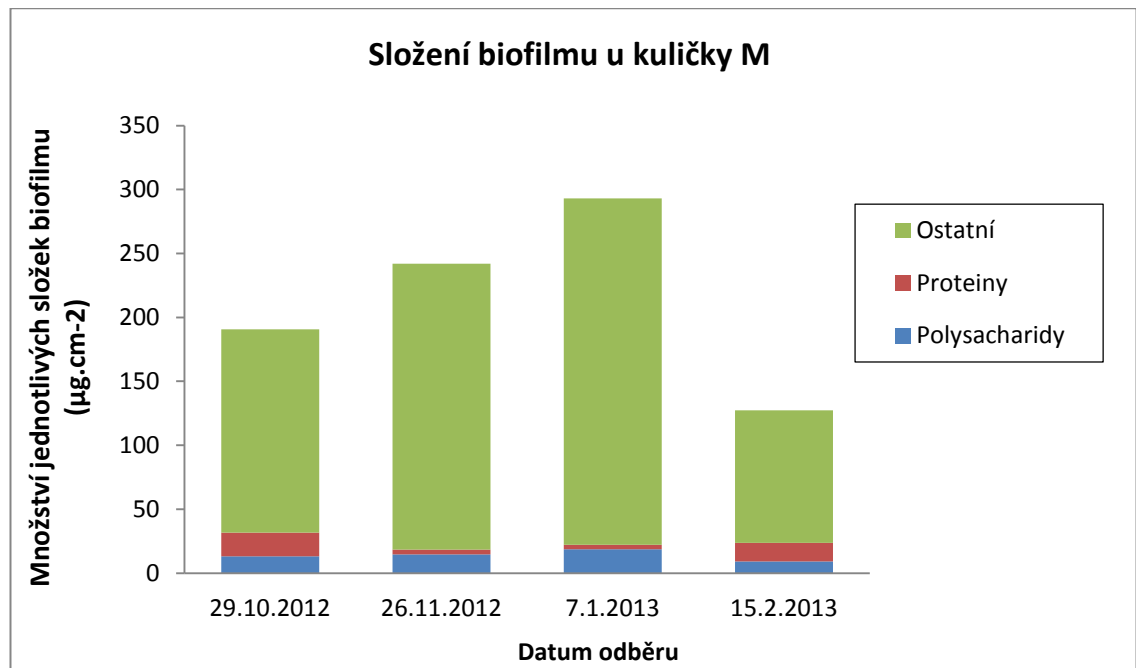


Obsah lahvičky po čtvrtém měsíci inkubace

Příloha 2: Zastoupení jednotlivých složek biofilmu během experimentu

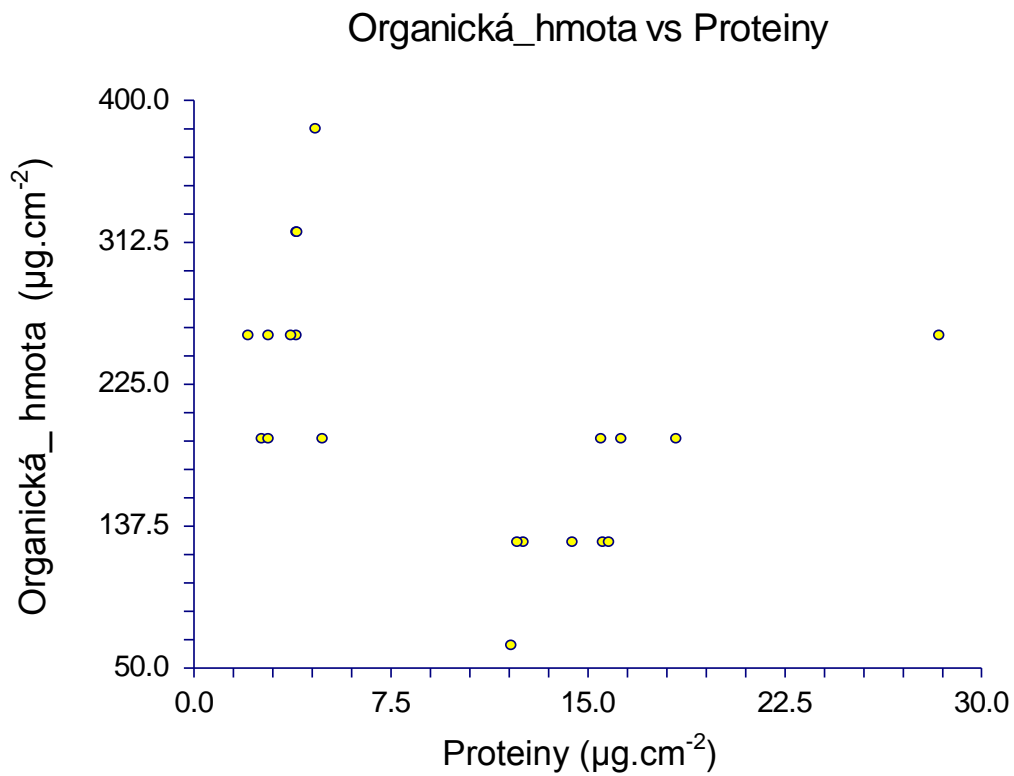


Zastoupení jednotlivých složek biofilmu během celého experimentu u kuličky V

