

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Symbiotické mikroorganismy mechovky
Pectinatella magnifica

Diplomová práce

Autor práce: Olga Svobodová

Vedoucí práce: prof. Ing. Eva Vlková, Ph.D.

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci „Symbiotické mikroorganismy mechovky *Pectinatella magnifica*“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v diplomové práci a uvedeny v seznamu literatury na konci. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne

Poděkování

Ráda bych zde poděkovala vedoucí své diplomové práce prof. Ing. Evě Vlkové, Ph.D., za cenné připomínky, rady a trpělivost při psaní diplomové práce. V neposlední řadě děkuji celé své rodině a přátelům za podporu a trpělivost při zpracování tohoto textu.

Souhrn

Mechovky (*Bryozoa*) jsou sladkovodní přisedlí živočichové, kteří vytvářejí kolonie, často velkých rozměrů. Bochnatka americká (*Pectinatella magnifica*) pochází z oblasti Severní Ameriky. Na území České republiky byla poprvé objevena v Labi u Litoměřic v roce 1922. *Pectinatella magnifica* vytváří kulovité kolonie. Potravou je drobný plankton a organický detrit. Jako podklad pro kolonie slouží různé druhy vodních rostlin, jako například ponořené větve vrb a olší. *Pectinatella magnifica* je teplomilný druh, vyžadující teplotu okolo 20 °C. *Pectinatella magnifica* je součástí sladkovodních společenstev. Její přítomnost nezvyšuje znečištění ani nepůsobí problémy s kvalitou vody.

Vzhledem k tomu, že v mořských mechovkách je známý častý výskyt symbiotických bakterií, předpokládali jsme, že takové bakterie budou přítomny i v koloniích *Pectinatella magnifica*. Během let 2012–2015 byly ze 4 lokalit v jižních Čechách odebrány vzorky kolonií *Pectinatella magnifica*. Odebírala se vždy povrchová vrstva kolonie bochnatky a rosolovitá hmota kolonie bochnatky zvlášť. Současně se vždy ze všech stanovišť odebrala okolní voda. Na základě literárních údajů byla sestavena kultivační média pro stanovení symbiotických bakterií. Byla navržena celkem 3 média, ale z prvních výsledků se ukázalo, že pro kultivaci a izolaci co nejrozmanitějšího spektra bakterií se nejvíce hodí „Yeast extract“ agar (Oxoid) s přídavkem tryptofanu a glukózy. Kultivace probíhala za aerobních podmínek pro stanovení aerobních bakterií. Další byla anaerobní kultivace, při které byly stanoveny jak striktně anaerobní, tak fakultativně anaerobní bakterie. Získaná data byla statisticky zpracována. Rozdíly skupin aerobních, fakultativně anaerobních a striktně anaerobních bakterií v jednotlivých typech vzorků byly porovnány v programu STATISTICA 12 metodou ANOVA. V koloniích *Pectinatella magnifica* převládaly aerobní bakterie, následně pak fakultativně anaerobní bakterie a nejméně striktně anaerobní bakterie ve všech typech vzorků. Celkově bylo nalezeno nejvíce bakterií v povrchové vrstvě kolonie bochnatky, o něco méně pak v rosolovité hmotě kolonie bochnatky a nejnižší počet byl zaznamenán v okolní vodě. Počet nalezených bakterií ve vodě nijak nekoreluje s počtem nalezených bakterií v *Pectinatella magnifica*. Doposud nebyla zjištěna žádná závislost v počtu bakterií a v termínech odběrů a nebyla zaznamenána ani žádná dynamika během jednotlivých let.

Klíčová slova: *Pectinatella magnifica*, mechovky, symbiotické mikroorganismy, kultivační stanovení

Summary

Bryozoans (*Bryozoa*) are sessile fresh-water animals that form colonies, dimensions of these usually being very large. One of bryozoan, *Pectinatella magnifica*, is a freshwater and colony-forming animal, native to North America. In Czech Republic, the species was first discovered in the Elbe River near Litoměřice in 1922. *Pectinatella magnifica* form globular colonies. *Pectinatella magnifica* is a thermophilous species that requires a temperature of about 20 °C and forms part of freshwater communities. *Pectinatella magnifica* presence has not increase pollution or cause water quality problems.

The marine bryozoans are known for frequent occurrence of symbiotic bacteria, we assumed that these bacteria are also present in the colonies of *Pectinatella magnifica*. The bacterial diversity of *Pectinatella magnifica* colonies sampled from pounds in South Bohemia during the summer season in years 2012–2015 was investigated. The superficial structures of *Pectinatella magnifica* colonies and the inner galled mass of *Pectinatella magnifica* colonies were collected separately. Simultaneously water samples were also taken. The bacterial counts were determined after cultivation on modified yeast extract-tryptone agar (Oxoid) supplemented with glucose. The cultivation was under anaerobic conditions for the determination of aerobic bacteria and anaerobic cultivation, in which were determined strictly anaerobic and facultative anaerobic bacteria. The obtained data were statistically processed. Differences between aerobic, facultative anaerobic, and strictly anaerobic bacteria in different types of samples were compared in program STATISTICA 12 by method ANOVA. Higher counts were found in the superficial structures of *Pectinatella magnifica* colonies that in the inner gelled mass. Neither a trend in bacterial numbers at the individual site during the season, nor correlation between bacterial counts in *Pectinatella magnifica* and the surrounding water were observed.

Key words: *Pectinatella magnifica*, bryozoans, symbiotic microorganisms, cultivation

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Literární přehled	9
2.1 Systematické zařazení <i>Pectinatella magnifica</i>	9
2.2 Vývojová charakteristika skupiny <i>Bryozoa</i>	9
2.3 Morfologie a anatomie skupiny <i>Bryozoa</i>	10
2.4 Ekologie sladkovodní skupiny <i>Bryozoa</i>	14
2.5 Složení bochnatky americké (<i>Pectinatella magnifica</i>).....	15
2.6 Biologie a ekologie bochnatky americké (<i>Pectinatella magnifica</i>).....	15
2.7 Metody izolace a identifikace mikroorganismů.....	16
2.7.1 Kultivační metody	17
2.7.1.1 Kultivace v tekutých médiích	17
2.7.1.2 Kultivace na pevných médiích.....	18
2.7.2 Identifikace bakterií pomocí konfirmačních testů.....	19
2.7.3 Molekulárně-biologické metody	20
2.7.3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	21
2.7.3.2 Gelová elektroforéza v teplotním/denaturačním gradientu (T/DGGE)	24
2.7.3.3 Sekvenace	28
2.7.4 Detekce bakterií pomocí biochemických metod	29
2.8 Symbiotické mikroorganismy mechovců (<i>Bryozoans</i>).....	30
2.8.1 <i>Pseudoalteromonas</i>	32
2.8.2 <i>Alteromonas</i>	33
2.8.3 <i>Shewanella</i>	33
2.8.4 <i>Vibrio</i>	33

2.8.5 <i>Bacillus</i>	34
2.8.6 <i>Psychrobacter</i>	34
3. Hypotéza	35
4. Cíl práce	35
5. Materiál a metody	36
5.1 Popis vzorků a lokalit	36
5.2 Stanovení bakterií	37
5.3 Statistická analýza	38
6. Výsledky	39
7. Diskuse	55
8. Závěr	61
9. Seznam použité literatury	62

1. Úvod

Mechovky jsou přisedlí vodní živočichové, kteří vytvářejí kolonie, někdy i velkých rozměrů. K dnešnímu dni je známo kolem 4 500 recentních druhů a 1 500 fosilních forem. Jen asi 50 druhů, což je menší část, se vyskytuje v brakické a sladké vodě. Mechovky spíše na první pohled připomínají rostliny nebo želatinové útvary. Bohužel nejsou příliš známé, přesto tvoří nedílnou součást moří a sladkých vod.

Bochnatka americká (*Pectinatella magnifica*) je koloniální sladkovodní živočich, který pochází z oblasti Severní Ameriky. V České republice byla poprvé nalezena v roce 1922 v Labi u Litoměřic. Dále pak byla v průběhu celého 20. století nalézána ve Vltavě a v Labi. Následně pak kolonie mechovek byly nalezeny na inundačním území Lužnice, konkrétně na stále těžené pískovně Cep. Odtud se již masivnějším způsobem tento organismus rozšířil na celé území CHKO Třeboňsko.

I přesto, že je biomasa kolonií v době maximálního rozvoje *Pectinatella magnifica* velice nápadná, tento druh není nijak zvlášť sledován a o jeho vlivu na ekologii a ekosystém je známo jen velmi málo. S tím bohužel souvisí i to, že informace a údaje o skupině sladkovodních mechovek na našem území jsou velmi často staršího data a je jich jen poskrovnu. Tento organismus se šíří do vodních nádrží poměrně rychle a jeho postup má tak charakter invaze, tím je jeho poznání a zachycení vlivu na ekosystém velmi aktuální.

2. Literární přehled

2.1 Systematické zařazení *Pectinatella magnifica*

(podle Mañase, 2004)

kmen *Bryozoa* – mechovky

třída *Phylactolaemata* – mechovky

řád *Plumatellida*

čeleď *Pectinatellidae*

druh bochnatka americká (*Pectinatella magnifica*)

2.2 Vývojová charakteristika skupiny *Bryozoa*

Mechovky (*Bryozoa*) jsou přisedlí koloniální živočichové a mají nejasný fylogenetický vývoj. Bývali (v některých publikacích dosud jsou) řazeni pod podkmen *Ectoprocta*. Společně s podobně vypadajícími koloniálními živočichy *Entoprocta* jsou řazeni do kmene *Bryozoa* (Šetlíková et al., 2005). Díky obrvenému lophophoru jsou následně řazeni s chapadlovkami (*Phoronida*), ramenonožci (*Brachiopoda*) a také s mechovnatci (*Entoprocta* syn. *Bryozoa*) do skupiny *Lophophorata*. Chapadlovcí (*Lophophorata*) jsou bilaterální přisedlí živočichové, kteří mají kolem ústního otvoru obrvený věnec chapadel, tzv. lophophor. Molekulárně-biologické studie nedávno ukázaly, že *Lophophorata* vytváří bez vazby na druhoústé živočichy samostatnou skupinu. Všichni jedinci kmene *Bryozoa* vznikají pučením. Molekulární analýzy nenašly blízké příbuzné mechovců, a tak je zařadily do skupiny *Lophotrochozoa* spolu se skupinou *Platyzoa*, chapadlovek a ramenonožců (Zrzavý a Hošek, 2006).

Rozlišují se dvě fylogenetické linie kmene *Bryozoa* – skupiny *Gymnolaemata* a *Phylactolaemata*. Skupina *Gymnolaemata* je mořská větev. Jen několik druhů je druhotně sladkovodních. Mají lophophor kruhovitého tvaru. Jejich druhová diverzita je velká a obsahuje až několik tisíc druhů. Skupina *Phylactolaemata* má ektoderm krytý kutikulou, tvar lophophoru je podkovovitý a zahrnuje sladkovodní zástupce (Korábek, 2009).

2.3 Morfologie a anatomie skupiny *Bryozoa*

Mechovky (*Bryozoa*) jsou sladkovodní a mořské přisedlé organismy a vytvářejí kolonie různých tvarů. Kolonie je vytvořena ze zooidů (jedinců), kteří vzniknou pučením z mateřského jedince. Uvnitř kolonie jsou zooidi propojeni mezenchymatickým provazcem (funiculus), který je v těle zooida přichycen ke stěně žaludku. Většina druhů zooidů je uzavřena v chitinovém nebo ve vápenatém ektodermálním obalu (zooecium). Zooecia mohou vytvářet souvislou vnější kostru zvanou zoarium, tak, že do sebe dokážou navzájem přecházet. Díky bazální zřasené plošce (epithekou) jsou tyto kolonie schopny přisedat k podkladu. Samotné tělo zooida je vakovitého nebo válcovitého tvaru a obsahuje všechny orgánové soustavy. Tělo zooida má mikroskopickou velikost. Pokud jsou normálně vyvinutí a tvoří tudíž polymorfni kolonie, tak je označujeme jako autozooidy. Funkčně specializované jedince s redukovanou tělní schránkou nazýváme heterozooidy. Autozooidi se stávají potravou pro heterozooidy. K připevnění kolonie k podkladu slouží kenozooidi a gonoeecia umožňuje rozmnožování (Špinar, 1965).

Tělo zooidů je rozděleno na dvě části: cystid a polypid. Cystid tvoří vnější obal a přisedá k podkladu. V dutině cystidu se nachází polypid, který vlastní zatažitelný lophophor podkovovitého nebo kruhovitého tvaru. U některých druhů se peristom uzavírá víčkem – epistom (Kafka, 1886).

Nepohyblivá pevná část zooidů je cystid nazývaný metasoma. Skládá se ze dvou vrstev: vnitřní vrstvy – endocystu a vnější vrstvy – exocystu. Exocyst vytváří oporu těla. Může být vápenatý, chitinový nebo bílkovinný. Coelom je prostor cystidu, který je vyplněn hydrostatickou dutinou, jež vybíhá do chapadel lophophoru. Na přední straně zoecia se odděluje endocyst, který tím vytváří kožní napodobeninu a ta je udržována pochvovými svaly. Její složení je ze svalových vláken, bazální membrány, vnějšího epitelu a peritoneálního epitelu (Rogick, 1937). Pod epidermis následují ještě dvě vrstvy, a to vrstva příčných svalů, které přiléhají k bazální membráně, a vrstva podélných svalů, která přiléhá k mesodermu. Endocyst má velmi důležitou funkci při pučení nových jedinců a také při tvorbě nových vajíček (Kafka, 1886).

Polypid je vnitřní pohyblivá část, která obsahuje orgány. Má dvě části: horní, která se nazývá prosoma, a spodní nebo také krční, která se nazývá mesosoma. Nosičem chapadel je

lophophor a vybíhá z mesosomatu. K přihánění potravy a k dýchání slouží zooidi. Při podráždění je lophophor schopný se zatáhnout do cystidu. Lophophor je měkkým chitinovým límcem přichycen k ústí zoocia a tak obklopuje ústa. Má dvě vybíhající ramena, která jsou podkovovitého nebo kruhovitěho tvaru. Několik řad multiciliálních buněk je na průřezu chapadel lophophoru. Vnější řada je zastoupena dlouhými tykadly a vnitřní řada je krátká. Vyztužené a prodloužené bičíky slouží jako mechanický filtr. Mechovky se od ostatních živočichů (např. larev měkkýšů a kroužkoců) odlišují systémem sběru potravy. Mechovky si protisměrným pohybem přihánějí proud vody k ústnímu otvoru díky dvěma řadám bičíkatých buněk (Riisgård et al., 2004). Podle druhu se liší i počet chapadel, která jsou dutá. Víčko vzniklo přetvořením tykadla různého tvaru, které uzavírá lophophor do cystidu. Pohyb a změnu tvaru víčka umožňuje svazek jednotlivých vláken. Ústní dutina je uvnitř lophophoru, kde začíná trávicí soustava, jež má tvar „U“. Části trávicí soustavy jsou rozděleny na hltan, žaludek a konečník, který vyúsťuje řitním otvorem vně lophophoru. Hltan se nezúčastňuje trávení. Ze tří částí se skládá žaludek: česlo (cardium), slepé střevo a vrátník (pylorus). Žaludek je přichycen k cystidu pomocí stopky (funiculus). Konečník je závěrečná část trávicí soustavy a končí análním svěračem. Nahromaděné exkrementy uvnitř konečníku obsahují zbytky rozsivek, kořenonožců nebo nestravitelné zbytky fytoplanktonu. Trávicí soustava je celá ektodermálního původu (Kafka, 1886).

Svalová soustava se skládá ze dvou skupin: svalstva zažívacího traktu a svalů tělní stěny (endocyst). Svaly jsou utvořeny buď ze svalových snopečků, nebo z jednotlivých svalových vláken. Svalové snopečky jsou dobře viditelné v oblasti zažívacího traktu. Jednotlivá svalová vlákna jsou spíše vzácná. Pohyb polypidů, lophophoru, proudění tělní tekutiny uvnitř samotného jedince a přichycení polypida ke stěně cystidu je umožněn právě díky svalové soustavě. Nejvýznamnější svaly celé soustavy jsou zatahovače lophophoru a trávicího traktu. Dobře rozvinuté podélné svaly slouží k pohybu chapadel, která se nacházejí uvnitř chapadel všech mechovek (Rogick, 1937). Funiculus tvoří pevné větvené provazce, které jsou přichyceny ke stěně žaludku (Kafka, 1881).

Nervová soustava je uložena mezi hltanem a řitním otvorem v dutině lophophoru. Centrem nervové soustavy je jícnová zauzlina (ganglium). Odtud vybíhají dvě mohutné větve do ramen lophophoru a jemné periferní nervy. Nervy inervují trávicí trakt a svalová vlákna (Kafka, 1886).

Zcela chybí cévní soustava. Jen u velmi malého počtu mechovců se vyskytuje vylučovací soustava. Výměna plynů se uskutečňuje pak zejména přes lophophor a přes tělní stěnu, což probíhá osmoticky (Špinar, 1965).

Sladkovodní mechovky se rozmnožují buď nepohlavně, nebo pohlavně. Nepohlavní rozmnožování se uskutečňuje dvěma způsoby: statoblasty nebo pučením. Sladkovodní i mořské mechovky jsou hermafroditi. Některé druhy mechovek jsou schopny produkovat vajíčka i spermie ve stejné době. Na endocystu jsou umístěna vajíčka a dále se pak vyvíjejí ve vaječník. Spermie se tvoří ve varlatech na funiculu. Postupně dozrává jedno vajíčko, které se následně odděluje a je spermiemi oplozeno. Oplození je vnitřní a vývoj nepřímý. Z oplozeného vajíčka vzniká pupen (ooecium). Dochází k rýhování zygoty a vývoji zárodka. Ve váčcích mesodermální coelomové výstelky dochází k vývoji oplozených vajíček, ale jen u některých druhů. Následně se pak vyvíjejí z oplozených vajíček larvy trochoforového typu. Zooid vzniká extrémní metamorfózou pohyblivé, bilaterálně souměrné larvy (cyphonautes). Larva má na svrchní straně obrvenou apikální destičku a na spodní vrstvě ústa a řitní otvor. Prvoústa (blastoporus) následně zarůstají a na jejich místě je vytvořen váček z ektodermu, který se následně spojí s prvostřevem a vzniká ústní otvor. Průchozí trávicí trubice vznikne později na opačném konci střeva vychlípáním ektodermu. Střevo slepé zůstává jen u některých druhů. Na obou stranách larvy jsou přísavné orgány. Po vnějším obvodu probíhá svazek brv. Polypidy vznikají na vychlípění tělní stěny u sladkovodních mechovek (Zrzavý a Hošek, 2006).

Larva plave ve vodě po nějakou dobu. Následně se pomocí přísavek připevní k podkladu. Ektodermální tkáň poté pokryje celou larvu po přisednutí. Larva se zploští a všechny tkáně podlehnou rozkladu. Larva ztrácí brvy. Je vytvořena prvotní schránka (protoecium) a vyrůstá první jedinec kolonie z vnitřku změněné larvy. Jedinec kolem sebe vylučuje trubkovité zooecium, které se nazývá ancestroecium. Pohlavní rozmnožování probíhá v období od června do září (Kafka, 1886).

Kolonie se rozvine pučením z prvního zooida (viz obr. 1), noví zooidi jsou vytvořeni z epidermis z mateřského jedince. Vzniká dvouvrstvý pupen a vytvoří se shluk zárodečných buněk. Následně se vytváří dutina uvnitř pupenu, na jejímž dně se formuje trávicí trakt z ektodermálního materiálu. Chapadla a základ nervové soustavy se vytvoří později. Larvy

skupiny *Phylactolaemata* vytváří více matečných polypidů, které následně umírají a změní se na tzv. hnědé těleso. Živí zooidi zůstávají na povrchu kolonie (Kafka, 1881).



Obr. 1: Pučení zooida druhu *Pectinatella magnifica* (fotografie Eva Ježková)

U některých sladkovodních mechovek je možné nepohlavní rozmnožování fragmentací nebo dělením. Pasivní fragmentace nastává, když probíhá mechanické oddělení části kolonie (např. u druhu *Plumatella fruticosa*). Dále se vyskytuje aktivní dělení například u hyalinních mechovek. Stěna těla je zúžena pomocí svalové kontrakce, coelom se rozdělí a jednotlivé části kolonií se oddělí (Wood, 2001).