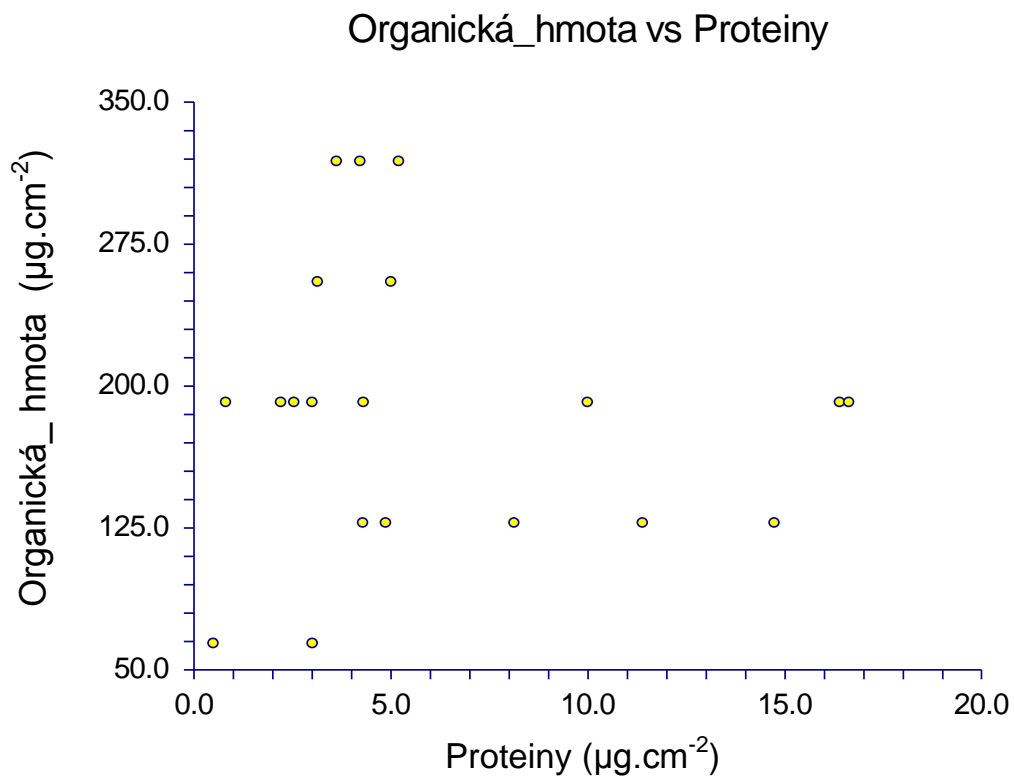


Zastoupení jednotlivých složek biofilmu během celého experimentu u kuličky M

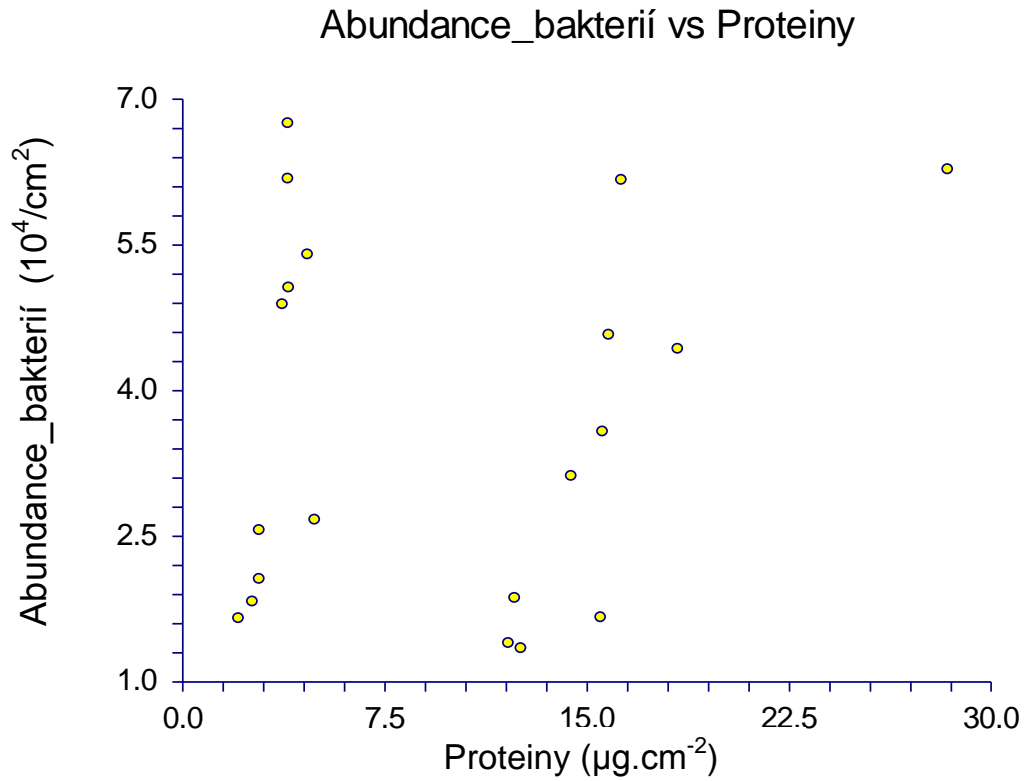
Příloha 3: Neprůkazné vztahy mezi zkoumanými parametry



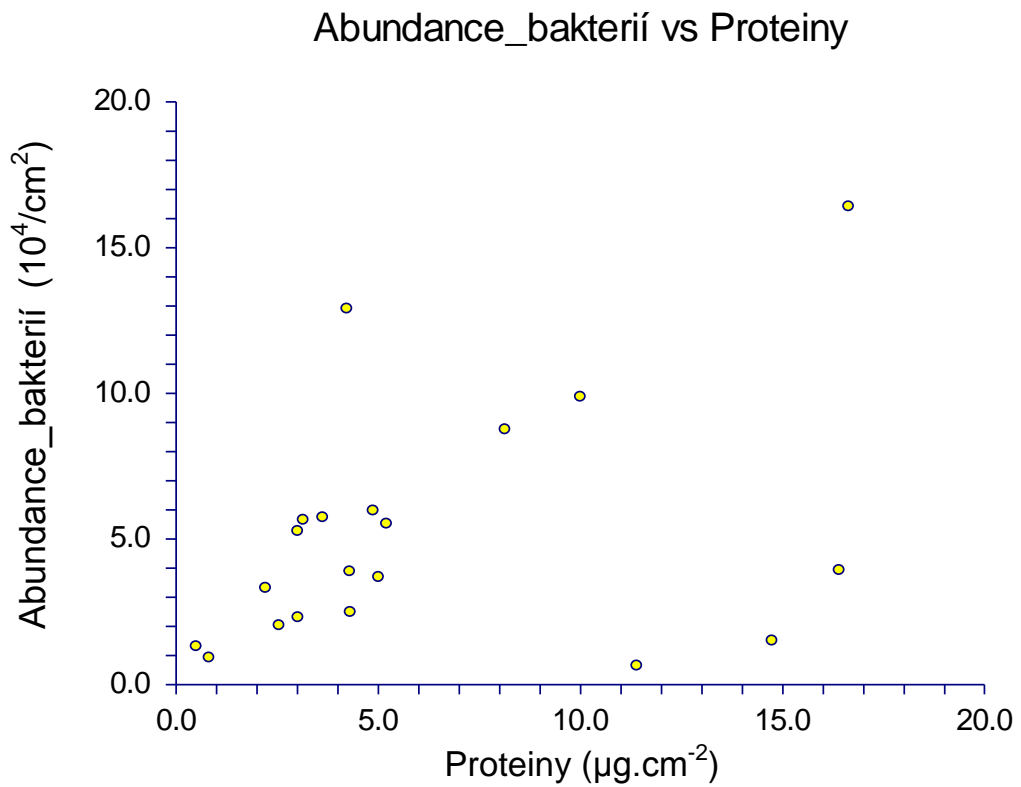
Vztah mezi proteiny a organickou hmotou biofilmu u kuličky M