Jako adaptace na nepříznivé klimatické podmínky se u sladkovodních mechovek vytvářejí vnitřní pupeny (statoblasty), které jsou dobře viditelné na obrázku č. 2. Díky statoblastům jsou mechovky schopny přežít i náročné podmínky, jako jsou například extrémní teploty. Statoblasty mají oválný nebo ledvinovitý tvar. Jejich povrch je pokryt pevným chitinózním obalem, který má mnoho komůrek vyplněných plynem. Někdy mohou být přítomny i ostny (např. *Pectinatella magnifica*) nebo háčky, které vznikají na funiculu, jenž je během života jedince přichycen k vaku žaludku. Vývoj statoblastů nastává po ukončení pohlavního rozmnožování. Uvnitř statoblastů se nachází zárodečná hmota, ze které se následně vytvoří nový polypid. Statoblasty se dostávají do prostředí rozrušením stěn zooidů

při odumírání kolonií mechovců, ke kterému v našich podmínkách dochází ke konci léta. Ze statoblastu vyrůstá na jaře nový zárodek a dává tak vznik nové kolonii (Kafka, 1886). Rozeznáváme dva druhy statoblastů: floatoblasty a sessoblasty. Přisedlé statoblasty připojené pevně k tělu zoida jsou sessoblasty. Nemají plovací prstenec a někdy mohou být opatřeny přichytnými tělísky. Sessoblasty zůstávají pevně přichycené k substrátu i dlouho poté, co dojde k rozpadu kolonie. Floatoblasty jsou kruhovitěho nebo oválného tvaru a mají plovací prstenec, který se skládá z chitinových rourek. Mechovky mohou osidlovat nová stanoviště právě díky statoblastům. I na velké vzdálenosti mohou být přemísťovány pomocí vodního ptactva, plovoucí vegetace, větru nebo vodního toku (Rogick, 1943).



Obr. 2: Statoblasty druhu *Pectinatella magnifica* (fotografie pracovníků KMVD)

2.4 Ekologie sladkovodní skupiny *Bryozoa*

Většinou jsou *Bryozoa* nacházena v mírně tekoucí nebo stojaté vodě. Hlavně se ale vyskytují ve vodě, kde je dostatek potravy a kyslíku a většinou v malých hloubkách. Jen některé druhy snášejí dočasný nedostatek vody. Vytvářejí keříčkovité nebo kulovité kolonie. Potravu získávají pomocí aktivní filtrace vody. Jejich potravou se stává drobný plankton a organický detrit. Jako substrát slouží různé druhy rostlin (např. rod *Nuphar*, *Nymphaea*, *Potamogeton*). Přichytávají se na stébla rákosu, dřeva, kameny, především pak ponořené

větve vrb a olší. Dávají přednost stinným místům a čistým vodám. Každý druh je specifický a preferuje trochu jiné podmínky (Wood, 2001).

2.5 Složení bochnatky americké (*Pectinatella magnifica*)

Tenkou povrchovou vrstvou tvoří kolonie zooidů bochnatky americké (*Pectinatella magnifica*). Rosolovitá hmota se nachází uvnitř kolonie a může dosáhnout tloušťky až 70 cm. Rosolovitá hmota je produktem samotných zooidů, kteří si tak zvětšují svůj životní prostor. Z celkové hmotnosti jedince je obsah sušiny kolem 0,4 %. Nicméně průzkumy na konci roku 2004 zjistily, že průměrný obsah sušiny je vzhledem k vysoké koncentraci kolonií řas a sinic uvnitř bochnatky americké 2,25 %. V rekordním čase (několik dní) byla vytvořena celá kolonie (vážící od 2 do 100 kg), což je srovnatelný růst jako v případě některých nádorů. V rosolovité hmotě jsou přítomny proteiny (albuminy, ovalbuminy). Tyto bílkoviny jsou tvořeny především aminokyselinami: tyrosin, tryptofan, cystin. Nosná konstrukce *Pectinatella magnifica* je tvořena z chitinu, což je pro ni charakteristickým znakem (Sharp et al., 2007).

2.6 Biologie a ekologie bochnatky americké (*Pectinatella magnifica*)

Pectinatella magnifica je teplomilný druh. Vyžaduje teplotu kolem 20 °C. Kolonie zpomalí růst a rozpadají se v případě, že teplota vody déle než týden nestoupne přes 16–17 °C. Limitujícím faktorem je také průhlednost vody, na jejímž vytváření se díky svému filtrování také sama podílí. S tím souvisí i proudy vody, vydatnost srážek či intenzivní déšť (Šetlíková et al., 2005). Na podzim se bochnatka americká vyskytuje spíše v hlubších vodách. Upřednostňuje stojaté vody oproti tekoucí. Lze ji nalézt také v litorální zóně řek a potoků, kde je menší průtok vody, neboť silný proud by znemožnil zachycení statoblastů na substrátu a následné přežití kolonie (Davenport, 1900). Výskyt bochnatky americké byl zaznamenán také v oligotrofních až mezotrofních nádržích a jen velmi vzácně v dystrofních vodách (Balounová et al., 2006). Fytoplankton, hlavně rozsivky, jsou pro bochnatku americkou nejdůležitějším zdrojem potravy. Vzhledem k tomu, že filtruje vodu, zdrojem živin jsou i různí prvoci (Protozoa), malí planktonní členovci, řasy a organický detrit (Wood, 2001). Kvůli svému intenzivnímu metabolismu ovlivňují kolonie mechovek složení fytoplanktonu

v nádržích (Ricciardi a Lewis, 1991). Bochnatka americká je ve své ekologii běžnou součástí sladkovodních společenstev a nepůsobí problémy s kvalitou vody ani nezvyšuje znečištění vod. Nicméně může působit problémy na konci svého životního cyklu kvůli tomu, že se od substrátu odděluje kolonie a může ucpávat odpadní kanalizaci a vodovodní potrubí. Na rekreanty nebo na rybáře může působit až odpudivě. Zatím nebylo zjištěno, že by bochnatka americká při přímém kontaktu s člověkem způsobovala nějaké zdravotní potíže, avšak existují případy, kdy způsobila podráždění kůže či svědění (Wood, 2001).

Kolonie mechovek mohou obývat různí symbionti, komenzálové, ale také paraziti (Šetlíková et al., 2005). Bochnatky jsou významnými hostiteli pro skupiny Microsporidia a Myxozoa. V coelomové dutině probíhá vývoj parazitických druhů *Trichonosema* a *Tetracapsula*, které způsobují závažné onemocnění u lososovitých ryb (Canning et al., 2001). Útočištěm a obydlím se stává *Pectinatella magnifica* i jiným organismům (např. drobným korýšům Crustacea a plžům Gastropoda) a také např. ploštěnky kladou svá vajíčka do rosolovité hmoty kolonií. Často se také vyskytují ve společnosti sladkovodních hub, především druhu *Ephydatia fluviatilis* (Šetlíková et al., 2005). Nárůsty řas a sinic rodu *Scenedesmus*, *Cymbella*, *Eunotia*, *Navicula*, *Oscillatoria*, *Stephanodiscus*, *Coenococcus*, *Microchaete* a *Pseudanabaena* jsou na povrchu a ty se schodují s planktonem vodních nádrží. Samotná *Pectinatella magnifica* slouží jako potrava ploštěnek, plžů, larev pakomárů (např. *Cryptochironomus*) a chrostíků (*Trichoptera*) (Balounová et al., 2006).

2.7 Metody izolace a identifikace mikroorganismů

Pro izolaci mikroorganismů z různých prostředí se používá nejčastěji kultivace na polotuhých živných médiích a pro identifikaci bakterií byla vyvinuta řada genotypových a fenotypových metod.

Nejprve je nutné pomocí kultivace bakterie izolovat a následně je možné je identifikovat. Pro identifikaci mikroorganismů jsou stále častěji využívány molekulárně biologické metody, což jsou metody genotypové, které používají genetickou informaci uloženou v buňce. Nejvíce bývají používány hybridizační a amplifikační techniky, jemiž lze detekovat bakteriální rody, druhy i kmeny (Ambrožová, 2004; Cloete et al., 2004).

Podrobnějšímu popisu kultivačních a vybraných molekulárně-biologických metod využívaných k izolaci a identifikaci bakterií jsou věnovány následující kapitoly.

2.7.1 Kultivační metody

V současné době mají kultivační metody nezastupitelné místo při sledování četnosti mikroorganismů v prostředí, a to hlavně proto, že izolují čisté mikrobiální kmeny. Jsou to metody nepřímé. Jejich principem je pomnožení bakterií v nebo na uměle připraveném médiu za vhodných podmínek s účelem zisku kolonií čistých kultur, které jsou následně schopny podrobit se dalším testům. Vyskytuje se velké množství médií, která vyhovují svým složením nárokům některých druhů bakterií, avšak většina bakteriálních druhů se neustále řadí mezi nekultivovatelné nebo nekultivované mikroorganismy, tj. nerostoucí na kultivačních médiích. Vzhledem k velkým rozdílům ve fyziologických vlastnostech bakterií není možné vyvinout jedno univerzální kultivační médium, které by bylo schopno zachytit všechny bakteriální druhy, jež se vyskytují v různých prostředích (Austin, 1988; Häusler, 1994; Maier et al., 2000). Podle různých hledisek lze kultivační média rozdělit do několika skupin. Nejznámější a nejvýznamější členění vychází z použití těchto médií na média základní, obohacená, diagnostická, resuscitační, selektivní, selektivně diagnostická, pro anaerobní kultivaci, ke stanovení citlivosti na antimikrobiální látky, ke stanovení vitaminů, stanovení účinnosti dezinfekčních látek, média k testování sterility, média transportní či média k uchování kultur (Votava, 1999).

Mikrobiologický rozbor vychází z národních norem a je založen na stanovení základních ukazatelů kultivačními metodami. Kultivace se provádí jak na pevných půdách, tak i na tekutých médiích. Presumptivní bakterie se identifikují pomocí konfirmačních testů (Ambrožová, 2004; Cloete et al., 2004).

2.7.1.1 Kultivace v tekutých médiích

Snadný přístup vody a živin ke kultivovanému mikroorganismu je výhodou tekutých půd. Ke kultivaci stresovaných nebo poškozených mikroorganismů se používají tekuté půdy (Häusler, 1994), k pomnožení mikroorganismů před dalšími testy, k průkazu biochemických

vlastností a stanovení fyziologických skupin bakterií metodou MPN – metoda nejvíce pravděpodobných počtů (Štěpánek, 1982).

Pomocí metody MPN je možná kvantifikace bakterií při použití tekutých půd. Její podstatou je určení pozitivní reakce (výskyt mikroorganismů) v určitém objemu vody nebo zředěného vzorku. MPN je statistický odhad průměrného počtu mikroorganismů ve vzorku. Přesnost metody závisí na počtu zkumavek ředící řady použitých pro analýzu (Häusler, 1994; Maier et al., 2000). Miniaturizované metody jsou selektivní variantou těchto metod, které mají předem definovaný substrát a k detekci bakterií využívají přítomnost chromatogenního nebo fluorogenního substrátu v médiu. Nejčastěji se jedná o onitrophenyl- β -D-galaktopyranosidu (ONPG) a 4-methylumbelliferyl- β -D-glukuronidu (MUG) pro stanovení koliformních bakterií a *E. coli* a 4-methylumbelliferyl- β -D-glukosidu (MUD) pro stanovení intestinálních enterokoků (Maniatis et al., 1982).

2.7.1.2 Kultivace na pevných médiích

Stanovené mikroorganismy v testovaném objemu vzorku lze kvantifikovat pomocí této metody. Množství a ředění inokulovaného vzorku se zvolí tak, aby vyrostly samotné kolonie po inkubaci na pevné půdě, respektive klony jednotlivých buněk. Výsledný počet narostlých kolonií se uvádí jako počet KTJ (kolonie tvořící jednotka, také známá jako CFU = colony forming unit). To se pak následně přepočítává buď na objem, nebo hmotnost původního vzorku (Häusler, 1994; Maier et al., 2000).

Selektivní média lze využít ke kultivaci určitých skupin mikroorganismů. Fluorogenní a chromatogenní substráty se v posledních letech podstatně více rozvinuly a rozšířily, neboť umožňují detekovat aktivitu specifických enzymů. Kultivace na těchto substrátech jsou ve srovnání s kultivacemi na běžných médiích podstatně přesnější a rychlejší. Výhodou je také to, že stanovené bakterie není pak nutné podrobovat identifikačním testům (Feng a Hartman, 1982; Manafi, 1991; Augoustinos et al., 1993; Manafi et al., 2000; González et al., 2003).

Využívají se dva postupy na inokulaci vzorku pevné půdy. Jako první je metoda přímého výsevu. Je založena na inokulaci zvoleného objemu vzorku do nebo na povrch kultivačního média. Pro stanovené fakultativně anaerobní nebo mikroaerofilní bakterie, které standardně žijí při vyšších teplotách, tudíž jim teplota kolem 45 °C roztopeného agaru

nezpůsobí teplotní šok, je vhodná inokulace do kultivačního média. Pro kultivaci aerobních bakterií, které se přirozeně vyskytují v chladnějším prostředí, je vhodná metoda přímého výsevu na povrch kultivačního média (Häusler, 1994; Maier et al., 2000). Jako druhá metoda je metoda membránových filtrů, která se používá při zpracování větších objemů vzorků. Je založena na zkoncentrování potřebného množství vzorku pomocí filtrace (10–1 000 ml). Tato metoda je vhodná pro vody obsahující malé množství rozpuštěných látek a malý počet bakterií (Häusler, 1994; Maier et al., 2000).

2.7.2 Identifikace bakterií pomocí konfirmačních testů

Je nutné provést konfirmační (potvrzující) testy pro bližší taxonomické zařazení vykultivovaných bakterií v nebo na selektivních médiích. Tyto testy jsou na bázi biochemických, imunologických a chemataxonomických metod. Za presumptivní jsou označovány kmeny, které splňují podmínky testů (Häusler, 1994; Maier et al., 2000).

V současné době identifikace pomocí biochemických testů patří mezi nejčastěji používané konfirmační techniky. Využívá se stanovení snadno detekovatelných a stálých biochemických vlastností. Pomocí cytochromoxidásového testu se provádí konfirmace presumptivních kolonií *E. coli*, průkazem tvorby indolu z tryptofanu, stanovením aktivity β -D-glukuronidázy. Byly vyvinuty diagnostické soupravy (mikrotesty), které slouží k rychlé identifikaci bakterií. Tyto soupravy jsou vytvořeny jako mikrotitrační destičky, v jejichž jamkách se nachází dehydratovaná kultivační média (Häusler, 1994).

Jako další se často využívají také chromogenní a fluorogenní substráty. Enzymy ze skupiny glykosidas využívají nejčastěji tyto postupy. Mezi nejvýznamnější patří β -D-glukuronidáza (enzym z 94–96 % specifický pro *E. coli*, vyskytuje se u některých kmenů shigel, salmonel, yersinií, stafylokoků a klostridií) a β -D-galaktosidáza (enzym, který katalyzuje a štěpí laktózu, nejčastěji se využívá pro stanovení koliformních bakterií). K identifikaci β -D-glukuronidázy se nejčastěji používají substráty fenolftalein-mono- β -D-glukuronidový komplex (PHEGLR), p-nitrofenol- β -D-glukuronid (PNPGLR), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glukuronid (XGLR) a 4-methylumbelliferyl- β -D-glukuronid (MUG). Aktivita β -D-galaktosidázy je obstarána pomocí substrátů o-nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid (ONPG), nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid (PNPGAL), 6-bromo-3-

indolyl- β -D-galaktopyranosid (salmon-Gal), 6-bromo-2-naphthyl- β -D-galaktopyranosid (BNGAL), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid (XGAL) a 4-methylumbelliferyl- β -D-galaktopyranosid (MUGAL) (Manafi et al., 1991; Manafi, 2000).

Identifikace imunologickými metodami je založena na identifikaci bakteriálních antigenů pomocí specifických protilátek. Detekci antigenů specifických pro čeleď, rod, druh či sérovar umožňují imunologické metody. Další a nepostradatelné místo mají v mikrobiologii enzymatická imunoanalýza (ELISA), latexová aglutinace a přímá a nepřímá imunofluorescence (IFA), jejichž výhodou je jednoduchost, rychlost a citlivost. Nevýhodou těchto metod je vysoká specifčnost a koncentrace protilátky, koncentrace antigenu a typ reakčního roztoku a ještě navíc může docházet ke zkříženým reakcím. Tyto metody se používají při identifikaci patogenních sérovarů *E. coli* či salmonel (Häusler, 1994; Austin, 1988; Rompré et al., 2002; Bartie et al., 2003).

Identifikace chemotaxonomickými metodami jsou založené na studiu chemického složení buněčné stěny. Lze je využívat pro typizaci bakterií. Mezi nejčastěji používané lze zařadit analýzu profilů proteinů a mastných kyselin, ale při běžných mikrobiologických analýzách se nevyužívají (Austin, 1988; Häusler, 1994; Stead et al., 1998).

2.7.3 Molekulárně-biologické metody

Molekulárně-biologické vědy prošly v posledních desetiletích velkými změnami a došlo tak i k mohutnému rozvoji molekulárně-biologických metod. Tyto postupy se vyznačují menší časovou náročností, kdy není nutná kultivace a konfirmace, mají vyšší citlivost, neboť jsou schopny identifikovat i 1 molekulu DNA a mají vysokou specifčnost, která je založena na detekci skupinově-, rodově-, druhově-, poddruhově-specifických sekvencí DNA či RNA, které se v čase nemění a nejsou ovlivněny podmínkami okolního prostředí (Rompré et al., 2002; Cloete et al., 2004).

K identifikaci druhů, případně i kmenů bakterií se běžně používají techniky polymerázová řetězová reakce (PCR), gelová elektroforéza v teplotním/denaturačním gradientu (T/DGGE) a sekvenování DNA. Principu těchto metod a podrobnějšímu popisu jsou věnovány následující kapitoly.

2.7.3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Vyvinutí metody PCR v 80. letech 20. století dalo základ pro rozvoji molekulárně-biologických metod. Následně se PCR během krátké doby stala nejpoužívanější amplifikační metodou. Aplikace metody PCR jsou známy v mnoha odvětvích a nyní se začínají využívat i v environmentální biologii (Mullis a Faloona, 1987).

Opakující se enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků DNA, ke které dochází po připojení dvou primerů vážících se na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3'OH-konce směřují proti sobě, je principem metody (Rosypal et al., 2002). Oligonukleotidy, které jsou komplementární ke koncům amplifikovaného úseku, o délce kolem 20 párů bází (bp), se obvykle používají jako primery. PCR směs pro provedení amplifikace musí obsahovat, kromě templátové DNA a primerů, ještě deoxyribonukleotidtrifosfáty (dNTP) a termostabilní DNA polymerázu, která katalyzuje vlastní syntézu nových řetězců.

PCR metoda spočívá v opakování tří kroků. Prvním krokem je denaturace, kdy dochází k rozvolnění řetězců templátové DNA (92–96 °C). Druhým krokem je anelace, při které dochází k připojení primerů k rozvolněným řetězcům a anelační teplota se odvíjí od struktury primerů. Třetím krokem je extenze, známá také jako polymerace, při které se prodlužují nové řetězce (72 °C) (Rompré et al., 2002; Cloete et al., 2004). PCR metoda probíhá nejčastěji po 30–40 cyklech, při nichž se geometricky zvyšuje cílový počet sekvenací DNA. Pomocí gelové elektroforézy nebo hybridizací se značenou sondou nebo také pomocí sekvenování se detekují amplifikované úseky (Rosypal et al., 2002). Kromě základní metody PCR byla vyvinuta řada modifikací metody PCR, z nichž některé jsou uvedeny níže.

Náhodně amplifikovaná polymorfní DNA (RAPD, AP-PCR) je první modifikací. Vychází z klasické metody PCR, ale od základní metody se odlišuje tím, že využívá jen jeden krátký primer o velikosti 10 bp s náhodnou sekvenací. Ten hybridizuje s DNA matricí za anelační teploty. Není nutné znát sekvenaci DNA matrice, neboť se zde používají nespecifické primery. V případě, že RAPD primery nasedají na protilehlé řetězce DNA proti sobě a ve vzájemné vzdálenosti od několika málo kbp, vznikají amplifikační produkty o neznámé sekvenci. Ty jsou následně separovány gelovou elektroforézou a obarveny ethidium bromidem. Vzdálenost mezi dvěma protilehlými primery odpovídá délce amplifikačních produktů (Welsh a McClelland, 1990; Williams et al., 1990; Olive a Bean, 1999). Výsledkem je pak spektrum amplifikačních produktů (fingerprint), které by mělo být

charakteristické pro zkoumaný kmen. Je ale známo, že i byť nepatrné změny koncentrace solí, anelační teploty, délka primerů a jejich sekvenace a koncentrace DNA mají zásadní vliv na intenzitu, počet a reprodukovatelnost fingerprintu (Welsh a McClelland, 1990).

Multiplex PCR je druhou modifikací PCR, kdy se při jejím provedení používá více párů primerů současně. Ty se vyznačují hlavně tím, že mají podobnou teplotu tání. To umožňuje u jednoho mikroorganismu paralelní identifikaci více genových úseků nebo identifikaci více mikroorganismů (Bej et al., 1991; Campbell et al., 2001; Mazura et al., 2001).

Nasted PCR je třetí modifikací PCR. Probíhá jako dvě po sobě jdoucí amplifikace za cílem získat dostatečné množství DNA fragmentu. V případě, že se amplifikuje malé množství DNA, tak se používá právě tato metoda (Juck et al., 1996). Při nasted PCR musí oba páry primerů specificky reagovat v očekávané oblasti a musí mít odlišný bod tání (Mazura et al., 2001).

Reverzně transkripční PCR (RT-PCR) je čtvrtou modifikací PCR. Je určena k amplifikaci molekul RNA (včetně mRNA a rRNA). Pomocí reverzní transkriptázy do cDNA je nejdříve RNA přepsána a následně potom amplifikována (Rosypal et al., 2002).

Kvantitativní PCR (Q-PCR) je pátou modifikací PCR. Umožňuje průběžné sledování tvorby PCR produktů již během jednotlivých amplifikačních cyklů a tedy jejich kvantifikaci, případně kvantifikaci mikroorganismů v původním vzorku (Ibekwe a Grieve, 2003).

Repetitivní PCR (REP-PCR) je další a šestou modifikací PCR, která je založena na shlukové analýze PCR produktů, které jsou získané s primery komplementárními k rozptýleným repetitivním sekvencím v DNA studovaného mikroorganismu (Mazura et al., 2001).

Výběr vhodné sekvence k amplifikaci, čistota a množství DNA matrice, typ DNA polymerázy a amplifikační podmínky, přítomnost inhibitorů, detekce produktů amplifikace a kontroly amplifikace mají klíčový význam pro úspěšné provedení a vyhodnocení PCR (Altwegg, 1995; Wilson, 1997; Radström, 2004). Zásadním krokem při použití amplifikačních metod je výběr oligonukleotidové sekvence. Pro příslušný organismus či organismy musí být cílová sekvence specifická. Je možné hledat sekvenci specifickou pro celou taxonomickou skupinu podle typu aplikace (tj. geny kódující 16S rRNA) nebo sekvenci

specifickou pro daný organismus. Dobré je zaměřit se na sekvenci, která se vyskytuje v buňkách ve více kopiích a tím se dosáhne vyšší citlivosti. Toto však neplatí pro genové sekvence na plazmidech, které mohou z buňky vymizet (Altwegg, 1995; Johnson, 2000).

Klíčovým krokem pro úspěch amplifikačních metod je získání matrice o vhodné čistotě a dostatečném množství templátové DNA. Postupy pro izolaci bakteriální DNA by měly být finančně a časově nenáročné, jednoduché, reprodukovatelné a bezpečné pro obsluhu (Rantakokko-Jalava a Jalava, 2002). Zakoncentrování cílových molekul DNA ze vzorku a odstranění inhibičních látek je cílem těchto metod. Pouze některé izolační metody, kterých je celá řada, jsou aplikovatelné na příslušný druh vzorku (Horáková et al., 2008). Pro získání DNA z čistých kultur je možné použít i metody poskytující horší kvalitu DNA matrice, a to hlavně vzhledem k vysoké citlivosti amplifikačních technik (Radström, 2004).

Mnoho faktorů může ovlivnit inhibici PCR amplifikační reakci. Zejména ve vzorcích z potravin, prostředí a klinického materiálu je častá přítomnost nějakého z inhibitorů. V interferenci při lyzi buněk, jež je nezbytná pro extrakci DNA, spočívá mechanismus inhibice.

Degradace a precipitace nukleových kyselin a inhibice DNA polymeráz může být jako další vliv, což následně vede ke snížení citlivosti PCR nebo k úplnému zablokování reakce (Wilson, 1997). Inhibitory můžeme rozdělit do dvou skupin: endogenní, které se nacházejí přímo ve zpracovaném vzorku, používaných enzymech nebo materiálu. Druhé jsou exogenní, které pocházejí z okolního prostředí (bakterie, prach, pyl, celulóza nebo pudr z rukavic). Jako endogenní inhibitory jsou z klinického prostředí známy hemoglobin, heparin, bilirubin, žlučové kyseliny, sérové proteiny a močovina. Do inhibitorů, které pocházejí z potravin, lze zařadit mléčné proteiny, tuk, ionty vápníku, termostabilní nukleázy, proteázy, sacharózu a glykogen. Inhibující humidové a fulvové kyseliny, těžké kovy, rostlinné polysacharidy, bakteriální zbytky apod. se často nacházejí ve vzorcích z prostředí (Wilson, 1997). Při dodržování čistoty a sterilních podmínek práce v laboratoři je možné dosáhnout omezení výskytu exogenních inhibitorů, ovšem výskyt endogenních inhibitorů ve vzorcích je proces poněkud náročnější. Například aplikace vhodných purifikačních technik může vést k získání dostatečně čisté DNA (Wilson, 1997). Bylo vyzkoumáno, že v případě, že se přidají specifické sloučeniny – enhancery – do amplifikační směsi, zvýší se tím účinnost amplifikace. Enhancery působí v různých krocích amplifikace. Ovlivňují stabilitu templátové DNA nebo působí na správnou funkci DNA polymerázy. Jedná se o proteiny (BSA = bovinní sérový

albumin, gp32 = DNA vazebný protein kódovaný genem gp32 bakteriofágy T4), organická rozpouštědla (dimetylsulfoxid, formamid), detergenty (Tween 20, Triton X), biologicky kompatibilní rozpuštěné látky (betain, glycerol) a polymery (polyetylen glykol, dextran) (Back et al., 1979; Pomp a Medrano, 1991; Henke et al., 1997; Radström, 2004).

Metody detekce PCR amplifikovaných úseků mají různou citlivost. Málo citlivou, ale současně nejjednodušší metodou je elektroforéza v agarózovém gelu. Princip této metody spočívá v tom, že se obarví amplikony pomocí fluorescenčního barviva, které jsou rozděleny podle své relativní molekulové hmotnosti a velikosti náboje. Nejvíce se používá ethidium bromid, který interkaluje mezi nukleotidy. Pomocí UV transiluminátoru dochází k vizualizaci obarvených amplikonů (Maniatis et al., 1982). Metoda Southern blot kombinovaná s hybridizací se vyznačuje svou vysokou citlivostí (20–100krát vyšší než u agarózové elektroforézy) a specifitostí. Její princip spočívá v tom, že se přenese a následně imobilizuje amplifikon na membráně, kde jsou podrobeny hybridizaci se specifickou sondou (Altwegg, 1995).

Použitím pozitivních a negativních kontrol při každé analýze je zajištěna kontrola správného průběhu reakce u amplifikačních metod. Srovnáním s velikostním markerem je zajištěna kontrola správné velikosti amplifikovaného produktu. Pro kontrolu specifity PCR produktu je možné využít sekvenaci (Altwegg, 1995).

2.7.3.2 Gelová elektroforéza v teplotním/denaturačním gradientu (T/DGGE)

Metoda DGGE a TGGE, Denaturing gradient gel electrophoresis nebo Temperature gradient gel electrophoresis (česky gelová elektroforéza v denaturačním gradientu nebo gelová elektroforéza v teplotním gradientu) je jednou ze základních tzv. fingerprintových metod. Její princip byl již dávno před její aplikací znám v environmentální mikrobiologii a využíván pro detekci bodových mutací DNA. Tato metoda umožňuje od sebe odlišit dvě sekvence lišící se jedním párem nukleotidů. Nově tato metoda byla aplikována na bakteriální gen 16S rDNA spolu s přidáním GC svorek. V roce 1998 tuto metodu publikovali Muyzer a Smalla. Princip obou metod (DGGE i TGGE) je totožný. V polyakrylamidovém gelu s denaturačním gradientem, který je buď teplotní, nebo chemický, migruje PCR produkt. Ve skutečnosti jde o kombinaci obou přístupů. Denaturace je dosaženo kombinací zvýšení teploty

a denaturačních chemikálií a rozdíl spočívá jen v tom, čím je tvořen vlastní gradient – u DGGE gradient chemický nebo gradient koncentrace močoviny a formamidu. Elektroforéza probíhá za zvýšené teploty (65 °C), teplotní gradient u TGGE, kdy je v gelu jednotná koncentrace formamidu a močoviny. Molekuly DNA zpočátku migrují gelem rychle, ale se zvyšujícím se denaturačním gradientem dochází k postupné denaturaci molekul DNA, oddělují se řetězce DNA a to zpomaluje jejich rychlost prostupu gelem. Dle sekvenace analyzované DNA je specifický i průběh této denaturace. Vazby mezi A a T se denaturují rychleji než vazby mezi G a C. Na závěr by došlo k tomu, že by se od sebe úplně oddělila dvoušroubovice DNA a vyplavila by se rychle migrující jednořetězcová DNA z gelu, čemuž ale zabraňují GC svorky, tedy úseku dlouhého zhruba 40 párů bází skládajícího se téměř výhradně z G a C, který je přidán k analyzovanému úseku a oba řetězce DNA drží u sebe a má za následek úplné zastavení postupu analyzované molekuly v gelu. Při analýze mikrobiální komunity, pomocí 16S rDNA nebo nějakého funkčního genu, je výsledkem řada proužků, tzv. fingerprintů, protože každý mikrobiální druh má svou specifickou sekvenci rDNA a tomu odpovídá specifická poloha proužku na gelu. Teoreticky vznikne jeden proužek gelu pro každý mikrobiální druh, respektive každý proužek reprezentuje jeden mikrobiální druh. Jde opravdu jen o teoretický předpoklad a ve většině případů tomu tak i opravdu je, nicméně bylo již prokázáno, že jednomu proužku se stejnou polohou na gelu mohou dát vzniknout dva a více organismů (Muyzer a Smalla, 1998), nebo také jeden organismus může díky přítomnosti více kopií genu dát vzniknout dvěma a více proužkům (Nübel et al., 1996).

V první řadě je úspěšnost metody závislá na vhodném výběru analyzované DNA sekvence. Ta musí být dostatečně variabilní, aby každý druh nebo jiná nomenklaturní jednotka byla reprezentována jedinečnou sekvencí, umožňující rozlišení na gelu. Jak již bylo řečeno, ani toto nezaručí, že je následně bude možné na T/DGGE odlišit. Lze si dobře představit situaci, kdy dva co do sekvence odlišné úseky DNA dají při denaturaci vzniknout prostorově shodné sekundární či terciární struktury se shodnou migrací v polyakrylamidovém gelu a vytvoří tedy princip techniky DGGE (Stephen et al., 1999). Díky DGGE lze identifikovat 1–2 % mikrobiální populace, které představují dominantní druhy ve zkoumaném vzorku. Toto číslo se celkem blíží odhadu podílu společenstva, který je možné analyzovat pomocí tradičních kultivačních metod. Bohužel je tu ale velký rozdíl v tom, že u kultivačních metod se jedná o cca 1 % mikroorganismů, které jsou schopné růstu na kultivačním médiu bez ohledu na jejich úlohu a procentuální zastoupení v dané komunitě. Namísto toho

u T/DGGE jde o 1–2 % nejpočetnějších mikroorganismů, u kterých se dá díky jejich početnosti předpokládat, že plní klíčové role ve společenstvu. Je tedy jasné, že jak se snižuje diverzita společenstva, podíl jejich členů detekovaných T/DGGE stoupá. Existují ovšem i postupy, jak pomocí T/DGGE lze detekovat i minoritní populace. V principu je lze rozdělit do dvou skupin: buď lze aplikovat určitou selekci ještě před vlastním PCR, nebo samo PCR může být selektivní (Feris et al., 2004).

Ještě před vlastním odběrem vzorků může být provedena selekce před PCR nebo až po izolování DNA. Příkladem prvního přístupu je použití techniky „burried litter bags“, tedy česky zakopaných sáčků se substrátem (Krsek a Wellington, 2001; Budak et al., 2006). V tomto případě je vybraný substrát (většinou uzavřený v nylonovém sáčku nebo v sáčku ze síťoviny, která připomíná čajové sáčky) aplikován do přirozeného prostředí a následně je vyjmut po určité době kultivace. Mikroflóra, která kolonizuje tento substrát, je podrobena analýze. Takto je možné detekovat i minoritní populace, které by při analýze vzorku, jenž je odebíraný z přirozeného prostředí, kvůli nízkému zastoupení v mikrobiálním společenstvu, mohly být pod limitem identifikace zvolené metody. Je ovšem třeba vést v patrnosti, že jde o druh obohacovací kultury a podobného efektu je možné dosáhnout jen prostým obohacením prostředí vybraným substrátem, která mohou výrazně změnit původní zastoupení jednotlivých mikrobiálních populací ve vzorku (Budak et al., 2006).

Selekce na úrovni izolované DNA je druhou možností. I tady je mnoho eventualit, zde budou popsány alespoň dvě z nich. Jde o frakcionaci DNA v obou případech. První možností je pomocí barviva bis-benzimidazole rozdělit DNA na základě obsahu G+C. Takto zvyšuje hustotu DNA a přednostně se váže k sekvenci AT. Při vlastní DGGE využitím takto rozdělené DNA lze dosáhnout větší citlivosti. Tento princip je možné využít k monitorování změn ve složení půdní mikrobiální komunity v závislosti na změnách obsahu uhlíku a vody v prostředí a o desetiletí později v kombinaci s DGGE ke studiu minoritních mikrobiálních populací mikroflóry zažívacího traktu kuřat. Byla využita i specifická vazba barviva bis-benzimidazole pro jednoduché rozlišení rozdílných sekvencí druhů *Desulfovibrio* při elektroforéze v agarózovém gelu s přidavkem barviva (Wawer a Muyzer, 1995).

Jak již bylo zmíněno výše, další možností je značení cílových molekul DNA těžkými stabilními izotopy prvků (Radajewski et al., 2000). Na základě využití značeného substrátu cílovou skupinou mikroorganismů probíhá selekce. Po zabudování těžkých izotopů prvků

bude jejich DNA těžší a bude možnost ji oddělit od ostatní DNA v gradientu chloridu cesného. Takto získaný DGGE fingerprint za použití získané DNA bude potom reprezentovat jen mikroorganismy, které využívají daný substrát. Tato metoda má však některá úskalí. Za prvé není úplně jednoduché získat určitý substrát značený těžkým prvkem, a v případě, že je takový substrát k dispozici, bývá často velmi drahý. Dalším úskalím metody je možnost crossfeedingu, tedy posunutí značeného prvku v potravním řetězci, což může být na druhé straně někdy také využito pro studium právě zmíněného potravního řetězce. Aby se dosáhlo dostatečného značení DNA, je třeba podat značné množství značeného substrátu a následně pak dodržet určitou dobu inkubace, aby byl zmíněný prvek schopen se zabudovat do DNA. Během této doby ale může už bohužel docházet k rozkladu značené populace či exkreci části značeného prvku ve formě různých metabolitů a přijetí značeného substrátu jinými mikroorganismy, které jsou přítomny ve sledované komunitě. Může nastat i problém s příjmem zvýšeného množství těžkých izotopů prvků organismy. Kvůli vysoké náročnosti a technickým problémům byla aplikace této techniky v minulosti značně omezená, především se soustřeďovala na specializované komunity, kde možnost crossfeedingu je značně nízká, avšak postupně se začala tato technika využívat i u jiných komunit (Radajewski et al., 2000).

Na specifitě PCR samotné je založený druhý způsob detekce minoritních populací. Selektivní primery specifické pro zkoumanou skupinu mikrobů hrají důležitou roli pro úspěšnost tohoto přístupu. V tomto případě je důležité, zda právě selektivní primery existují, nebo zda je možné je vytvořit. V případě, že primery existují, nebo je možné je vytvořit, tak následně je možné je přímo aplikovat a získat tak fingerprint zkoumané skupiny mikrobů, popřípadě je také možnost použít hnízdovou PCR (nested PCR), kdy během prvního kola je využita dvojice univerzálních primerů a následně pak v druhém kole PCR, kde jako templátová DNA slouží PCR produkt první reakce, jsou aplikovány specifické primery, které musí ležet uvnitř prvního PCR produktu. Při prvním kole PCR dochází k namnožení cílových sekvenací DNA, včetně sekvenací, které jsou v minoritních populacích. Při druhém kole dochází pak k samotné detekci minoritních populací (Heuer et al., 1997; Budak et al., 2006).

I přesto, že T/DGGE má mnoho již výše zmíněných nedostatků a limitů, tak došla tato metoda k nejširšímu uplatnění v environmentální mikrobiologii. Metoda byla již použita ke stanovení diverzity nejrozličnějších mikrobiálních společenstev, ke sledování změn v jejich

složení v čase i v prostoru. Jde o metodu spolehlivou, reprodukovatelnou, rychlou a relativně levnou (Campbell et al., 2001; Bodelier et al., 2005; Budak et al., 2006).

2.7.3.3 Sekvenace

Sekvenace (nebo také sekvenování) DNA slouží ke stanovení pořadí nukleotidů v molekule DNA (primární struktury). Je založena na přípravě separace a detekce fragmentů DNA a jejich velikost se liší o 1 nukleotid. Jedná se o enzymovou metodu, jež využívá modifikovanou PCR k syntéze kopií DNA, do kterých jsou začleňovány kromě deoxyribonukleosidtrifosfátů (dNTP) i dideoxynukleosidtrifosfáty (ddNTP), které nemají hydroxylovou skupinu na 3'-konci, na níž by se mohl navázat další nukleotid v nově vzniklém řetězci, a právě tyto ddNTP slouží jako terminátory syntézy (Radajewski et al., 2000).

Při sekvenování DNA má polymerázová řetězová reakce další specifika. Pomocí asymetrického PCR probíhá amplifikace produktu, kdy na rozdíl od klasické PCR využívá pouze jeden primer. To znamená, že amplifikace PCR produktu probíhá pouze na jednom řetězci DNA, na nějž se primer specifický naváže a následně pak kopie molekul DNA nepřibývají exponenciální řadou (Kirk, 2004).

Variantou enzymatického sekvenování DNA je automatické sekvenování DNA. V jedné PCR reakci probíhá i syntéza DNA a produkty, které vzniknou, což jsou různě dlouhé úseky jednořetězcové DNA, jsou tímto označeny jinou fluorescenční značkou. Genetický analyzátor – „sekvenátor“ se používá k následnému stanovení sekvence DNA vzniklých PCR produktů. Během kapilární elektroforézy v tenké kapiláře naplněné gelem pomocí laserového detektoru napojeného na počítač probíhá detekce produktů (Altwegg, 1995).

Sekvenování našlo řadu uplatnění ve vědě, medicíně a dalších oblastech. Mohou se sekvenovat celé genomy, ale i jen některé části, které mají právě pro daný obor význam. Například ve fylogenetice je možnost pomocí sekvenování DNA studovat fylogenezi organismů, kde se nejvíce sekvenuje DNA, kódující ribozomální RNA. Nebo například antropologie využívá srovnání DNA ke zjišťování a sledování migrace lidských ras. Tato metoda má rovněž využití ve forezních vědách a v kriminalistice, kde se testuje paternita nebo také umožňuje stanovení viny či nevin v případě podezření z trestné činnosti. Pro tvorbu

geneticky modifikovaných plodin se tato metoda využívá v zemědělství. V oboru lékařství tato metoda sekvenování DNA nabízí a slibuje revoluci v diagnostice chorob a časnému zjištění náchylnosti jedince k určitým nemocem a v neposlední řadě také možnost využití v genové terapii (Wawer a Muyzer, 1995).

Jako NGS (next-generation sequencing) je označováno sekvenování příští generace a jedná se o další stupeň vývoje sekvenačních metod. Na paralelizaci procesu sekvenování a produkci tisíců až milionů sekvencí současně jsou založeny tyto nejnovější metody. Je tím umožněno velmi rychlé a relativně levné sekvenování ve velkých objemech. Rychle klesající cena a velmi se zvyšující dostupnost této metody umožňuje se prosadit při studiu celých genomů či jejich částí, ale současně také v rutinní DNA diagnostice v humánní medicíně, v cytogenetice aj. (Radajewski et al., 2000).

2.7.4 Detekce bakterií pomocí biochemických metod

Jedním ze základních biochemických přístupů k identifikaci mikroorganismů a z toho se odvíjejícího studia biodiverzity je zjišťování přítomnosti různých metabolických drah nebo vybraných enzymů u testovaných mikroorganismů, případně celých mikrobiálních komunit. Mikroorganismy jsou v tomto případě kultivovány za přítomnosti různých zdrojů uhlíku (sacharidy, bílkoviny či další látky). V případě, že je předložená látka metabolizována, její degradace je spojena s barevnou změnou přítomného indikátoru. Tyto testy byly většinou původně vyvinuty pro určování lékařsky významných bakterií. Jejich jednodušší variantou je například ENTEROtest 16 nebo 24 (Pliva Lachema) určený pro rutinní identifikaci významných druhů střevních bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* (Wawer a Muyzer, 1995).