Vztah mezi organickou hmotou a proteiny biofilmu u kuličky V

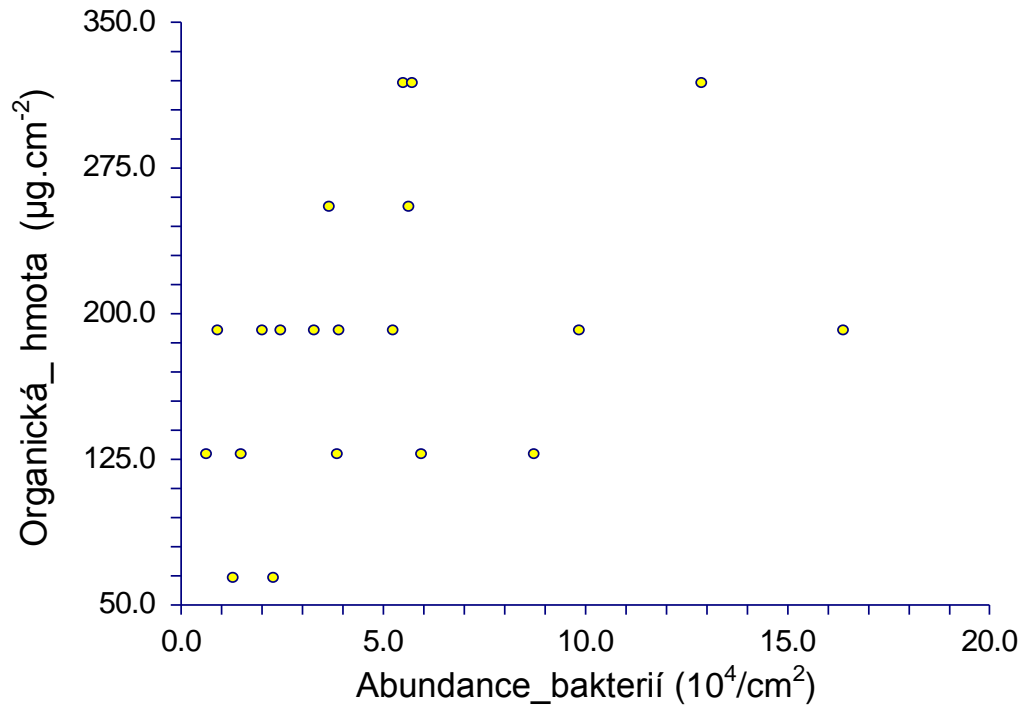


Vztah mezi bakteriální abundancí a proteiny biofilmu u kuličky M



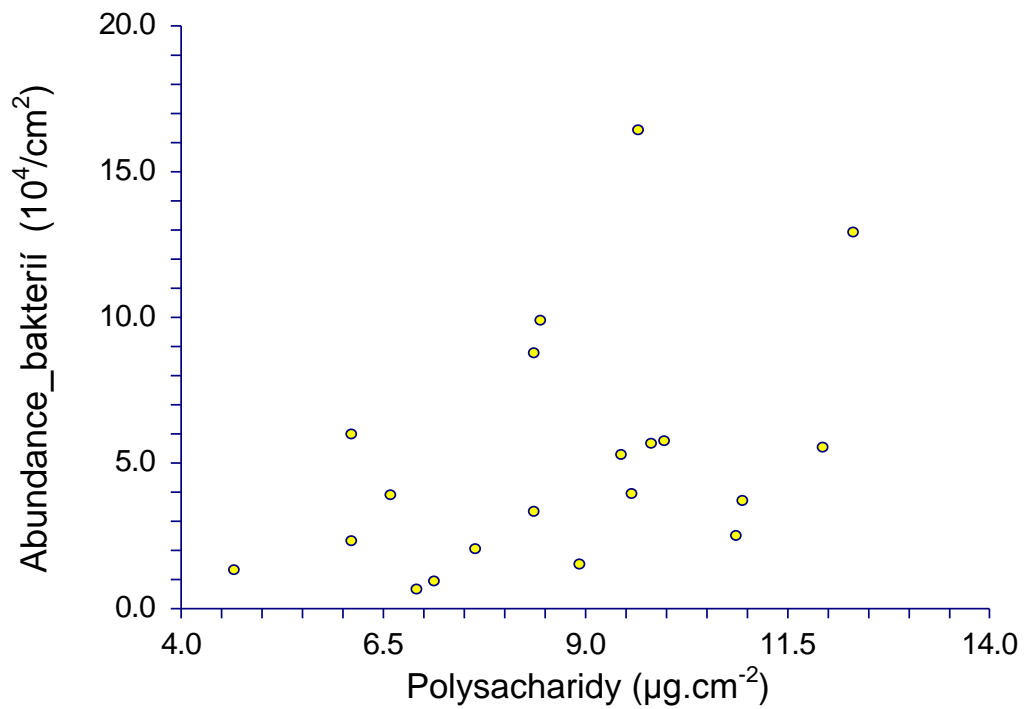