Komplexní systém pro identifikaci mikroorganismů představuje systém BIOLOG na mikrotitračních destičkách. Podle firemních údajů je schopený identifikovat více než 2 500 druhů aerobních a anaerobních bakterií, kvasinek a hub. Na mikrotitračních destičkách jsou v 95 jamkách testovány různé zdroje uhlíku, dusíku, fosforu a síry, případně i schopnosti využívat i komplikovanější peptidové zdroje dusíku, dále vhodnost různých osmotických podmínek i vlivy pH a identifikace je založena na výměně elektronů uvolněných během respirace, což vede ke změně barvy přítomného tetrazolia. Původně šlo o identifikaci kultivovatelných bakterií, protože testovanou bakterii je nutné nejprve nakultivovat a poté

inokulovat do všech 96 jamek destičky. Nicméně již počátkem 90. let se objevila snaha o využití této techniky pro získání informací o složení celých mikrobiálních společenstev, kdy byly destičky místo čistou kulturou jednoho mikroorganismu inokulovány mikrobiální frakcí izolovanou z environmentálního vzorku (Garland a Mills, 1991). Dnes je vedle destiček pro Gram-pozitivní bakterie, Gram-negativní bakterie, houby a kvasinky možné využít i EcoPlate, určené speciálně pro analýzu mikrobiálních komunit. V tomto případě místo 95 různých substrátů obsahuje destička pouze 31 substrátů ve třech opakováních, což umožňuje i statistickou analýzu výsledků. Výsledkem je pak fyziologický nebo metabolický fingerprint-profil daného mikrobiálního společenstva (Kirk, 2004).

Podobný systému BIOLOG je API systém nabízející řadu API proužků s různými zdroji uhlíku, které mohou být použity k měření funkční diverzity mikrobů i mikrobiálních společenstev (Torsvik et al., 1990).

Využitím techniky BIOLOG a podobných systémů je generováno velké množství dat o fyziologických schopnostech daného společenstva s relativně jednoduchým technickým zázemím. Pomocí těchto výsledků můžeme odlišit různá mikrobiální společenstva, případně můžeme sledovat vývoj uvnitř jednoho společenstva. Nicméně i tento systém má svá omezení. Získané údaje charakterizují pouze tu část mikrobiální komunity, která je schopna za daných podmínek růst. Zároveň však lze spekulovat o tom, že pomocí tohoto systému lze do jisté míry získat údaje i o nekultivovatelných organismech. Preferuje rychle rostoucí mikroorganismy, je citlivý k hustotě použitého inokula a odráží spíše potenciální než skutečnou metabolickou aktivitu daného společenstva (Kirk, 2004).

2.8 Symbiotické mikroorganismy mechovců (*Bryozoans*)

Mechovky jsou zdrojem biologicky aktivních látek. Řada těchto látek není produkována samostatnými mechovkami, ale jsou syntetizovány symbiotickými mikroorganismy. Do současné doby nebyly popsány symbiotické mikroorganismy v *Pectinatella magnifica*, ale existuje řada studií, které se zabývají výzkumem symbiotických mikroorganismů u mořských mechovek.

Bakterie v koloniích mechovek lze studovat různými metodami, jako jsou například přímá mikroskopie nebo stanovení pomocí kultivačních a molekulárně-biologických metod, které jsou již popsány výše.

Jak již bylo zmíněno, k dnešnímu dni existuje jen velmi malý počet studií, které se zabývají zkoumáním mikroorganismů v mechovkách. Jednu studii vypracovali Heindl et al. (2009). Autoři se zaměřili na stanovení symbiotických bakterií mořských mechovek a stanovení jejich antimikrobiální aktivity.

Bylo odebráno celkem 21 vzorků blíže nespecifikovaných mořských mechovek ze 14 různých lokalit. Tyto vzorky z mořských mechovek byly odebrány z Baltského a Středoziemního moře. Následně bylo izolováno 340 bakterií a z toho 101 bakterií vykazovalo antimikrobiální aktivitu. Ze Středoziemního moře byly izolovány například kmeny rodu *Sphingomonas* a *Alteromonas*, na rozdíl od kmenů *Shewanella*, *Marinomonas* a *Vibrio*, které pocházejí z izolátů a vzorků odebraných z Baltského moře. Nicméně například rod *Pseudoalteromonas* byl nalezen v izolátech ze vzorků odebraných z obou lokalit.

Na odběr vzorků mořských mechovek byly zvoleny tři místa na pobřeží Středoziemního moře a tři místa v Baltském moři. Vzorky byly odebrány potápěči do sterilních, uzavíratelných plastových lahví a byly uloženy v mořské vodě na odebraném stanovišti do té doby, než byly dále transportovány. Následně byly vzorky z mořských mechovek nařezány pomocí sterilní holicí žiletky a potom byly promyty sterilní mořskou vodou. Každý odebraný vzorek byl vyfotografován pro pozdější taxonomické zařazení. Celkem bylo odebráno 10 vzorků z Baltského moře z 5 různých druhů mechovek a 11 vzorků ze Středoziemního moře z 9 různých druhů mechovek. Vzorky mechovek byly zafixovány a podrobeny vyšetření. Pomocí elektronového mikroskopu byly sledovány symbiotické mikroorganismy.

Pro mikrobiologické analýzy byly vzorky mechovek rozdrceny pomocí sterilní paličky a naředěny ve sterilizované mořské vodě (10^{-1} – 10^{-5}). Naředěné vzorky byly asepticky natírány na kultivační médium. Pro kultivaci bakterií bylo použito TSB3S25 médium (obsahující 0,3 % sójového tryptonu – Difco, 2,5 % NaCl a 1,5 % agaru). Komponenty byly rozpuštěny v přírodní mořské vodě odebrané z Baltského a Středoziemního moře. Misky byly kultivovány při 25 °C 1 týden. Po kultivaci byly kolonie izolovány, identifikovány a byla

sledována jejich antimikrobiální aktivita proti *Staphylococcus lentus*, *Bacillus subtilis* a *Escherichia coli*, což je shrnuto v tabulce číslo 1 (Heindl et al., 2009).

Tabulka 1: Souhrn izolovaných bakterií a jejich antimikrobiální aktivita (Heindl et al., 2009)

Příslušný rod bakterie	Antimikrobiální aktivita proti		
	<i>Staphylococcus lentus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Cellulomonas</i>	+	–	–
<i>Tenacibaculum</i>	–	+	–
<i>Pseudovibrio</i>	+	+	+
<i>Sphingomonas</i>	+	–	–
<i>Alteromonas</i>	–	+	–
<i>Marinomonas</i>	+	+	–
<i>Pseudoalteromonas</i>	+	+	–
<i>Arctic sea water bacterium</i>	–	+	–
<i>Alteromonadaceae</i>	+	+	–
<i>Shewanella</i>	+	+	–
<i>Vibrio</i>	–	+	–

Nejčastěji se vyskytující rody bakterií stanovené v mořských mechovkách jsou popsány v následujících kapitolách.

2.8.1 *Pseudoalteromonas*

Pseudoalteromonas je rod mořských bakterií. V roce 1995 Gauthier et al. navrhli *Pseudoalteromonas* jako nový rod, který byl vyčleněn z rodu *Alteromonas*. Oddělen byl na základě výsledků rRNA-DNA hybridizačních studií. Jedná se o gramnegativní, heterotrofní aerobní bakterie. Buňky mají tvar mírně zakřivených tyčinek a vyskytují se jednotlivě nebo v párech. Dosahují šířky 0,3–0,9 µm. Netvoří mikrocyty ani endospory. Buňky jsou schopny růstu při teplotě 4–30 °C. Pozorované kolonie rodu *Pseudoalteromonas* mají béžovou barvu, jsou hladké s rovnými okraji a rostou do průměru 1–2 mm. *Pseudoalteromonas* se nacházejí

ve všech oceánech světa převážně při teplotě 20 °C. Poprvé byl rod *Pseudoalteromonas* izolován z mořských řas a je prokázáno, že je producentem celé řady biologicky aktivních látek (Bozal et al., 1997).

2.8.2 *Alteromonas*

Alteromonas je rod proteobakterií, které se nacházejí v mořské vodě jak na otevřeném oceánu, tak i na pobřeží. Jedná se o gramnegativní, aerobní a heterotrofní bakterie s jedním polárně umístěným bičíkem. Buňky mají tvar zakřivených tyčinek. Nejmasivnější výskyt byl zaznamenán u polynéských ostrovů. Dříve rod *Alteromonas* zahrnoval 4 druhy. Ale nyní na základě rRNA-DNA hybridizačních experimentálních studií bylo přiřazeno do rodu *Alteromonas* celkem 14 druhů (Gauthier et al., 1995).

2.8.3 *Shewanella*

Shewanella je rod mořských bakterií, které patří k jedněm z nejběžnějších bakterií na Zemi. *Shewanella* je fakultativní, gramnegativní, anaerobní bakterie s polárně umístěným bičíkem. Buňky mají tyčinkovitý tvar a jsou 2–3 µm dlouhé a 0,5–0,6 µm široké. Vytvářejí kolonie, které mají kruhový tvar, jsou hladké a konvexní. Mají béžovou až narůžovělou barvu, což závisí na stáří samotné kolonie. Jejich růst není závislý na iontech sodíku. Růst buněk byl zaznamenán při různých teplotách, ale neoptimálnější teplota pro růst je kolem 30 °C. Buňky jsou schopny přeměnit dusičnan na dusitan a dusitan na oxid dusný. Přírůst buněk je nejmasivnější při optimální koncentraci NaCl a přírůst může činit až 3 % za týden. *Shewanella oneidensis* patří k jednomu z nejznámějších druhů z rodu *Shewanella*. Své jméno získala podle jezera Oneida v USA, kde byla prvně izolována. *Shewanella oneidensis* se převážně nachází ve velkých hloubkách. Tento druh je zvláště zajímavý v oblasti výzkumu kvůli své schopnosti a potenciálu biosanace těžkých kovů (Gorby et al., 2006).

2.8.4 *Vibrio*

Vibrio je rod gramnegativních, fakultativně anaerobních bakterií. Buňky mají tvar přímých nebo mírně zakřivených tyčinek. Pohybují se pomocí bičíků. Žijí saprofytický ve sladké i v mořské vodě, v půdě i v organismu člověka a zvířat (např. druhy *Vibrio fischeri*,

Vibrio costicola). Rostou na běžných půdách, někdy i při vyšším pH (až 10). Některé druhy jsou patogenní, např. *Vibrio cholerae* vyvolává cholera. Přenáší se téměř výhradně vodou v prostředí se špatnými hygienickými podmínkami. *Vibrio parahaemolyticus* se vyskytuje v organismu některých mořských ryb. Je nejčastější příčinou gastroenteritid v Japonsku, kde se konzumují syrové ryby (Blake et al., 1979).

2.8.5 *Bacillus*

Bacillus je rovná grampozitivní sporulující tyčinkovitá aerobní nebo fakultativně anaerobní bakterie o velikosti $1 \times 4 \mu\text{m}$. Buňky tvoří spory, které jsou teplotně rezistentní po dobu 30 minut. Rod *Bacillus* je poměrně rozsáhlý a značně rozšířený v přírodním prostředí, zejména v půdě a ve vodě, odkud se zejména spory mohou dostávat i do ovzduší. Jeho druhy vytvářejí amylolytické, pektinolytické a proteolytické enzymy, které pomáhají rozkládat různé organické zbytky rostlin a živočichů. Rod *Bacillus* se využívá hlavně v medicíně, kde produkuje antibiotika. Tvoří bělavé až hnědavé nepravidelné kolonie buněk. Optimální pH je 5,5–8,5. Rod *Bacillus* tvoří asi 10 % epifytních bakterií na rostlinách. Tento rod je také znám díky své produkci fytoalexinů – látek působících stimulačně nebo inhibičně na růst rostlin. Nejznámějším druhem z rodu *Bacillus* je *Bacillus anthracis*. Jedná se o grampozitivní fakultativně anaerobní bakterii tyčinkovitého tvaru, která je známa především jako původce onemocnění anthrax (Anagnostopoulos a Spizizen, 1961).

2.8.6 *Psychrobacter*

Psychrobacter je rod heterotrofních gramnegativních tyčinkovitých, aerobních a mořských bakterií. Předpona Psychro- je odvozena z řeckého přídavného jména Psychros, což v překladu znamená zima. *Psychrobacter* je tedy velmi rezistentní vůči zimě a nepříznivým teplotním podmínkám. Tento rod je psychrofilní a optimální teplota pro jeho růst je 5 °C. Jakmile teplota překročí 35–37 °C, kolonie již nedokážou růst. Kolonie rodu jsou neprůhledné a hladké. Vyskytuje se v oceánech, nejčastěji v Antarktickém, kde byl izolován z široké škály stanovišť, hlavně tedy z mořské vody, ale také z kůže nebo žaber ryb. Například *Psychrobacter glacincola* byl izolován z ledu Antarktického oceánu a *Psychrobacter proteolyticus* byl nalezen v žaludku ryb z Antarktického oceánu (Bowman et al., 1996).

3. Hypotéza

Jak již bylo zmíněno výše, k dnešnímu dni existuje jen velmi malý počet studií, které se zabývají zkoumáním mikroorganismů ve sladkovodních mechovkách. Vzhledem k tomu, že v mořských mechovkách je známý častý výskyt symbiotických bakterií, předpokládáme, že takové bakterie budou přítomny i v koloniích *Pectinatella magnifica*. Dále předpokládáme, že množství bakterií v koloniích mechovky bude podobné jako v okolní vodě.

4. Cíl práce

Cílem mé diplomové práce je pomocí selektivních médií stanovit počty bakterií v koloniích mechovky *Pectinatella magnifica* a v okolní vodě a získané výsledky statisticky zhodnotit.

5. Materiál a metody

Vzorky z kolonií bochnatky *Pectinatella magnifica* byly odebrány na čtyřech lokalitách v jižních Čechách, a to na lokalitách Cep, Hejtman, Kanclíř a Veselí.

Byla vždy odebrána povrchová hmota z kolonie *Pectinatella magnifica*, která obsahovala zooidy, a dále pak oddělením od povrchové hmoty byla získána rosolovitá hmota z kolonie *Pectinatella magnifica*. Současně byla vždy odebírána i okolní voda. Povrchová vrstva byla od kolonií mechovky asepticky seškrábnuta skalpelem, čímž se odkryla rosolovitá hmota kolonie bochnatky, která pak byla sterilizována. Vzorky *Pectinatella magnifica*, které byly použity k mikrobiotických testům, byly asepticky vloženy do nádob s bezkyslíkovou peptonovou vodou, uloženy v lednici a do 5 hodiny od nasbírání byly vzorky analyzovány. Vzorky odebrané okolní vody byly uloženy do sterilní nádoby a uskladněny za teploty 4 °C až do doby, než byly analyzovány.

5.1 Popis vzorků a lokalit

Během letních měsíců v průběhu tří let, a to od roku 2012 do roku 2015, byly odebírány vzorky mechovky *Pectinatella magnifica* z různých lokalit v jižních Čechách. Byl proveden mikrobiologický rozbor a kultivačně stanoveny počty bakterií. Izoláty byly charakterizovány a bakterie byly identifikovány. Termíny odběrů jsou popsány v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2: Termíny odběrů vzorků *Pectinatella magnifica* v letech 2012–2015

Rok	Termín odběru
2012	10. července
	30. července
	15. srpna
2013	7. července
	21. srpna
2014	9. července
	4. srpna
	8. září
2015	8. července
	3. srpna
	8. září

5.2 Stanovení bakterií

Bakterie byly stanoveny kultivačně na základě materiálu z literárních zdrojů a byla sestavena kultivační média.

Minimální médium s glukózou

Složení: 10 mg peptonu

5 mg kvasničního extraktu

1 g glukózy

10 g Na Cl

15 agaru

1 l vody

„Yeast extract“ agar (Oxoid)

Složení: 23 g Yeast extract agar

5 g tryptonu

1 g glukózy

1 l vody

„Bochnatkové médium“

Byly použity stejné komponenty jako v předchozím médiu, nebyly však rozpuštěny ve vodě, ale ve výluhu z bochnatky. Výluh z bochnatky byl připraven následujícím způsobem: 0,5 kg kolonie bochnatky bylo rozvařeno v 0,5 l vody a následně přefiltrováno. Byly navrženy následující podmínky pro kultivaci: 5 dní při 24 °C aerobně i anaerobně. Teplota 24 °C byla určena jako optimální, protože právě při této teplotě je nárůst kolonií mechovek nejmasivnější. Vzhledem k tomu, že je požadavek na stanovení aerobních i anaerobních bakterií, tak bude kultivace probíhat jak za přítomnosti kyslíku, tak i za jeho nepřítomnosti.

Výsledky z prvního roku stanovení mikroorganismů ukázaly, že pro kultivaci a izolaci co nejrozmanitějšího spektra bakterií se nejlépe hodí „Yeast extract“ agar (Oxoid) s přídavkem tryptonu a glukózy. Na tomto agaru byly kultivovány bakterie ve všech čtyřech sledovaných letech. Kultivace probíhala za aerobních podmínek pro stanovení aerobních

bakterií. Další byla anaerobní kultivace, při které byly stanoveny jak striktně anaerobní, tak fakultativně anaerobní bakterie. Aby bylo možné stanovit striktně anaerobní bakterie, bylo do kultivačního média přidáno antibiotikum neomycin v koncentraci 70 mg/l. Kultivace probíhala při 24 °C po dobu 4 dnů. Výsledky byly statisticky zhodnoceny.

5.3 Statistická analýza

Získaná data byla statisticky zpracována. Rozdíly skupin aerobních, fakultativně anaerobních a striktně anaerobních bakterií v jednotlivých typech vzorků byly porovnány v programu STATISTICA 12 metodou ANOVA.

Analýza rozptylu (ANOVA) je metoda matematické statistiky. Umožňuje ověřit, zda na hodnotu náhodné veličiny pro určitého jedince má statisticky významný vliv hodnota některého znaku, který se u jedince dá pozorovat. Tento znak musí nabývat jen konečného počtu možných hodnot, a to nejméně dvou, a slouží k rozdělení jedinců do vzájemně porovnávaných skupin. Kvantitativní hodnota znaku přitom nemá povahu míry. Je třeba vzít v úvahu i konkrétní kvantitativní hodnotu jako míru určitého znaku, použije se místo analýzy rozptylu lineární model.

Dále byla stanovena korelace mezi počtem bakterií v povrchové nebo gelové hmotě bochnatky a počtem bakterií v okolní vodě. Pro regresní analýzu byla použita metoda jednoduché lineární regrese.

Lineární regrese je matematická metoda, která se používá pro proložení souboru bodů v grafu přímkou. O bodech, které reprezentují měřená data, se předpokládá, že jejich x-ové souřadnice jsou přesné. Ypsilonové souřadnice mohou být zatíženy náhodnou chybou. Předpokládá se, že závislost y na x lze graficky vyjádřit přímkou. Pokud měřené body proložíme přímkou, tak při odečítání z grafu bude mezi ypsilonovou hodnotou měřeného bodu a ypsilonovou hodnotou ležící na přímce odchylka. Podstatou lineární regrese je nalezení takové přímky, aby součet druhých mocnin těchto odchylek byl co nejmenší.

6. Výsledky

Počty bakterií stanovené v obou typech vzorků z *Pectinatella magnifica* a v okolní vodě v letech 2012–2015 jsou uvedeny v tabulkách a jsou popsány níže.

V roce 2012 byly stanoveny počty bakterií z obou typů vzorků *Pectinatella magnifica* a z okolní vody. V roce 2012 nebyly stanoveny odděleně fakultativně anaerobní bakterie a striktně anaerobní bakterie. V tabulce číslo 3 jsou anaerobní bakterie uvedeny včetně fakultativně anaerobních bakterií.

Tabulka č. 3: Počty bakterií (log KTJ/g) ve vzorcích *Pectinatella magnifica* a ve vodě stanovené v roce 2012

		Datum odběru					
		10. července		30. července		15. srpna	
Lokalita	Typ vzorku	Aerobní bakterie	Anaerobní bakterie	Aerobní bakterie	Anaerobní bakterie	Aerobní bakterie	Anaerobní bakterie
Cep	Rosolovitá hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	4,22	3,82	4,90	3,16	4,79	2,46
	Povrchová hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	4,98	4,82	5,42	2,30	6,21	2,98
	Voda	3,76	1,86	2,19	1,40	4,60	2,40
Hejman	Rosolovitá hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	4,82	3,29	4,80	3,76	3,86	1,30
	Povrchová hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	6,50	3,70	5,50	3,84	6,61	3,56
	Voda	3,56	1,96	3,80	1,90	4,60	1,26
Kanclíř	Rosolovitá hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	6,49	5,85	4,95	4,30	6,37	6,85
	Povrchová hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	6,53	6,52	6,71	5,27	6,37	4,82
	Voda	3,26	1,74	4,96	2,80	4,60	2,10
Veselí	Rosolovitá hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	5,91	3,26	5,32	3,87	5,10	3,78
	Povrchová hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	6,60	4,15	4,96	3,81	5,18	3,67
	Voda	5,12	2,90	3,27	1,64	3,30	2,60
Průměr ± směrodatná odchylka	Rosolovitá hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	5,36 ± 0,89	4,06 ± 1,06	4,99 ± 0,20	3,77 ± 0,41	5,00 ± 0,90	3,60 ± 2,07
	Povrchová hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	6,02 ± 0,63	4,80 ± 1,07	5,54 ± 0,70	3,81 ± 1,05	6,09 ± 0,55	3,76 ± 0,67
	Voda	3,93 ± 0,71	2,12 ± 0,46	3,56 ± 1	1,94 ± 0,53	4,28 ± 0,56	1,84 ± 0,54

Počty aerobních bakterií v rosolovité hmotě bochnatek stanovené souhrnně na všech lokalitách během roku 2012 se pohybovaly od 4,22 log KTJ/g (10. července, Cep) do 6,37 log KTJ/g (15. srpna, Kanclíř). Průměrné nejvyšší počty byly zaznamenány při prvním odběru, tedy 10. července, nejnižší pak 30. července. Četnost anaerobních bakterií v rosolovité hmotě

byla nižší, jejich počty se pohybovaly od 1,30 log KTJ/g do 4,30 log KTJ/g. Nejvíce anaerobů bylo průměrně detekováno při prvním odběru, nejméně pak při posledním odběru v srpnu.

V povrchové hmotě bochnatek byly počty aerobních bakterií během roku 2012 sledovány a pohybovaly se od 4,96 log KTJ/g (30. červenec, Veselí) do 6,61 log KTJ/g (15. srpna, Hejtnan). Celkově průměrně nejvyšší počty aerobních bakterií byly zaznamenány při posledním odběru, tedy 15. srpna, a naopak nejnižší byly zaznamenány při druhém odběru, a to 30. července. Anaerobní bakterie se v povrchové hmotě bochnatek vyskytovaly méně. Jejich počet se pohybuje v rozmezí od 2,30 log KTJ/g do 6,52 log KTJ/g. V povrchové hmotě bochnatek se průměrně nejvíce anaerobních bakterií vyskytovalo při posledním odběru (15. srpna) a nejvíce při druhém odběru (30. července).

Během roku 2012 se také stanovovaly počty aerobních bakterií obsažených v okolní vodě. Nejvyšší počet aerobů ve vodě byl zaznamenán 10. července na lokalitě Veselí, a to 5,12 log KTJ/g. Naopak nejnižší počet aerobních bakterií ve vodě byl zaznamenán 30. července také na lokalitě Veselí a hodnota byla 3,27 log KTJ/g. Četnost výskytu anaerobních bakterií v okolní vodě se pohybovala v rozmezí od 1,26 log KTJ/g (15. srpna, Hejtnan) do 2,90 log KTJ/g (10. července, Veselí). Průměrně nejméně anaerobních bakterií bylo při posledním odběru, a to 15. srpna, naopak průměrně nejvíce anaerobů bylo při prvním odběru 10. července.

V dalším roce 2013 byly stanoveny počty bakterií ze vzorků rosolovité hmoty *Pectinatella magnifica*, povrchové hmoty *Pectinatella magnifica* a z okolní vody. V roce 2013 se již stanovovaly odděleně fakultativní anaerobní bakterie a striktně anaerobní bakterie. V tabulce číslo 4 jsou uvedeny počty stanovených bakterií.

Tabulka č. 4: Počty bakterií (log KTJ/g) ve vzorcích *Pectinatella magnifica* a ve vodě stanovené v roce 2013

Lokalita	Typ vzorku	Datum odběru					
		7.července			21. srpna		
		Aerobní bakterie	Fakultativně anaerobní bakterie	Anaerobní bakterie	Aerobní bakterie	Fakultativně anaerobní bakterie	Anaerobní bakterie
Cep	Rosolovitá hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	NEBYLY NALEZENY			6,65	6,50	3,82
	Povrchová hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	NEBYLY NALEZENY			8,33	8,51	4,82
	Voda	NEBYLY NALEZENY			3,76	NESTANOVENO	2,86
Hejtman	Rosolovitá hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	4,79	3,42	3,29	5,78	7,93	3,76
	Povrchová hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	7,35	7,31	3,70	8,31	7,90	3,84
	Voda	3,68	NESTANOVENO	2,70	3,56	NESTANOVENO	2,96
Kanclíř	Rosolovitá hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	4,88	6,01	5,85	5,63	5,66	3,43
	Povrchová hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	5,29	7,19	7,09	8,06	7,70	4,47
	Voda	3,08	NESTANOVENO	2,78	3,26	NESTANOVENO	2,74
Veselí	Rosolovitá hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	4,56	5,38	3,26	5,63	3,73	3,87
	Povrchová hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	6,49	6,58	4,15	6,67	6,37	5,36
	Voda	3,90	NESTANOVENO	2,12	3,86	NESTANOVENO	2,36
Průměr ± směrodatná odchylka	Rosolovitá hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	4,74 ± 0,13	4,94 ± 1,10	4,13 ± 1,21	5,92 ± 0,42	5,96 ± 1,52	3,72 ± 0,17
	Povrchová hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	6,38 ± 0,84	7,03 ± 0,32	4,98 ± 1,50	7,84 ± 0,69	7,62 ± 0,78	4,62 ± 0,55
	Voda	3,55 ± 0,35		2,53 ± 0,29	3,61 ± 0,23		2,73 ± 0,23

Při prvním odběru 7. července bylo zaznamenáno nejvíce aerobních bakterií v povrchové hmotě *Pectinatella magnifica* na lokalitě Hejtman, a to 7,35 log KTJ/g, nejméně také na lokalitě Hejtman, ale v okolní vodě, a to 3,68 KTJ/g. U fakultativně anaerobních bakterií byly zaznamenány nejnižší počty v rosolovité hmotě kolonie *Pectinatella magnifica* na lokalitě Hejtman při prvním odběru 7. července, a to 3,42 log KTJ/g. Striktně anaerobní bakterie byly nejvíce zastoupeny v povrchové hmotě na lokalitě Kanclíř, nejméně byly detekovány ve vodě na lokalitě Veselí. U odběru 7. července na lokalitě Cep bohužel nebyly detekovány žádné aerobní, fakultativně anaerobní ani striktně anaerobní bakterie.

Při druhém odběru 21. srpna bylo nejvíce aerobních bakterií zaznamenáno na lokalitě Cep v povrchové hmotě *Pectinatella magnifica*, nejméně pak v okolní vodě na lokalitě Kanclíř. Fakultativně anaerobní bakterie byly nalezeny nejméně v rosolovité hmotě na lokalitě Veselí, a to 3,73 log KTJ/g, a naopak nejvíce jich bylo detekováno v povrchové hmotě na lokalitě Cep, a to 8,51 log KTJ/g. Striktně anaerobní bakterie byly nejvíce

zastoupeny v povrchové hmotě *Pectinatella magnifica* na lokalitě Veselí a nejméně jich bylo nalezeno v okolní vodě také na lokalitě Veselí.

V roce 2014 byly stanoveny počty bakterií z obou typů vzorků *Pectinatella magnifica* a z okolní vody. V roce 2014 proběhly 3 odběry: 9. července, 4. srpna a 8. září, a stanovovaly se jak aerobní, fakultativně anaerobní, tak i striktně anaerobní bakterie. V tabulce číslo 5 jsou hodnoty zaznamenány pro všechny typy bakterií.

Tabulka č. 5: Počty bakterií (log KTJ/g) ve vzorcích *Pectinatella magnifica* a ve vodě stanovené v roce 2014

Lokalita	Typ vzorku	Datum odběru								
		9.července			4.srpna			8.září		
		Aerobní bakterie	Fakultativně anaerobní bakterie	Anaerobní bakterie	Aerobní bakterie	Fakultativně anaerobní bakterie	Anaerobní bakterie	Aerobní bakterie	Fakultativně anaerobní bakterie	Anaerobní bakterie
Cep	Rosolovitá hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	3,64	3,21	4,40	5,73	4,50	5,26	5,36	5,56	3,45
	Povrchová hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	1,60	1,60	3,52	5,72	5,78	4,10	6,54	6,54	2,90
	Voda	2,28	2,89	1,33	3,30	1,76	1,38	1,99	1,75	0,60
Hejtman	Rosolovitá hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	4,26	4,11	6,65	5,84	5,81	3,92	5,37	5,28	3,33
	Povrchová hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	7,81	7,70	3,31	8,41	8,53	5,64	7,81	7,51	4,15
	Voda	2,48	3,55	1,75	2,92	2,58	1,25	2,37	2,18	1,40
Kanclíř	Rosolovitá hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	5,36	5,30	6,48	6,36	6,21	4,50	5,20	5,13	3,53
	Povrchová hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	7,61	7,64	6,48	8,96	8,90	6,43	7,95	7,91	4,48
	Voda	2,82	3,54	1,79	3,19	3,13	1,80	2,70	2,57	1,48
Veselí	Rosolovitá hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	5,43	4,58	3,59	6,10	4,50	2,27	3,84	3,72	2,41
	Povrchová hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	6,52	6,51	2,82	9,51	9,20	5,40	8,89	8,56	6,00
	Voda	2,80	3,40	1,10	2,80	2,60	1,20	1,90	1,20	0,80
Průměr ± směrodatná odchylka	Rosolovitá hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	4,67 ± 0,76	4,30 ± 0,76	5,28 ± 0,32	6,00 ± 0,24	5,14 ± 0,89	3,99 ± 1,10	4,94 ± 0,64	4,92 ± 0,71	3,18 ± 0,45
	Povrchová hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	7,21 ± 0,52	7,16 ± 0,52	4,03 ± 1,44	8,15 ± 1,46	8,10 ± 1,36	5,37 ± 0,87	7,80 ± 0,84	7,63 ± 0,73	4,38 ± 1,10
	Voda	2,60 ± 0,23	3,35 ± 0,27	1,49 ± 0,29	3,05 ± 0,04	2,52 ± 0,49	1,14 ± 0,24	2,24 ± 0,32	1,93 ± 0,51	1,01 ± 0,34

Počty aerobních bakterií v rosolovité hmotě bochnatek stanovené souhrnně na všech lokalitách během roku 2014 se pohybovaly od 3,64 log KTJ/g (9. července, Cep) do 6,36 log KTJ/g (4. srpna, Kanclíř). Průměrně nejvyšší počty byly zaznamenány při druhém odběru 4. srpna, nejnižší pak při prvním odběru 9. července. Výskyt fakultativně anaerobních bakterií v rosolovité hmotě byl o něco nižší. Jejich počty se pohybovaly od 3,21 log KTJ/g do 6,21 log

KTJ/g. Četnost striktně anaerobních bakterií v rosolovité hmotě byla nejvyšší při prvním odběru na lokalitě Kanclíř, a to 6,48 log KTJ/g. Nejnižší četnost striktně anaerobních bakterií v rosolovité hmotě byla detekována při druhém odběru na lokalitě Veselí, a to 2,27 log KTJ/g.

V povrchové hmotě bochnatek se stanovovala četnost aerobních bakterií, která se během roku 2014 pohybovala od 1,60 log KTJ/g při prvním odběru (9. července) na lokalitě Cep do 9,51 log KTJ/g při druhém odběru (4. srpna) na lokalitě Veselí. Průměrně nejnižší počty aerobních bakterií v povrchové hmotě byly zaznamenány při prvním odběru (9. července) a nejvyšší počty byly zaznamenány při druhém odběru (4. srpna). Fakultativně anaerobní bakterie se v povrchové hmotě vyskytovaly o něco méně. Nejvíce jich bylo zjištěno při druhém odběru 4. srpna na lokalitě Veselí, a to 9,20 log KTJ/g. Nejmenší výskyt byl naměřen při prvním odběru 9. července na lokalitě Cep, a to 1,60 log KTJ/g, což byl stejný počet jako aerobních bakterií v povrchové hmotě. Striktně anaerobní bakterie v povrchové hmotě se nejvíce vyskytovaly na lokalitě Kanclíř při prvním odběru, a to 6,48 log KTJ/g. Nejméně se pak vyskytovaly na lokalitě Veselí také při prvním odběru dne 9. července.

Výskyt aerobních bakterií v okolní vodě se pohyboval od 1,90 log KTJ/g při posledním odběru (8. září, Veselí) do 3,30 log KTJ/g při druhém odběru (4. srpna, Cep). Průměrně nejvíce se aerobů v okolní vodě vyskytovalo při druhém odběru. Nejvyšší četnost fakultativních bakterií v okolní vodě byla detekována na lokalitě Hejtman při prvním odběru (9. července). Nejnižší četnost fakultativních bakterií v okolní vodě byla detekována také na lokalitě Hejtman, ale při posledním odběru (8. září). Průměrně nejvíce fakultativně anaerobních bakterií ve vodě bylo nalezeno při prvním odběru, a to 3,35 log KTJ/g. Striktně anaerobní bakterie se v okolní vodě nejvíce vyskytovaly na lokalitě Kanclíř při druhém odběru (4. srpna) a nejméně se pak vyskytovaly na lokalitě Cep. Průměrně nejméně byly striktně anaerobní bakterie detekovány při posledním odběru, a to 1,01 log KTJ/g, a průměrně nejvíce při prvním odběru, a to 1,49 log KTJ/g.

V roce 2015 byly stanoveny počty bakterií z rosolovité hmoty kolonie *Pectinatella magnifica*, z povrchové hmoty kolonie *Pectinatella magnifica* a z okolní vody. V roce 2015 proběhly 3 odběry a stanovovaly se aerobní bakterie, fakultativně anaerobní bakterie a striktně anaerobní bakterie. V tabulce číslo 6 jsou hodnoty zaznamenány pro všechny typy bakterií.

Tabulka č. 6: Počty bakterií (log KTJ/g) ve vzorcích *Pectinatella magnifica* a ve vodě stanovené v roce 2015

Lokalita	Typ vzorku	Datum odběru								
		8. července			3. srpna			8. září		
		Aerobní bakterie	Fakultativně anaerobní bakterie	Anaerobní bakterie	Aerobní bakterie	Fakultativně anaerobní bakterie	Anaerobní bakterie	Aerobní bakterie	Fakultativně anaerobní bakterie	Anaerobní bakterie
Cep	Rosolovitá hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	NEBYLY NALEZENY			5,84	5,64	3,30	4,65	3,69	2,54
	Povrchová hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	NEBYLY NALEZENY			7,40	7,15	1,74	5,37	4,91	2,67
	Voda	NEBYLY NALEZENY			2,18	2,70	1,10	2,51	2,42	1,37
Hejtman	Rosolovitá hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	5,46	4,68	4,17	5,00	4,53	3,30	NEBYLY NALEZENY		
	Povrchová hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	6,75	6,73	2,94	4,98	9,16	6,75	NEBYLY NALEZENY		
	Voda	2,42	2,25	1,40	1,88	1,87	0,00	NEBYLY NALEZENY		
Kanclíř	Rosolovitá hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	4,87	6,26	5,32	4,22	3,00	0,00	NEBYLY NALEZENY		
	Povrchová hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	8,30	8,33	7,40	8,10	8,10	3,62	NEBYLY NALEZENY		
	Voda	3,74	3,63	2,51	2,35	2,35	1,82	NEBYLY NALEZENY		
Veselí	Rosolovitá hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	4,49	3,72	3,22	4,90	4,15	2,90	4,64	4,13	3,71
	Povrchová hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	7,20	7,10	5,88	6,53	5,51	4,43	6,59	6,57	6,30
	Voda	2,60	2,30	0,80	2,10	1,93	0,00	2,53	2,43	1,10
Průměr ± směrodatná odchylka	Rosolovitá hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	4,94 ± 0,49	4,89 ± 1,28	4,24 ± 1,05	4,79 ± 0,81	4,33 ± 1,09	2,38 ± 1,60	4,65 ± 0,01	3,91 ± 0,31	3,13 ± 0,83
	Povrchová hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	7,36 ± 0,83	7,36 ± 0,85	5,29 ± 2,11	6,66 ± 1,30	7,48 ± 1,55	4,14 ± 2,08	5,01 ± 0,52	5,74 ± 1,17	4,49 ± 2,57
	Voda	2,92 ± 0,58	2,73 ± 0,64	1,57 ± 0,71	2,13 ± 0,17	2,21 ± 0,34	1,46 ± 0,36	2,52 ± 0,01	2,43 ± 0,01	1,24 ± 0,14

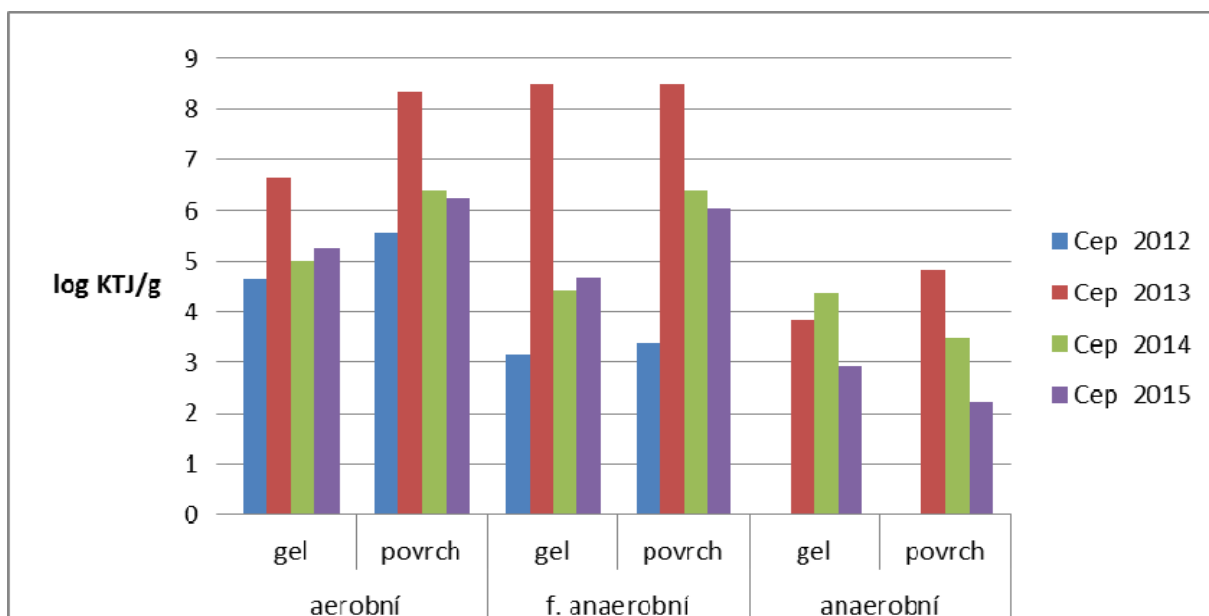
Při prvním odběru 8. července bylo zaznamenáno nejvíce aerobních bakterií v povrchové hmotě na lokalitě Kanclíř, nejméně pak ve vodě na lokalitě Hejtman. Na lokalitě Cep při prvním odběru nebyly nalezeny žádné aerobní bakterie. U fakultativně anaerobních bakterií se počty pohybovaly od 2,25 (log KTJ/g) ve vodě na lokalitě Hejtman do 8,33 (log KTJ/g) v povrchové hmotě na lokalitě Kanclíř. U striktně anaerobních bakterií byl nejnižší počet zaznamenán také ve vodě, ale na lokalitě Veselí, a nejvyšší počet byl zaznamenán stejně jako u fakultativně anaerobních bakterií v povrchové hmotě na lokalitě Kanclíř.

Při druhém odběru 3. srpna bylo detekováno nejvíce aerobů v povrchové hmotě na lokalitě Kanclíř a nejméně ve vodě na lokalitě Hejtman. Stejně tak fakultativně anaerobní bakterie byly nejvíce detekovány v povrchové hmotě, ale na lokalitě Hejtman, a na stejné lokalitě bylo současně zaznamenáno nejméně fakultativně anaerobních bakterií, ale ve vodě. Počty striktně anaerobních bakterií byly nejvyšší v povrchové hmotě na lokalitě Hejtman, a to 6,75 (log KTJ/g), a nejnižší ve vodě na lokalitě Cep, a to 1,10 log (KTJ/g).

Při třetím odběru 8. září nebyly nalezeny kolonie mechovek na lokalitách Hejtman a Kanclíř. Nejvíce aerobů bylo nalezeno v povrchové hmotě na lokalitě Veselí, a to 6,59 (log KTJ/g), a nejméně ve vodě na lokalitě Cep, a to 1,10 (log KTJ/g). Úplně stejné to bylo pro fakultativně anaerobní bakterie, kterých bylo nejvíce nalezeno, stejně jako aerobních bakterií, v povrchové hmotě na lokalitě Veselí a nejméně ve vodě na lokalitě Cep. Počty striktně anaerobních bakterií se pohybovaly od 6,30 (log KTJ/g) v povrchové hmotě na lokalitě Veselí do 1,10 (log KTJ/g) ve vodě na lokalitě Veselí.

Počty jednotlivých skupin bakterií stanovené ve všech sledovaných letech na lokalitě Cep jsou porovnány v grafu číslo 1.