Vztah mezi bakteriální abundancí a proteiny biofilmu u kuličky V

Organická_hmota vs Abundance_bakterií



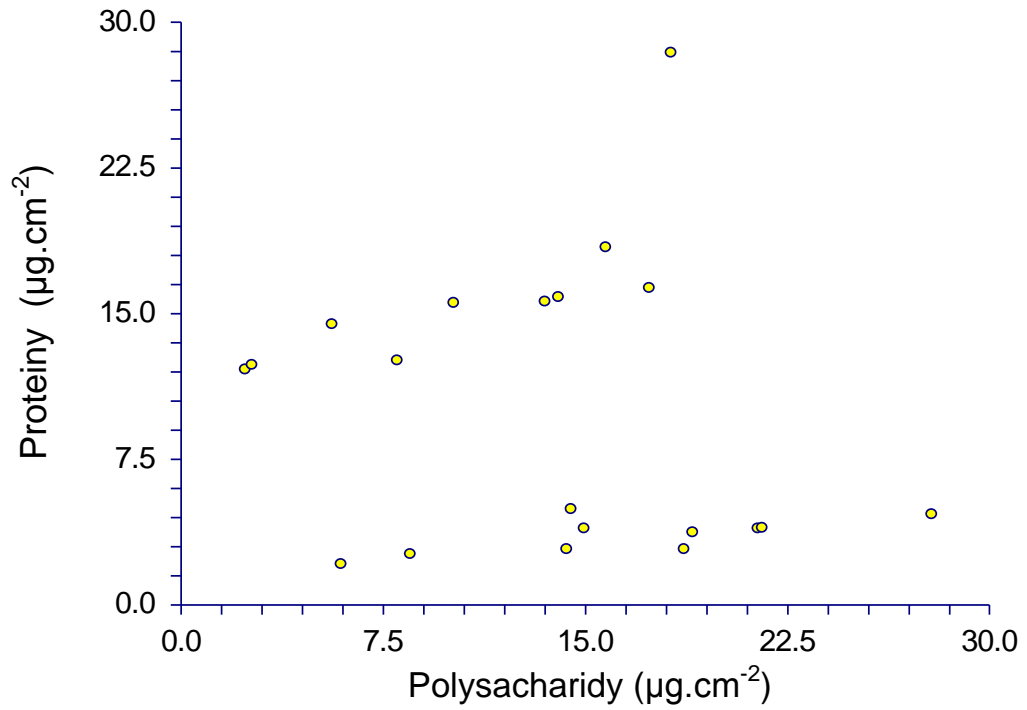
Vztah mezi organickou hmotou a bakteriální abundancí biofilmu u kuličky V