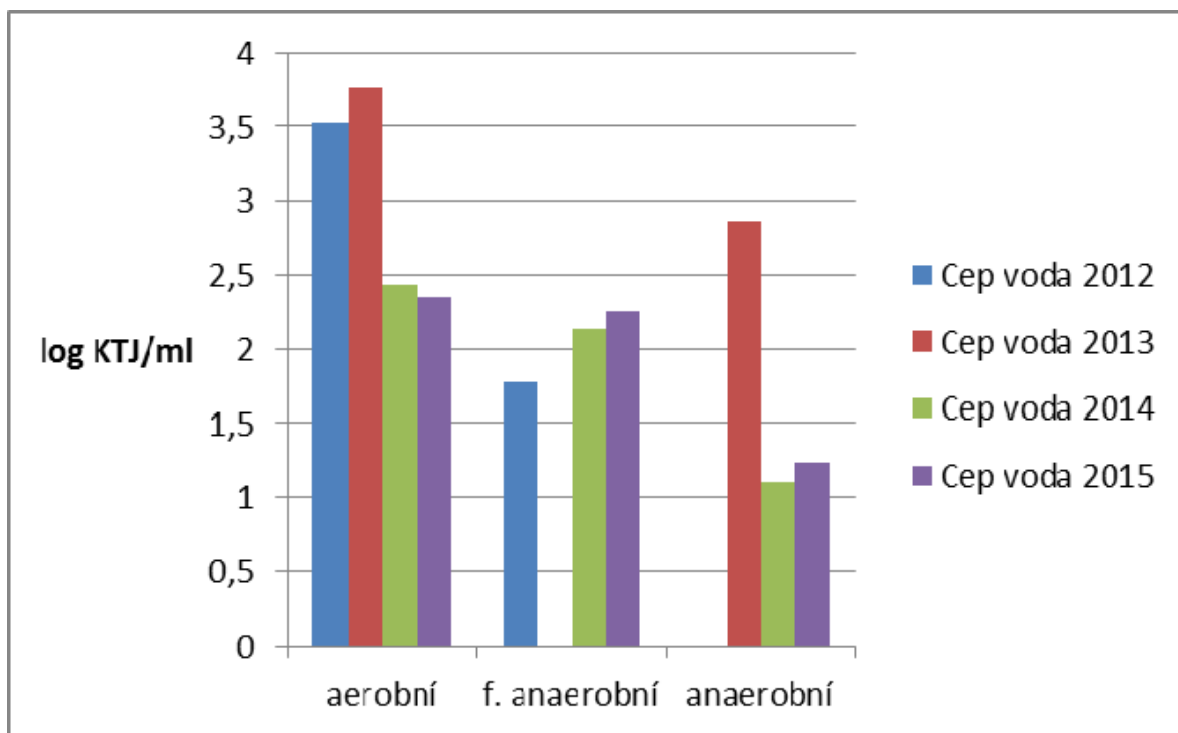
Graf č. 1: Počty bakterií stanovené v jednotlivých letech na lokalitě Cep



Z grafu číslo 1 je patrné, že nejvyšší počty bakterií byly na lokalitě Cep zaznamenány v roce 2013. Ve všech letech byly počty aerobních bakterií vyšší v povrchové hmotě než v gelu. To samé platí i pro bakterie fakultativně anaerobní. V roce 2013 byly striktně anaerobní bakterie četnější na povrchu než ve vnitřní gelové hmotě. V letech 2014 a 2015 tomu bylo naopak.

Počty aerobních, fakultativně anaerobních a striktně anaerobních bakterií stanovené ve všech sledovaných letech v okolní vodě na lokalitě Cep jsou porovnány v grafu číslo 2.

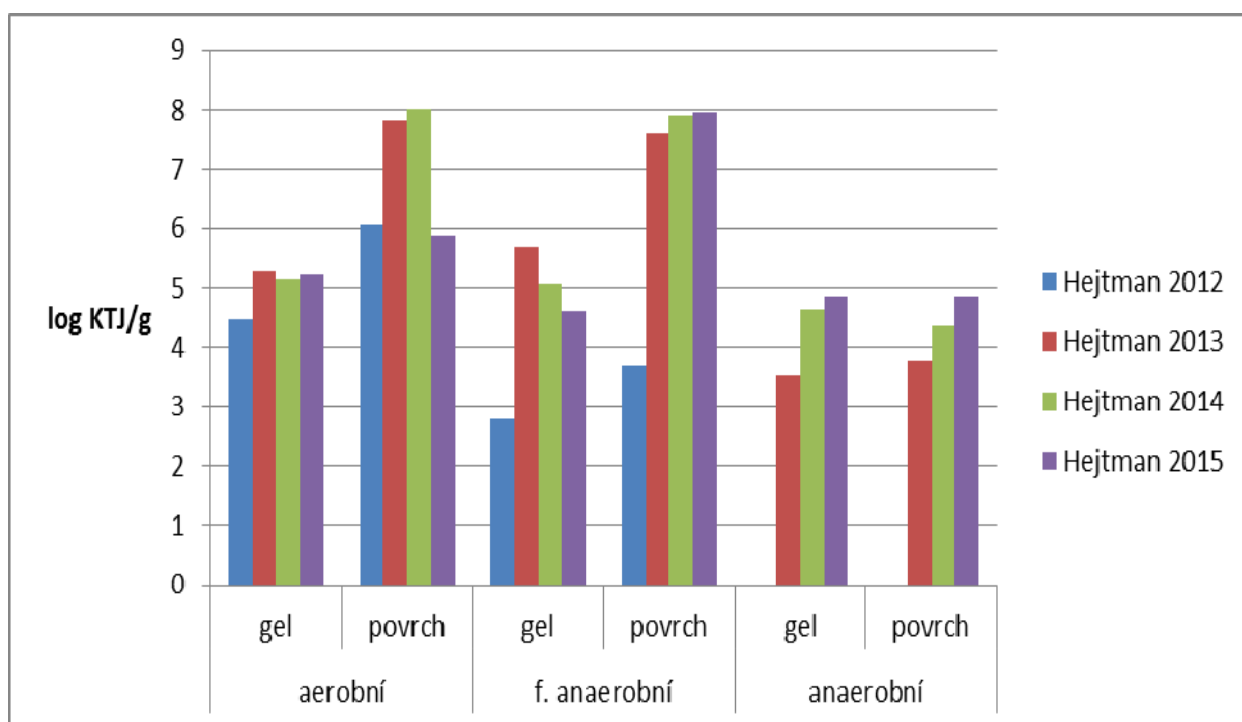
Graf č. 2: Počty bakterií stanovené v jednotlivých letech v okolní vodě na lokalitě Cep



Jak je patrné z grafu číslo 2, tak pouze aerobní bakterie se podařilo identifikovat z okolní vody ve všech sledovaných letech. Nejvíce aerobů bylo nalezeno v okolní vodě v roce 2013 a nejméně pak v roce 2015. Fakultativně anaerobní bakterie v okolní vodě se podařilo stanovit v roce 2012, kdy jich bylo nejméně, a v letech 2014 a 2015, kdy jich naopak bylo nejvíce. Striktně anaerobních bakterií v okolní vodě bylo nejvíce v roce 2013, což je o mnoho více než v roce 2014, kdy jich bylo nejméně.

V grafu číslo 3 jsou porovnány počty aerobních, fakultativně anaerobních a striktně anaerobních bakterií ve všech sledovaných letech, a to od roku 2012 do roku 2015 na lokalitě Hejtman.

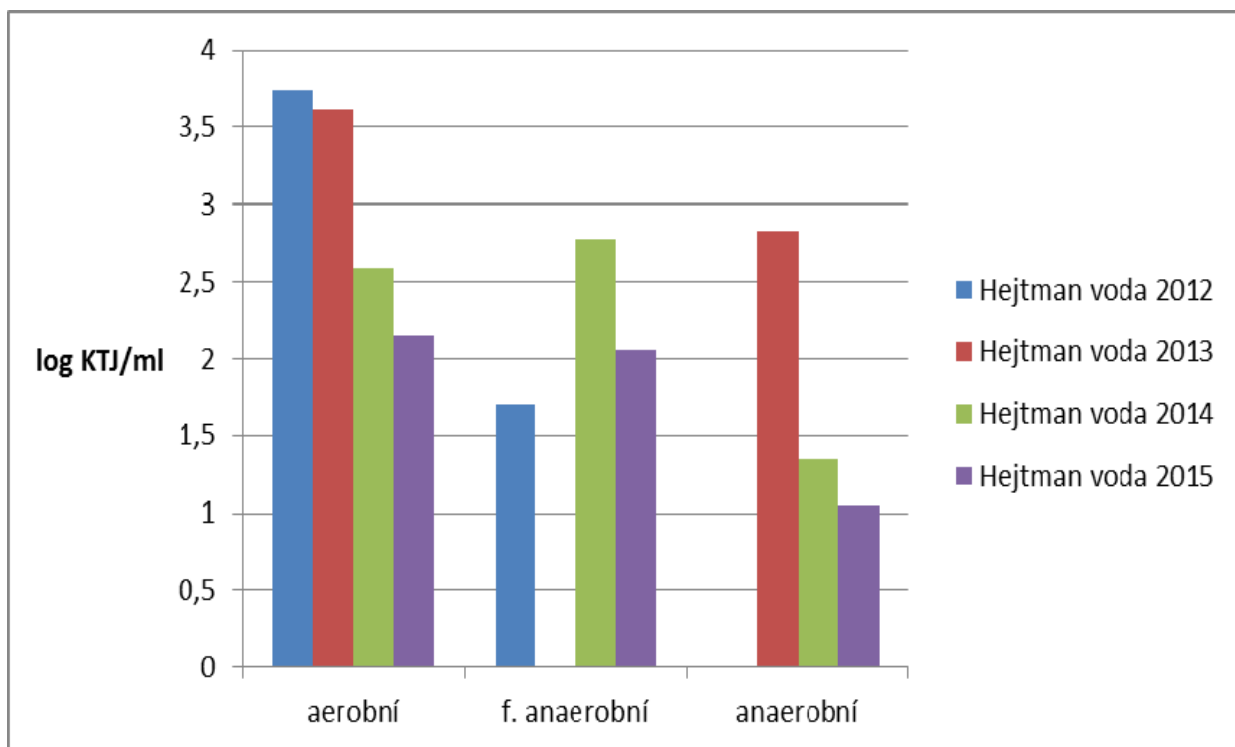
Graf č. 3: Počty bakterií stanovené v jednotlivých letech na lokalitě Hejtman



V grafu číslo 3 je vidět, že počty fakultativně anaerobních bakterií na lokalitě Hejtman v povrchové hmotě v letech 2013–2015 se výrazně neměnily. Pouze v roce 2012 bylo fakultativně anaerobních bakterií v povrchové hmotě detekováno výrazně méně. Aerobní bakterie v rosolovité hmotě byly identifikovány ve všech sledovaných letech přibližně stejně, nejméně však v roce 2012. Striktně anaerobní bakterie měly jak v rosolovité hmotě, tak i v povrchové hmotě přibližně stejnou tendenci – v roce 2015 jich bylo nalezeno nejvíce a v roce 2013 nejméně.

Počty jednotlivých skupin bakterií stanovené v okolní vodě ve všech sledovaných letech na lokalitě Hejtman jsou porovnány v grafu číslo 4.

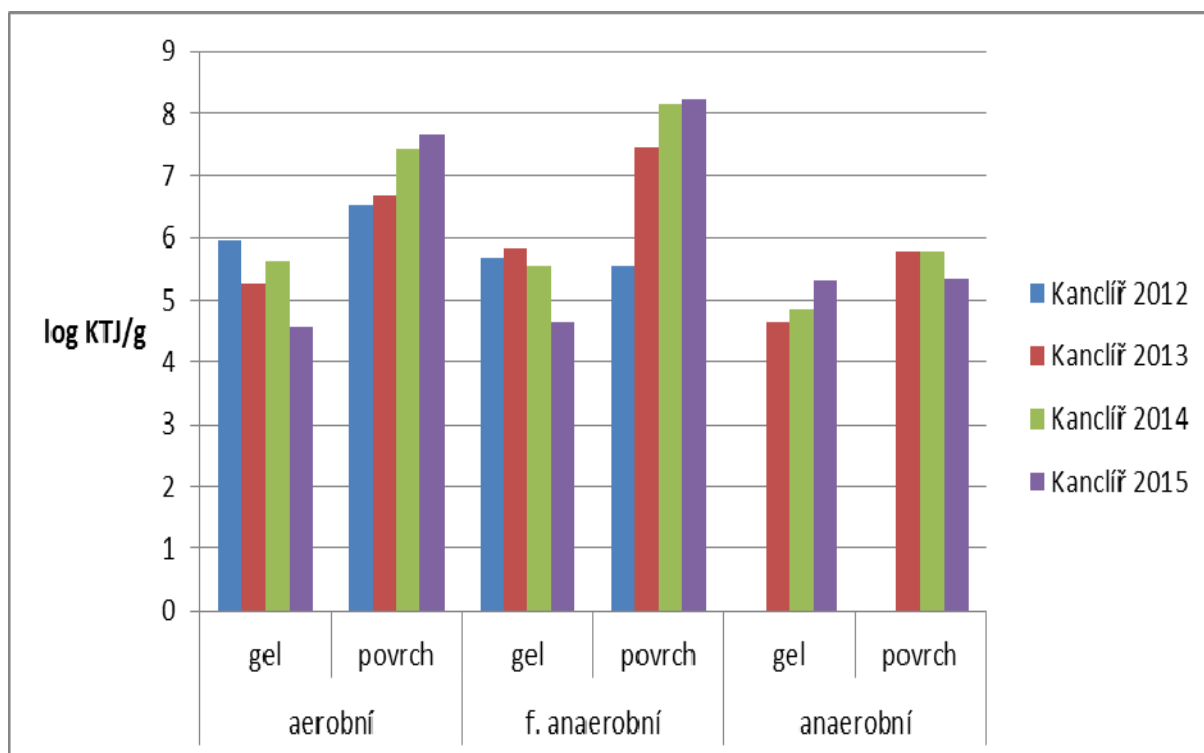
Graf č. 4: Počty bakterií stanovené v jednotlivých letech v okolní vodě na lokalitě Hejtman



V grafu číslo 4 je opět možné vidět, že pouze aerobní bakterie byly stanovené v okolní vodě ve všech sledovaných letech. Nejvíce aerobů v okolní vodě bylo v roce 2012, o něco méně aerobů bylo nalezeno v roce 2013 a nejméně aerobů v okolní vodě bylo v roce 2015. Fakultativně anaerobních bakterií v okolní vodě bylo nejvíce detekováno v roce 2014 a nejméně v roce 2012. V roce 2013 se bohužel nepodařilo stanovit fakultativně anaerobní bakterie v okolní vodě na lokalitě Hejtman. Naopak striktně anaerobních bakterií bylo nejvíce detekováno v roce 2013 a nejméně jich bylo detekováno v roce 2015. V roce 2012 se bohužel nepodařilo detekovat striktně anaerobní bakterie v okolní vodě na lokalitě Hejtman.

V grafu číslo 5 jsou porovnány počty aerobních bakterií, fakultativně anaerobních bakterií a striktně anaerobních bakterií ve všech sledovaných letech, a to od roku 2012 do roku 2015 na lokalitě Kanclíř.

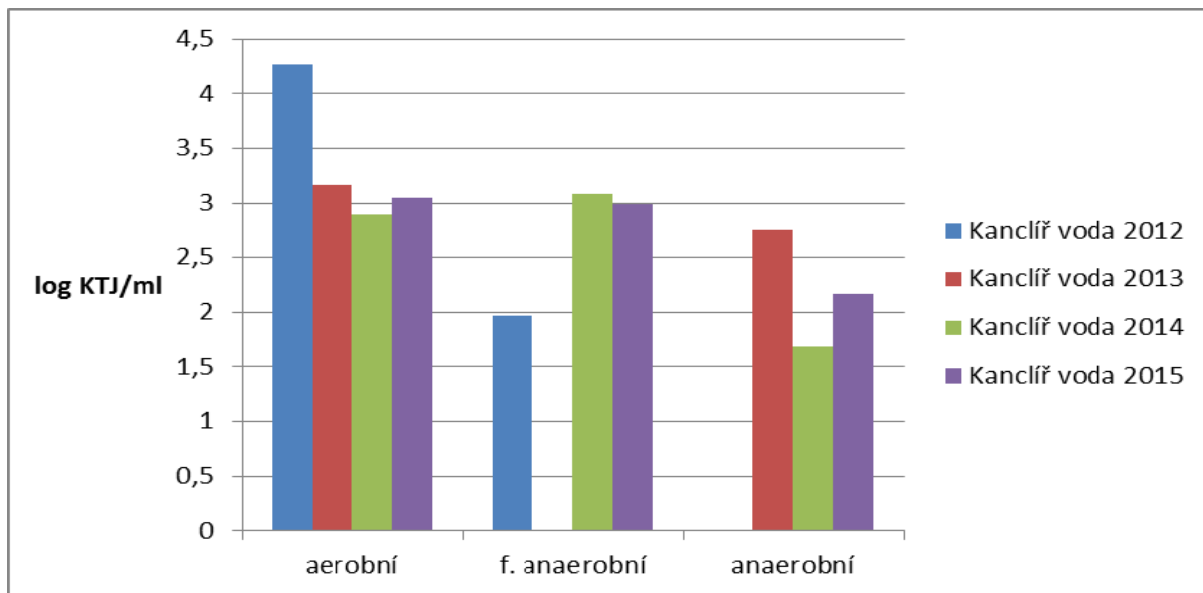
Graf č. 5: Počty bakterií stanovené v jednotlivých letech na lokalitě Kanclíř



Z grafu číslo 5 je možné vyčíst, že nejvyšší počty fakultativně anaerobních bakterií byly identifikovány v povrchové hmotě v roce 2015. Jen o něco méně tomu bylo v roce 2014. V roce 2012 bylo identifikováno nejméně fakultativně anaerobních bakterií v povrchové hmotě. Podobná tendence je i u aerobních bakterií, kterých bylo nejvíce nalezeno v povrchové hmotě v roce 2015 a nejméně pak v roce 2012. U striktně anaerobních bakterií byl vývoj v povrchové hmotě jiný. V roce 2012 nebyly nalezeny žádné na lokalitě Kanclíř. V letech 2013–2014 byly počty striktně anaerobních bakterií v povrchové hmotě přibližně stejné. A v posledním sledovaném roce 2015 byl počet striktně anaerobních bakterií v povrchové hmotě nejnižší.

Počty jednotlivých skupin bakterií stanovené v okolní vodě ve všech sledovaných letech na lokalitě Kanclíř jsou porovnány v grafu číslo 6.

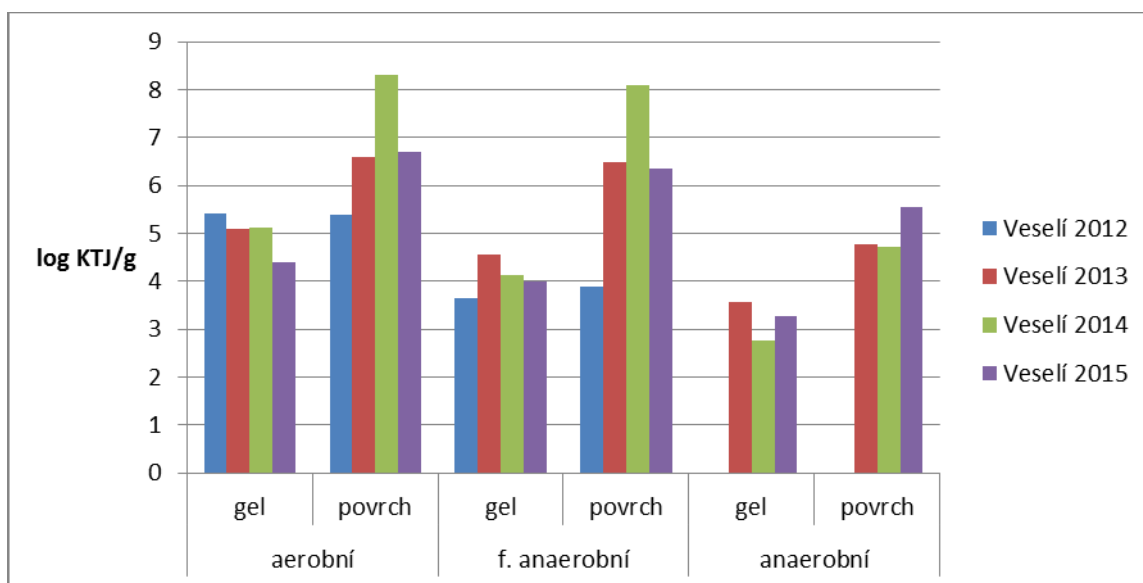
Graf č. 6: Počty bakterií stanovené v jednotlivých letech v okolní vodě na lokalitě Kanclíř



Z grafu číslo 6 je patrné, že nejvíce bylo stanoveno aerobních bakterií v okolní vodě v roce 2012. Nejméně bylo stanoveno striktně anaerobních bakterií v okolní vodě v roce 2014. Fakultativně anaerobní bakterie byly identifikovány ve třech letech ze čtyř sledovaných let. Nejvíce fakultativně anaerobních bakterií bylo nalezeno v okolní vodě v roce 2014 a nejméně jich v okolní vodě bylo nalezeno v roce 2012.

Počty jednotlivých skupin bakterií stanovené ve všech sledovaných letech na lokalitě Veselí jsou porovnány v grafu číslo 7.

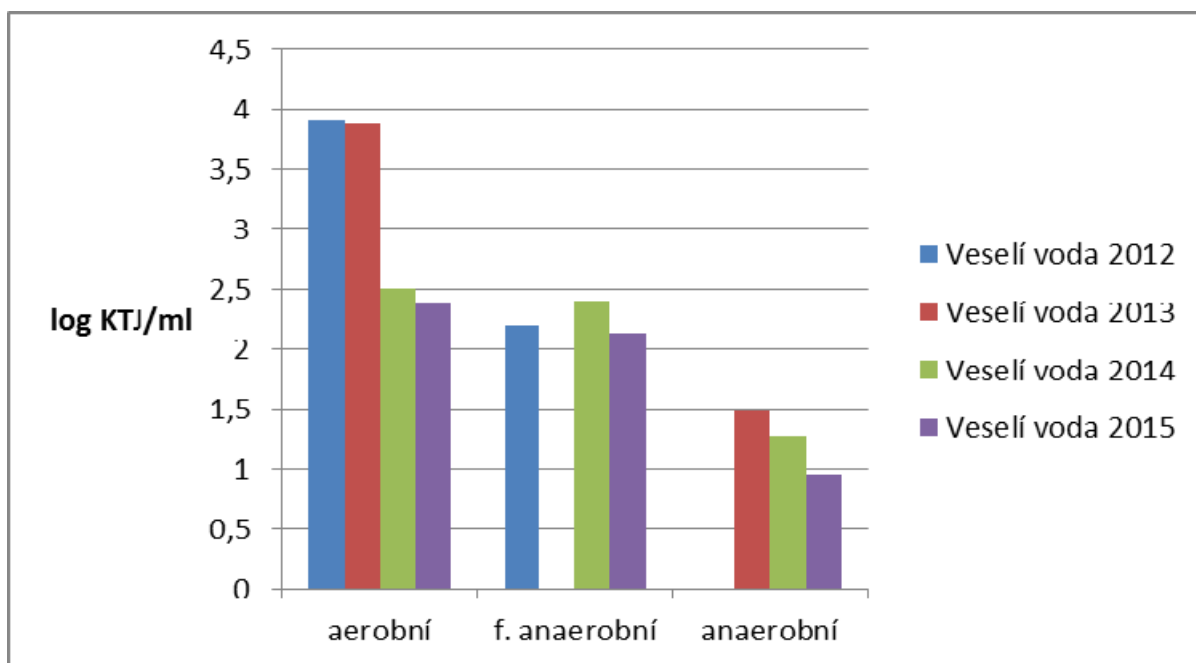
Graf č. 7: Počty bakterií stanovené v jednotlivých letech na lokalitě Veselí



Na lokalitě Veselí bylo zaznamenáno nejvíce aerobních bakterií v povrchové hmotě v roce 2014, jak je dobře vidět na grafu číslo 7. Podobně tomu bylo pro fakultativně anaerobní bakterie, kterých bylo nejvíce nalezeno také v povrchové hmotě v roce 2014, nejméně pak jich bylo nalezeno v povrchové hmotě v roce 2012. Naopak striktně anaerobních bakterií v povrchové hmotě v roce 2014 bylo nalezeno nejméně ze všech sledovaných let.

Počty aerobních, fakultativně anaerobních a striktně anaerobních bakterií stanovené ve všech sledovaných letech od roku 2012 do roku 2015 v okolní vodě na lokalitě Veselí jsou porovnány v grafu číslo 8.

Graf č. 8: Počty bakterií stanovené v jednotlivých letech v okolní vodě na lokalitě Veselí



Z grafu číslo 8 je patrné, že na lokalitě Veselí bylo detekováno v okolní vodě nejméně striktně anaerobních bakterií. Úplně nejmenší počet striktně anaerobních bakterií byl nalezen v roce 2015. O něco více jich bylo nalezeno v roce 2014 a nejvíce pak v roce 2013. Fakultativně anaerobních bakterií bylo nejméně v okolní vodě nalezeno v roce 2015. Naopak aerobních bakterií bylo ve vodě na lokalitě Veselí detekováno docela velké množství, nejvíce pak v roce 2012 a nejméně aerobů bylo nalezeno v roce 2015.

Získaná data byla statisticky zpracována. Rozdíly jednotlivých skupin bakterií v jednotlivých typech vzorků byly porovnány v programu STATISTICA 12 metodou ANOVA. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce číslo 7.

Tabulka č. 7: Průměrné počty (log KTJ/g ± směrodatná odchylka) jednotlivých skupin stanovovaných bakterií ve všech typech vzorků v průběhu let 2012–2015

	Aerobní bakterie	Anaerobní bakterie	Fakultativně anaerobní bakterie
Rosolovitá hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	5,13 ± 0,76 ^A	3,78 ± 0,35 ^B	4,63 ± 0,95 ^C
Povrchová hmota z kolonie <i>Pectinatella magnifica</i>	6,90 ± 1,22 ^A	4,50 ± 1,43 ^B	7,38 ± 1,20 ^A
Voda	3,17 ± 0,78 ^A	1,72 ± 0,77 ^B	2,48 ± 0,67 ^A

^{A, B, C} – Hodnoty se statisticky významně liší na hladině významnosti $p = 0,05$.

Obecně lze říci, že počty aerobních, fakultativně anaerobních a striktně anaerobních bakterií během odběrů v letech 2012–2015 byly nejnižší ve vodě, následně pak v rosolovité hmotě a nejvyšší počty byly detekovány v povrchové vrstvě kolonie *Pectinatella magnifica*. Celkově bylo detekováno nejméně anaerobních bakterií a nejvíce aerobních bakterií.

Z výsledků statistického šetření vyplývá, že v gelové hmotě převládají aerobní bakterie, které jsou o řád četnější než fakultativně anaerobní bakterie a o dva řády četnější než bakterie anaerobní (statisticky významné rozdíly byly potvrzeny mezi všemi třemi skupinami). V povrchové vrstvě statisticky významný rozdíl v počtu aerobních a fakultativně anaerobních bakterií prokázán nebyl, výrazně nižší bylo ovšem množství anaerobních bakterií, a to o dva řády. Rozdíl v četnosti aerobních a anaerobních bakterií v povrchové vrstvě je statisticky významný, stejně tak jako rozdíl v množství bakterií striktně a fakultativně anaerobních. Ve vzorcích vody byly zaznamenány vůbec nejnižší počty všech skupin sledovaných bakterií. Nejčetnější byly aerobní bakterie, následovaly bakterie

fakultativně anaerobní a nejnižších hodnot nabývaly bakterie striktně anaerobní, stejně tak, jako tomu bylo i ve vzorcích gelovité hmoty. Stejně jako u povrchové vrstvy kolonií bochnatek byl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi počty aerobních a anaerobních bakterií a mezi počty fakultativních a striktních anaerobů. Rozdíl v množství aerobních a fakultativně anaerobních bakterií nebyl signifikantní. Povrchová vrstva kolonií mechovek byl jediný typ vzorku, kde nejvyšších počtů dosahovaly fakultativně anaerobní bakterie. Data pocházejí z výběrových souborů s normálním rozdělením dle Shapiro-Wilkova testu.

Dále byla stanovena korelace mezi počtem bakterií v povrchové nebo gelové hmotě bochnatky a počtem bakterií v okolní vodě. Pro regresní analýzu byla použita metoda jednoduché lineární regrese. Závěrem regresní analýzy je, že množství mikroorganismů přítomných v koloniích mechovky není závislé na počtu mikroorganismů přítomných ve vodě, což svědčí o jejich komensálním či symbiotickém charakteru.

7. Diskuse

Bochnatka americká (*Pectinatella magnifica*) je druh mechovky, který se vyskytuje ve sladké čisté vodě. Původně *Pectinatella magnifica* pochází z oblasti Severní Ameriky. Do Evropy se poprvé dostala již v polovině 19. století. V České republice se bochnatka vyskytuje na řadě našich údolních nádrží a pískoven. Nejčastěji je možné její kolonie nalézt na potopených větvích, kořenech a předmětech v blízkosti břehu. Bochnatka je přisedlý živočich, který vytváří kolonie různých tvarů. Samotná kolonie je vytvořena ze zooidů (jedinců), kteří vznikají pučením z mateřského jedince. Tělo zooida je válcovitého nebo vakovitého tvaru a obsahuje všechny orgánové soustavy. Uvnitř kolonie jsou zooidi navzájem propojeni mezenchymatickým provazcem. Díky zřasené ploše jsou tyto kolonie schopny přisedat k podkladu. Bochnatku americkou je možné nalézt od června do září, kdy se její kolonie začínají rozpadat. Ve skutečnosti jde o tuhé kolonie velikosti citronu až obrovského míče. Na povrchu *Pectinatella magnifica* jsou tisíce jedinců bezobratlého živočicha. Rosolovitá hmota se nachází uvnitř kolonie a může dosáhnout tloušťky až 70 cm. Rosolovitá hmota je produktem samotných zooidů, kteří si tak zvětšují svůj životní prostor (Sharp et al., 2007). Samotný jedinec je mikroskopický, žíví se filtrací planktonu a má vztah k čisté vodě. Dosud není známo, že by s výskytem bochnatky v našich vodách souviselo nějaké zdravotní riziko pro člověka. Spíše naopak lze říci, že bochnatka přispívá ke kvalitě vody tím, že se živí filtrací mikroorganismů sinic a řas. Většinou ale její výskyt v přírodě je zcela neškodný (Wood, 2001).

Mořské mechovky jsou zdrojem biologicky aktivních látek. Mnoho těchto látek není produkováno mechovkami, ale jsou syntetizovány symbiotickými mikroorganismy. K dnešnímu dni bohužel existuje jen velmi malý počet studií zaměřených právě na zkoumání mikroorganismů v mechovkách. Jednu studii vypracovali Heindl et al. (2009), kde se autoři zaměřili na stanovení druhů symbiotických bakterií v mořských mechovkách. V této práci byly stanoveny druhy symbiotických bakterií, ne však jejich počty. Pracovalo se celkem s 21 vzorky mořských mechovek, které byly odebrány ze 14 různých lokalit z Baltského a Středozemního moře. Ze vzorků bylo izolováno 340 kmenů bakterií. Z Baltského moře byly izolovány například druhy rodů *Shewanella*, *Marinomonas* a *Vibrio*, na rozdíl od kmenů *Sphingomonas* a *Alteromonas*, které byly izolovány ze vzorků ze Středozemního moře. Ale

například rod *Pseudoalteromonas* byl izolován ze vzorků jak ze Středozemního, tak i z Baltského moře.

Shewanella je rod mořských bakterií, které patří k jedněm z nejběžnějších bakterií na Zemi. *Shewanella* je fakultativní, gramnegativní, anaerobní bakterie (Gorby et al., 2006). *Vibrio* je rod gramnegativních, fakultativně anaerobních bakterií. Žijí saprofyticky ve sladké i v mořské vodě, v půdě i v organismu člověka a zvířat (Blake et al., 1979). *Alteromonas* je rod proteobakterií, které se nacházejí v mořské vodě jak na otevřeném oceánu, tak i na pobřeží. Jedná se o gramnegativní, aerobní a heterotrofní bakterie (Gauthier et al., 1995). *Pseudoalteromonas* je rod mořských bakterií. Je to nový rod, který byl vyčleněn z rodu *Alteromonas*. Jedná se o gramnegativní, heterotrofní aerobní bakterie (Bozal et al., 1997).

Protože u mořských mechovek byl prokázán výskyt bakterií, předpokládali jsme, že i *Pectinatella magnifica* bude mít ve svých koloniích bakterie. Proto bylo cílem diplomové práce jejich kultivační stanovení v koloniích bochnatek odebraných v lokalitách Cep, Hejtman, Kanclíř a Veselí. K tomuto účelu byla na základě literárních údajů sestavena kultivační média. Byla navržena celkem 3 média, ale z prvních výsledků stanovení mikroorganismů se ukázalo, že pro kultivaci a izolaci co nejrozmanitějšího spektra bakterií se nejlépe hodí „Yeast extract“ agar s přidavkem tryptonu a glukózy. Bakterie byly kultivovány na tomto agaru ve všech čtyřech sledovaných letech a ze všech námi sledovaných lokalit. Kultivace probíhala za aerobních podmínek pro stanovení počtů aerobních bakterií. Další byla anaerobní kultivace, při které byly stanoveny počty jak striktně anaerobních, tak fakultativně anaerobních bakterií. Během let 2012–2015 se z námi sledovaných lokalit vždy odebírala rosolovitá hmota kolonie *Pectinatella magnifica*, povrchová vrstva kolonie *Pectinatella magnifica* a okolní voda.

Z výsledků statistické analýzy vyplývá, že v rosolovité hmotě kolonií *Pectinatella magnifica* mají převahu aerobní bakterie, které se zde vyskytují v nejvyšších počtech. Aerobní bakterie v rosolovité hmotě byly o řád početnější než fakultativně anaerobní bakterie a o dva řády početnější než striktně anaerobní bakterie. V povrchové hmotě kolonie *Pectinatella magnifica* nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi počtem aerobních a fakultativně anaerobních bakterií. Ovšem striktně anaerobní bakterie v povrchové vrstvě se vyskytovaly výrazně méně, jejich četnost byla až o dva řády nižší. Z těchto výsledků vyplynulo, že rozdíl mezi výskytem aerobních a striktně anaerobních bakterií v povrchové vrstvě bochnatky je

statisticky významný stejně tak jako rozdíl mezi výskytem fakultativně anaerobních a striktně anaerobních bakterií v povrchové vrstvě bochnatky. V odebrané okolní vodě ze všech námi sledovaných lokalit byl zjištěn vůbec nejnižší počet aerobních, fakultativně anaerobních a striktně anaerobních bakterií. Nicméně tendence výskytu bakterií ve vodě je podobná jako v povrchové vrstvě bochnatky. Ve vodě byl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi počtem aerobních a striktně anaerobních bakterií a současně byl také zaznamenán statisticky významný rozdíl v počtu fakultativně anaerobních a striktně anaerobních bakterií. Rozdíl v počtu aerobů a fakultativně anaerobních bakterií nebyl statisticky významný. Největší variabilita byla zaznamenána v počtu bakterií stanovených v povrchové vrstvě bochnatky, což je možné také rozpoznat podle směrodatné odchylky. Je patrné, že čím vyšší byla směrodatná odchylka, tím vyšší byla variabilita počtu bakterií. Celkově bylo vysledováno, že počty aerobních, fakultativně anaerobních a striktně anaerobních bakterií během sledovaných odběrů byly nejnižší ve vodě, následně pak v rosolovité hmotě a nejvyšší počty byly nalezeny v povrchové vrstvě kolonie *Pectinatella magnifica*. Nejvíce bakterií v povrchové vrstvě kolonie bochnatky bylo nalezeno proto, že v povrchové vrstvě jsou obsaženi zooidi, v jejichž trávicím traktu se bakterie pravděpodobně hromadí. V rosolovité hmotě kolonie bochnatky bylo detekováno více bakterií než v okolní vodě, což pravděpodobně svědčí o tom, že v rosolovité hmotě je vhodné prostředí pro množení bakterií a to naznačuje jejich symbiotický charakter.

Co se týče konkrétních odběrů, tak v roce 2012 byly stanovovány počty bakterií ze všech vzorků *Pectinatella magnifica* a z okolní vody a stanovovaly se počty aerobních a anaerobních bakterií. V roce 2013 se stanovovaly počty bakterií ze vzorků bochnatky a z vody. V roce 2013 byl zaznamenán počet aerobních bakterií a odděleně fakultativně anaerobních a striktně anaerobních bakterií. V tomto roce při druhém odběru 21. srpna bylo nalezeno nejvíce fakultativně anaerobních bakterií v povrchové vrstvě kolonie na lokalitě Cep, a to 8,51 log KTJ/g. V roce 2014 byl nejvyšší počet bakterií nalezen také v povrchové vrstvě, ale jednalo se o aerobní bakterie na lokalitě Veselí. Jejich počet byl 9,51 log KTJ/g, což byl nejvyšší detekovaný počet bakterií ze všech našich odběrů z námi sledovaných lokalit. V roce 2015 byl nejčtenější výskyt bakterií opět v povrchové vrstvě kolonie při druhém odběru 3. srpna na lokalitě Hejtman. Jednalo se o fakultativně anaerobní bakterie a jejich počet byl 9,16 log KTJ/g. Během všech čtyř sledovaných let od roku 2012 do roku 2015 bylo vyzorováno, že množství bakterií přítomných v koloniích bochnatky není závislé na počtu

bakterií přítomných v okolní vodě, což svědčí o jejich komensálním či symbiotickém charakteru. Nebyla zaznamenána ani žádná závislost mezi datem odběru a počtem bakterií v koloniích bochnatky.

Jak už bylo řečeno výše, doposud byly všechny studie věnovány pouze zkoumání a určení bakterií v mořských mechovkách. Proto Vlková et al. (2015) vypracovali studii, ve které se zaměřují jak na počty bakterií, tak i na druhové složení bakterií ve sladkovodní mechovce *Pectinatella magnifica*. Z výsledků studie Vlkové et al. (2015) vyplývá, že mezi počty bakterií v koloniích *Pectinatella magnifica* a termínem odběrů vzorků bochnatky nebyly pozorovány žádné závislosti, stejně jako tomu bylo i v této diplomové práci. Ve většině případů byly nejvyšší počty detekovány v povrchové vrstvě kolonie, stejně jako při dalších odběrech v letech 2012–2015, které byly zpracovány v této diplomové práci. Četnější výskyt bakterií v povrchové vrstvě lze očekávat, neboť, jak už bylo zmíněno výše, v povrchové vrstvě jsou obsaženi zooidi, kteří pro sebe pomocí filtrace vody získávají živiny. Během letní sezony se zooidi rozmnožují a tím zvyšují svůj počet a dochází tak k přírůstku rosolovité hmoty kolonie bochnatky. Ve studii Vlkové et al. (2015) byly ve většině případů nejvyšší počty bakterií izolovány v povrchové vrstvě kolonie bochnatky a jejich počty se pohybovaly od 4,95 do 6,61 log KTJ/g pro aerobní bakterie a od 2,30 do 6,52 log KTJ/g pro anaerobní bakterie. Dále byly stanoveny počty bakterií v rosolovité hmotě kolonie bochnatky. Množství aerobních bakterií se pohybovalo od 4,22 do 6,37 log KTJ/g a množství anaerobních bakterií se pohybovalo od 1,30 do 6,85 log KTJ/g. Nebyla zde zjištěna žádná závislost mezi počty bakterií v kolonii *Pectinatella magnifica* a okolní vodě, stejně tak jako v mé diplomové práci, kde byla stanovena korelace mezi počtem bakterií v povrchové vrstvě nebo rosolovité hmotě bochnatky a počtem bakterií v okolní vodě. Dále jsme předpokládali, že nejvyšší počty bakterií budou obsaženy v koloniích *Pectinatella magnifica* tehdy, pokud vzorky budou odebírány z lokalit, kde je vysoký obsah mikroorganismů ve vodě, ale bohužel ani zde žádná závislost nebyla prokázána, neboť jen u některých vzorků byl vyšší výskyt bakterií v kolonii a někdy naopak nižší. Navíc se počet bakterií ve vodě lišil během sezony a podobný vývoj v obsahu bakterií v bochnatce nebyl pozorován, z čehož vyplývá, že obsah bakterií v kolonii bochnatky není nijak závislý na jejich obsahu ve vodě. Obsah bakterií v kolonii *Pectinatella magnifica* může být také ovlivněn samotným stářím bochnatky, což ovšem není možné odhadnout. V případě, že je kolonie *Pectinatella magnifica* velmi mladá, může mít i velmi nízký počet bakterií uvnitř kolonie. Nebo kolonie *Pectinatella magnifica* je

již vysokého stáří, což může být i těsně před rozpadem, a v tomto případě kolonie bochnatky může mít velmi vysoký počet bakterií.

Kromě počtu bakterií stanovovali Vlková et al. (2015) i druhy obsažené v koloniích *Pectinatella magnifica*. Na identifikaci bakterií, které byly z kolonií mechovek izolovány po kultivaci, byly použity dvě nezávislé metody. První metoda byla hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Jako druhá metoda byla zvolena sekvenace genu pro 16S rRNA, tato metoda se ukázala jako spolehlivější a přesnější na určení druhového složení bakterií v kolonii bochnatky. V této studii byly izolovány následující druhy bakterií rodů *Pectinatella magnifica*, a to *Aeromonas*, *Aquitalea*, *Chryseobacterium*, *Herbaspirillum*, *Enterobacter*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas* a *Sphingomonas*. Výše zmíněné rody bakterií byly identifikovány z obou typů vzorků *Pectinatella magnifica* jak z povrchové vrstvy, tak i z rosolovité hmoty kolonie.