Abundance_bakterií vs Polysacharidy



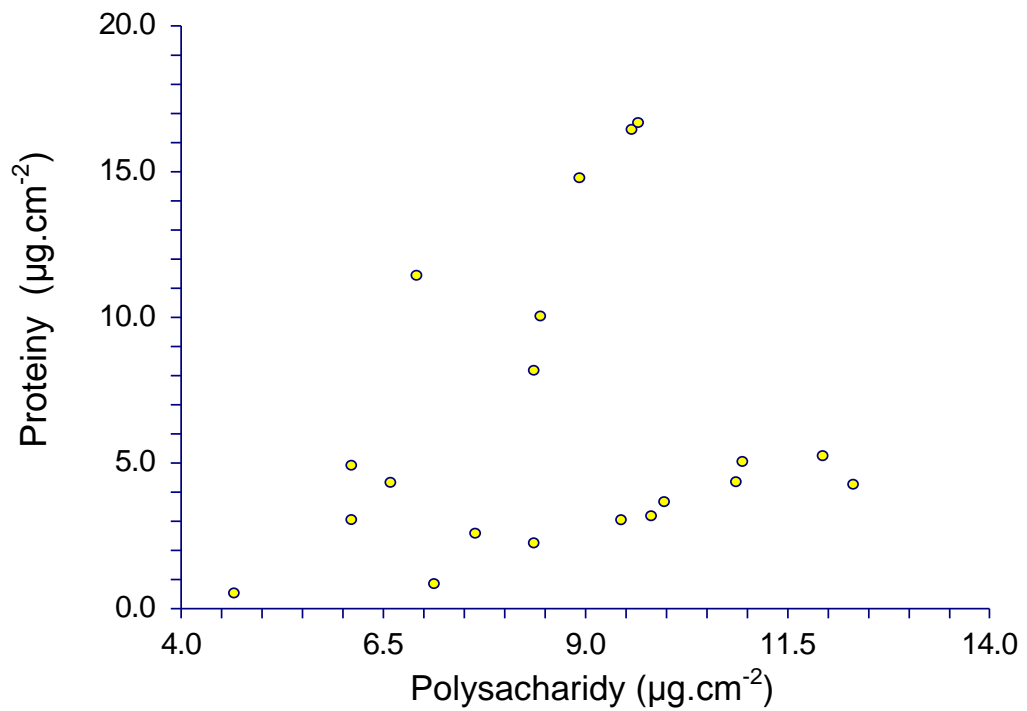
Vztah mezi bakteriální abundancí a polysacharidy biofilmu u kuličky V

Proteiny vs Polysacharidy



Vztah mezi proteiny a polysacharidy biofilmu u kuličky M

Proteiny vs Polysacharidy



Vztah mezi proteiny a polysacharidy biofilmu u kuličky V