Aeromonas je gramnegativní fakultativně anaerobní bakterie. Je kultivačně nenáročná a byla nejčetnější ve vzorcích kolonií *Pectinatella magnifica*. Vyskytuje se hojně v přírodě, například u ryb a obojživelníků. Rovněž se může vyskytnout ve střevě člověka. Pohyblivé druhy mohou být patogenní i pro člověka, produkují různé toxiny a mohou vyvolávat průjemová onemocnění, u oslabených osob může dojít i k systémové infekci (Silver et al., 2011). *Enterobacter* je gramnegativní pohyblivá opouzďená bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*. Tato bakterie byla izolována v rosolovité hmotě kolonie *Pectinatella magnifica* na lokalitě Kanclíř. Bakterie se vyskytují v půdě, někdy v trávicím traktu. Mohou způsobit záněty močových cest, plic, rané infekce, popřípadě i jiné infekce, například meningitidu či sepsi (Grimont and Grimont, 2005). Další gramnegativní aerobní bakterie, která byla izolována ze vzorků bochnatky na lokalitě Cep, je *Pseudomonas*. Jedná se o bakterii tyčinkovitého tvaru, která původně byla izolována v půdě, ale dnes ji můžeme nalézt jak v půdě nebo vodě, tak i na mnoha přírodních stanovištích. Vytváří kolonie, které mají kovově lesklý vzhled (Tvrzová et al., 2006). Druhým nejvíce izolovaným druhem bakterie z obou typů vzorků *Pectinatella magnifica*, a to jak z povrchové vrstvy, tak i z rosolovité hmoty kolonie, byl rod *Aquitalea*. Tento rod obsahuje dva druhy – *Aq. magnusonii* a *Aq. denitrificans* (Lau et al., 2006). Oba tyto druhy bakterií byly detekovány ve vzorcích kolonií bochnatky. *Aquitalea* sp. je gramnegativní fakultativně anaerobní bakterie, která nevytváří spóry. Poprvé byly výše zmíněné druhy bakterií izolovány z jezera na severu

Wisconsinu. Další zmínky o bakteriích rodu *Aquitalea* byly na základě toho, že se je povedlo detekovat na rašeliništích v Yongneup, Jižní Korea (Lee et al., 2009). Druh bakterie *Herbaspirillum* (rod *H. lusitanum* a *H. huttiense*) byl izolován z rosolovité hmoty kolonie *Pectinatella magnifica* na třech sledovaných lokalitách – Cep, Kanclíř a Veselí. *Herbaspirillum* sp. je gramnegativní aerobní bakterie, patřící mezi Betaproteobakterie. Tyto rody se převážně skládají z diazotrofních bakterií s potenciální endofytickou a systémovou kolonizací na rostliny (Valverde et al., 2003; Ding and Yokota, 2004; Dobritsa et al., 2010). Bakterie patřící do tohoto rodu byla izolována z mnoha různých vzorků vody. *Sphingomonas* je další identifikovaná bakterie v kolonii bochnatky, která byla izolována z rosolovité hmoty kolonie *Pectinatella magnifica* ze vzorku, který byl odebraný na lokalitě Cep. Další kmeny, které byly identifikovány, patřily k druhům *Chryseobacterium*, jenž byl izolovaný z povrchové vrstvy bochnatky ze vzorků z lokality Cep, a další rody *Chryseobacterium seobacterium* a *gambrini* byly získány po kultivaci rosolovité hmoty z lokality Hejtman. Poslední zmíněné dva druhy izolované z lokality Cep z kolonie *Pectinatella magnifica* jsou *Leuconostoc* a *Lactococcus*. Oba dva druhy se velmi často vyskytují v mléce a dalších potravinách. Obyčejně je ale také možno je detekovat v různých odrůdách rostlin (Holzapfel et al., 2009; Teuber, 2009). Bakterie nalezené v koloniích *Pectinatella magnifica* jsou běžnou součástí mikrobioty, kde se tito živočichové nacházejí (Vlková et al., 2015). Podobně je tomu i u mořských mechocvů, jejichž symbiotické bakterie se často vyskytují v mořském prostředí (Heindl et al., 2009).

8. Závěr

Závěrem lze říci, že v koloniích *Pectinatella magnifica* převládaly aerobní bakterie, následně pak fakultativně anaerobní bakterie a nejméně striktně anaerobní bakterie ve všech typech vzorků. Celkově bylo nalezeno nejvíce bakterií v povrchové vrstvě kolonie bochnatky, o něco méně pak v rosolovité hmotě kolonie bochnatky a nejnižší počet byl zaznamenán v okolní vodě. Počet nalezených bakterií ve vodě nijak nekoreluje s počtem nalezených bakterií v *Pectinatella magnifica*. Doposud nebyla zjištěna žádná závislost v počtu bakterií a v termínech odběrů a nebyla zaznamenána ani žádná dynamika během jednotlivých let.

9. Seznam použité literatury

- Altwegg, M. 1995. General problems associated with diagnostic applications of amplification methods. *Journal of Microbiological Methods*. 23. 21–30.
- Ambrožová, J. 2004. *Mikrobiologie v technologii vod*. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha.
- Anagnostopoulos, C., Spizizen, J. 1961. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 81 (5). 741–746.
- Augoustinos, M. T., Grabow, N. A., Genthe, B., Kfir, R. 1993. An improved membrane filtration method for enumeration of faecal coliforms and *E. coli* by a fluorogenic β -glucuronidase assay. *Water Science & Technology Journal*. 27. 267–270.
- Austin, B. 1988. *Methods in aquatic bacteriology*. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore.
- Back, J. F., Oakenfull, D., Smith, M. B. 1979. Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. *Biochemistry*. 18. 5191–5196.
- Balounová, Z., Rajchard, J., Šmahel, L., Švehla, J. 2006. Invaze *Pectinatella magnifica* v jihočeských vodách pokračuje. In: Měkotová, J., Štěrbá, O. (eds). *Říční krajina 4. sborník příspěvků z konference*, 18. 10. 2006. Olomouc. ISBN: 80-244-1495-3.
- Bartie, C., Venter, S. N., Nel, L. H. 2003. Identification methods for *Legionella* from environmental samples. *Water Research*. 37. 1362–1370.
- Bej, A. K., DiCesare, J. L., Haff, L., Atlas, R. M. 1991. Detection of *Escherichia coli* and *Shigella* spp. in water by using the polymerase chain reaction and gene probes for uid. *Applied and Environmental Microbiology*. 57. 1013–1017.
- Blake, P. A., Merson, M. H., Weaver, R. E., Hollis, D. G., Heublein, P. C. 1979. Disease caused by a marine *Vibrio*. Clinical characteristics and epidemiology. *The New England Journal of Medicine*. 300 (1). 1–5.
- Bodelier, P. L. E., Meima-Franke, M., Zwart, G., Laanbroek, H. J. 2005. New DGGE strategies for the analyses of methanotrophic microbial communities using different

- combinations of existing 16S rRNA-based primers. *FEMS Microbiology Ecology*. 52 (2). 163–174. ISSN: 01686496.
- Bowman, J. P., Cavanagh, J., Austin, J. J., Sanderson, K. 1996. Novel Psychrobacter Species from Antarctic Ornithogenic Soils. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 46 (4). 841–848.
- Bozal, N., Tudela, E., Rosselló-Mora, R., Lalucat, J., Guinea, J. 1997. *Pseudoalteromonas antarctica* sp. nov., Isolated from an Antarctic Coastal Environment. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 47 (2). 345–351.
- Budak, H., Kasap, Z., Shearman, R. C., Dweikat, I., Sezerman, U., Mahmood, A. 2006. Molecular characterization of cDNA encoding resistance gene-like sequences in *Buchloe dactyloides*. *Molecular Biotechnology*. 34 (3). 293–301. ISSN: 10736085.
- Campbell, G. R., Prosser, J., Glover, A., Killham, K. 2001. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and water using multiplex PCR. *Journal of Applied Microbiology*. 91. 1004–1010.
- Canning, E. U., Curry, A., Feist, S. W., Longshaw, M., Okamura, B. 2001. A new class and order of myxozoans to accommodate parasites of bryozoans with ultrastructural observations on *Tetracapsula bryosalmonae* (PKX organism). *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 47 (5). 456–468.
- Cloete, T. E., Rose, J., Nel, L. H., Ford, T. 2004. *Microbial waterborne pathogens*. IWA Publishing, London.
- Davenport, C. B. 1900. On the Variation of the Statoblasts of *Pectinatella magnifica* from Lake Michigan, at Chicago. *The American Naturalist*. 34 (408). 959–968.
- Ding, L., Yokota, A. 2004. Proposals of *Curvibacter gracilis* gen nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. For bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autothropicum* com. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54. 2223–2230. DOI: 10.1099/ijs.0.02975-0.

- Dobritsa, A. P., Reddy, M. C. S., Samadpour, M. 2010. Reclassification of *Herbaspirillum putei* as a later heterotypic synonym of *Herbaspirillum huttiense*, with the description of *H. huttiense* subsp. *huttiense* subsp. nov. and *H. huttiense* subsp. *putei* subsp. nov., and description of *Herbaspirillum aquaticum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60. 1418–1426. DOI: 10.1099/ijse.0.009381-0.
- Feng, P. C. S., Hartman, P. A. 1982. Fluorogenic assay for immediate confirmation of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 43. 1320–1329.
- Feris, K. P., Ramsey, P. W., Rillig, M., Moore, J. N., Gannon, J. E., Holben, W. E. 2004. Determining rates of change and evaluating group-level resiliency differences in hyporheic microbial communities in response to fluvial heavy-metal deposition. *Applied and Environmental Microbiology*. 70 (8). 4756–4765. ISSN: 00992240.
- Garland, J. L., Mills, A. L. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental Microbiology*. 57 (8). 2351–2359. ISSN: 00992240.
- Gauthier, G., Gauthier, M., Christen, R. 1995. Phylogenetic Analyses of the Genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* Using Genes Coding for Small-Subunit rRNA Sequences and Division of the Genus *Alteromonas* into Two Genera, *Alteromonas* (Emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and Proposal of Twelve New Species Combinations. *Journal of Systematic Bacteriology*. 45 (4). 755–761.
- González, R. D., Tamagnini, L. M., Osmos, P. D., de Sousa, G. B. 2003. Evaluation of a chromogenic medium for total coliforms and *Escherichia coli* determination in ready-to-eat foods. *Food Microbiology*. 20. 601–604.
- Gorby, Y. A., Yanina, S., McLean, J. S., Rosso, K. M., Moyles, D., Dohnalkova, A., Beveridge, T. J., Chang, I. S., Kim, B. H., Kim, K. S., Culley, D. E., Reed, S. B. et al. 2006. Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. 103 (30). 11358–11363.

- Grimont, P. A. D., Grimont, F. 2005. Enterobacter, pp. 661–669. In: Brenner, D. J., Krieg, N. R., Stanley, J. T. (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Springer, New York, USA.
- Häusler, J. 1994. Mikrobiologické kultivační metody kontroly jakosti vod. Díl I. Mikrobiologické pracoviště. Ministerstvo zemědělství ČR, Praha.
- Heindl, H., Wiese, J., Thiel, V., Imhoff, J. F. 2009. Phylogenetic diversity and antimicrobial activities of bryozoan-associated bacteria isolated from Mediterranean and Baltic Sea habitats. *Systematic and Applied Microbiology*. 33. 94–104.
- Henke, W., Herdel, K., Jung, K., Schnorr, D., Loening, S. A. 1997. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Research*. 25. 3957–3958.
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., Wellington, E. M. 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology*. 63 (8). 3233–3241. ISSN: 00992240.
- Holzappel, W. H., Björkroth, J. A., Dicks, L. M. T. 2009. Leuconostoc, pp. 624–635. In: De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Kreis, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H., Whitman, W. B. (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 3. 1450. The Firmicutes, Springer, New York, USA, DOI: 10.1007/978-0-387-68489-5. ISBN: 978-0-387-95041-9.
- Horáková, K., Mlejnková, H., Mlejnek, P. 2008. Evaluation of methods for isolation of DNA for PCR based identification of pathogenic bacteria from pure cultures and water samples. *Water Science & Technology Journal*. 58 (5). 995–999.
- Ibekwe, A. M., Grieve, C. M. 2003. Detection and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in environmental samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*. 94. 421–431.
- Johnson, J. R. 2000. Development of polymerase chain reaction-based assays for bacterial gene detection. *Journal of Microbiological Methods*. 41. 201–209.

- Juck, D., Ingram, J., Prévost, M., Coallier, J., Greer, C. 1996. Nested PCR protocol for the rapid detection of *Escherichia coli* in potable water. *Canadian Journal of Microbiology*. 42. 862–866.
- Kafka, J. 1881. O sladkovodních mechovkách českých. *Vesmír*. 10: 222–223, 247–249, 271–273, 282–283.
- Kafka, J. 1886. Sladkovodní mechovky země české II. *Archiv pro přírodovědecké prozkoumání Čech*, Praha.
- Kirk, G. 2004. *The biogeochemistry of submerged soils*. Chichester: Wiley. ISBN: 0-470-86301-3.
- Korábek, O. 2009. Pásnice, mechovky a mechovnatci České republiky. *OKA 7*. [online] [cit. 2011-02-22]. Dostupné z: http://casopisoka.wz.cz/clanek/oka_07_01_001_006.pdf
- Krsek, M., Wellington, E. M. 2001. Assessment of chitin decomposer diversity within an upland grassland. *Antonie van Leeuwenhoek*. 79 (3–4). 261–267. ISSN: 00036072.
- Lau, H. T., Faryna, J., Triplett, E. W. 2006. *Aquitalea magnusonii* gen. Nov., sp. Nov., a novel Gram-negative bacterium isolated from a humic lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56. 867–871. DOI: 10.1099/ijms.0.64089-0.
- Lee, C. M., Weon, H. Y., Kim, Y. J., Son, S. H., Koo, B. S., Kwon, S. W. 2009. *Aquitalea denitrificans* sp. Nov., isolated from a Korean wetland. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59. 1045–1048. DOI: 10.1099/ijms.0.002840-0.
- Maier, R. M., Proper, I. L., Gerba, C. P. 2000. *Environmental microbiology*. Academic Press, San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo.
- Manafí, M. 2000. New developments in chromogenic and fluorogenic media. *International Journal of Food Microbiology*. 60. 205–218.
- Manafí, M., Kneifel, W., Bascomb, S. 1991. Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostic. *Microbiological Reviews*. 55. 335–348.
- Mañas, M. 2004. [online]. [cit. 2011-04-17]. BioLib. Dostupné z: <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id44166/>

- Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. 1982. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Mazura, I., Michalová, K., Brdička, R., Mácha, J. 2001. *Speciální metody molekulární biologie*. Univerzita Karlova v Praze. Nakladatelství Karolinum.
- Mullis, K. B., Faloona, F. A. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155. 335–350.
- Muyzer, G., Smalla, K. 1998. Application fo denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek.* 73 (1). 127–141. ISSN: 00036072.
- Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snajdr, J., Wieshuber, A., Amann, R. I., Ludwik, W., Backhaus, H. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology.* 178 (19). 5636–5643. ISSN: 00219193.
- Olive, D. M., Bean, P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology.* 37. 1661–1669.
- Pomp, D., Medrano, J. F. 1991. Organic solvents as facilitators of PCR. *BioTechniques.* 10. 58–59.
- Radajewski, S., Ineson, P., Parekh, N. R., Murrell, C. 2000. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature.* 403 (6770). 646–649. ISSN: 00280836.
- Radström, P. 2004. Pre-PCR processing: Strategies to generate PCR-compatible samples. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 26 (2). 133–146. ISSN: 10736085.
- Rantakokko-Jalava, K., Jalava, J. 2002. Optimal DNA isolation method for detection of bacteria in clinical specimens by broad-range PCR. *Journal of Clinical Microbiology.* 4. 4211–4217.
- Ricciardi, A., Lewis, D. J. 1991. Occurrence and ecology of *Lophopodella carteri* (Hyatt) and other fresh-water Bryozoa in the Lower Ottawa River near Montreal, Quebec. *Canadian Journal of Zoology.* 69 (5). 1401–1404.

- Riisgård, H. U., Nielsen, K. K., Fuchs, J., Rasmussen, B. F., Obst, M., Funch, P. 2004. Ciliary feeding structures and particle capture mechanism in the freshwater bryozoan *Plumatella repens*. *Invertebrate Biology*. 123 (2). 156–167.
- Rogick, M. D. 1937. Studies on Freshwater Bryozoa: V. Some Additions to Canadian Fauna. *Ohio Journal of Science*. 37 (2). 99–104.
- Rogick, M. D. 1943. Studies on Freshwater Bryozoa: XIV. The Occurrence of *Stolella indica* in North America. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 45 (4). 163–178.
- Rompré, A., Servais, P., Baudart, J., de-Roubin, M.-R., Laurent, P. 2002. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *Journal of Microbiological Methods*. 49. 31–54.
- Rosypal, S., Doškař, J., Petrzik, K., Růžicková, V. 2002. Úvod do molekulární biologie. Díl IV. Molekulární biologie rostlinných virů, Priony, Molekulární evoluce, Vznik života, Metody molekulární biologie, Genové inženýrství. Brno: Rosypal S., Grafex. ISBN: 80-902562-4-4.
- Sharp, K. H., Davidson, S. K., Haygood, M. G. 2007. Localization of ‘*Candidatus Endobugula sertula*’ and the bryostatins throughout the life cycle of the bryozoan *Bugula neritina*. *ISME Journal*. 1 (8). 693–702.
- Silver, A. C., Williams, D., Faucher, J., Horneman, A. J., Gogarten, J. P., Graf, J. 2011. Complex evolutionary history of *Aeromonas veronii* group revealed by host interaction and DNA sequence data. *Plos One* 6. e16751. DOI: 10.1371/journal.pone.0016751.
- Stead, D. E., Hennessy, J., Wilson, J. 1998. Modern methods for identifying bacteria. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 52. 17–25.
- Stephen, J. R., Chang, Y. J., Gan, Y. D., Peacock, A., Pfiffner, S. M., Barcelona, M. J., White, D. C., Macnaughton, S. J. 1999. Microbial characterization of a JP-4 fuel-contaminated site using a combined lipid biomarker/polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE)-based approach. *Environmental Microbiology*. 1 (3). 231–241. ISSN: 14622912.

- Šetlíková, I., Balounová, Z., Lukavský, J., Rajchard, J. 2005. Nepůvodní druh mechovky na Třeboňsku. *Živa*. 53 (4). 172–174.
- Špinar, Z. V. 1965. Systematická paleontologie bezobratlých. Praha: Academia, 1049 s.
- Štěpánek, M. 1982. Biologické metody vyšetřování vod ve zdravotnictví. Praha: Avicenum.
- Teuber, M. 2009. *Lactococcus*, pp. 711–722. In: De Vos P., Garrity, G. M., Jones, D., Kreig, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H., Whitman, W. B (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 3. 1450. The Firmicutes, Springer, New York, USA, DOI: 10.1007/978-0-387-68489-5. ISBN: 978-0-387-95041-9.
- Torsvik, V., Salte, K., Sørheim, R., Goksøyr, J. 1990. Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 56 (3). 776–781. ISSN: 00992240.
- Tvrzová, L., Schumann, P., Spröer, C., Sedlaček, I., Páčová, Z., Šedo, O., Zdráhal, Z., Steffen, M., Lang, E. 2006. *Pseudomonas vranovensis* sp. Nov., soil bacteria isolated on nitroaromatic compounds, and emended description of *Pseudomonas asplenii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56. 2657–2663. DOI: 10.1099/ijs.0.63988-0.
- Valverde, A., Vlázquez, E., Gutiérrez, C., Cervantes, E., Ventosa, A., Igual, J. M. 2003. *Herbaspirillum lusitanum* sp. Nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53. 1979–1983. DOI: 10.1099/ijs0.02677-0.
- Vlková, E., Killer, J., Kmeť, V., Rada, V., Musilová, Š., Bunešová, V., Hovorková, P., Božik, M., Salmonová, H., Rajchard, J. 2015. Identification of microbiota associated with *Pectinatella magnifica* in South Bohemia. *Biologia* 70 (3). 365–371.
- Votava, M. 1999. Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii. Brno: Nakladatelství Hortus.
- Wawer, C., Muyzer, G. 1995. Genetic diversity of *Desulfovibrio* spp. in environmental samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of [NiFe] hydrogenase gene fragments. *Applied and Environmental Microbiology*. 61 (6). 2203–2210. ISSN: 00992240.

- Welsh, J., McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*. 18. 7213–7218.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18. 6531–6535.
- Wilson, I. G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*. 63. 3741–3751.
- Wood, T. S. 2001. Bryozoans. In: Thorp, J. H., Covich, A. P. (eds). *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates*, 2nd ed. Academic Press, pp. 505–525.
- Zrzavý, J., Hošek, P. 2006. *Fylogeneze živočišné říše*. Praha: Scientia, 255 s. ISBN: 80-86960-08-0.