

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra ekologie a životního prostředí



Hyporheické biofilmy jako součást životního prostředí juvenilních perlorodek

Hyporheic biofilms as a part of environment for development of juvenile freshwater
pearl mussel

Magdaléna Firlová

Bakalářská práce

Předložena

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

jako součást požadavků

na získání titulu Bc. v oboru

Ekologie a ochrana životního prostředí

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

Olomouc 2021

Firlová M. 2021. Hyporheické biofilmy jako součást životního prostředí juvenilních perlorodek [bakalářská práce]. Olomouc: Katedra ekologie a ŽP PřF UP v Olomouci. 35 s. Česky.

Abstrakt

Hyporheické biofilmy jsou nedílnou součástí zdravě fungujících řek, které poskytují útočiště juvenilům perlorodky říční (*Margaritifera margaritifera* Linnaeus, 1758). Perlorodka je v České republice označována za kriticky ohrožený, zvláště chráněný druh (vyhláška č. 395/1992 Sb.). Jeden z hlavních důvodů, proč dochází ke stagnaci tohoto mlže v naší přírodě může být propojen právě s množstvím a složením hyporheického biofilmu ve dně, kam se jako juvenil zahrabává. Další důvody ohrožení populace perlorodky mohou být eutrofizace vodních toků, erozní činnost v povodích spojená s odvodněním a jinými melioracemi na zemědělské a lesní půdě, regulace vodních toků či introdukce nepůvodních druhů organismů do povodí. Cílem této práce bylo provést analýzu biofilmů a organického uhlíku ve vzorcích hyporheického sedimentu odebraných na území národního parku Šumava v roce 2019 a 2020. Vzorky byly inkubovány ve Studené a Teplé Vltavě na lokalitách Ovesná a Dobrá. Rozvoj biofilmů na inkubovaném materiálu byl posuzován nepřímo prostřednictvím analýzy koncentrace polysacharidů a organického uhlíku ve vzorcích. Ačkoliv výsledky měření uhlíku i polysacharidů značně kolísaly a lišily se jak mezi lokalitami, tak mezi oběma roky, byla mezi použitými metodami nalezena pozitivní korelace. Mezi obsahem rozpuštěného kyslíku v intersticiální vodě a obsahem polysacharidů/uhlíku v biofilmech korelace zjištěna nebyla. Biofilmové nárosty nejspíše neovlivňují obsah kyslíku v intersticiální vodě, a tedy ani vývoj juvenilů perlorodky říční.

Klíčová slova: NP Šumava, Vltava, biofilmový nárost, polysacharidy, uhlík, kyslík

Firlová, M: Hyporheic biofilms as a part of environment for development of juvenile freshwater pearl mussel [bachelor's thesis]. Olomouc: Department of Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Science, Palacky University of Olomouc. 35 pp. Czech.

Abstract

Hyporheic biofilms are an integral part of healthy and functioning rivers, which are a suitable habitat for a juvenile Freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* Linnaeus, 1758). In the Czech Republic, Freshwater pearl mussel is marked as critically endangered and especially protected species (Decree No 395/1992). One of the main reasons why there is a stagnation of these molluscs in our nature may be linked to the amount and composition of hyporheic biofilm in the river bottom, where the juvenile digs itself into the river floor. Other reasons why the population of Freshwater pearl mussel is endangered could be the eutrophication of watercourses, erosion in the river basins followed with drainage and other meliorations on farmlands and woodlands, regulation of watercourses or exposure to unoriginal organisms into the river basins. The aim of this work is to make an analysis of biofilms and organic carbon in samples of hyporheic sediments collected in the Šumava National Park in 2019 and 2020. The samples were incubated in the area of Studená and Teplá Vltava, specifically in the localities Ovesná and Dobrá. The development of biofilm on the incubational materials was measured indirectly by the concentration of polysaccharides and organic carbon in the samples. Although the results of carbon and polysaccharide measurements fluctuated considerably and differed both between localities and between the two years, a positive correlation was found between the methods used. No correlation was found between the dissolved oxygen content in interstitial water and the polysaccharide/carbon content in biofilms. Biofilm growths are unlikely to affect the oxygen content of interstitial water, and therefore the development of juveniles of freshwater pearl mussels.

Key words: Šumava National Park, Vltava, biofilm growth, polysaccharides, carbon, oxygen

Prohlášení

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

V Olomouci, dne:

.....

Podpis

Obsah

Seznam obrázků	VIII
Seznam použitých zkratk.....	IX
Poděkování.....	X
1 Úvod.....	1
2 Cíle.....	2
3 Teoretická část	3
3.1 Životní cyklus perlorodek	3
3.2 Mikrobiální biofilmy	5
3.2.1 Vznik, složení a význam biofilmů	5
3.3 Význam polysacharidové matrice	7
3.4 Biofilmy v tekoucích vodách a říčních sedimentech.....	8
3.4.1 Druhovú diverzita biofilmu v tekoucích vodách a říčních sedimentech	9
3.4.2 Časoprostorová distribuce biofilmů v tekoucích vodách a říčních sedimentech	10
3.5 Biofilmy jako potravní složka	11
4 Materiál a metody	13
4.1 Inkubace a odběr sedimentů	13
4.2 Metody.....	17
4.2.1 Určení obsahu organických látek pomocí ztráty žiháním (Lost of ignition, LOI)	17
4.2.2 Stanovení obsahu neutrálních sacharidů podle Duboise.....	17
4.2.3 Zpracování dat.....	19
5 Výsledky	20
5.1 Stanovení koncentrace polysacharidů	20
5.2 Procentuální obsah uhlíku	21

5.3	Měření kyslíku v intersticiální vodě	23
5.4	Vztahy mezi studovanými parametry	24
6	Diskuze	25
6.1	Koncentrace polysacharidů	25
6.2	Množství celkového organického uhlíku.....	26
6.3	Měření kyslíku v intersticiální vodě.....	27
7	Závěr	29
	Literatura.....	30

Seznam obrázků

Obrázek 1: Rozmnožovací cyklus perlorodky říční. (převzato ze Simon et al. 2018). ...	4
Obrázek 2: Mapa lokalit sběru vzorků.	13
Obrázek 3: Experimentální krabice k uložení válců do 10 a 20 cm hloubky dna.	14
Obrázek 4: Experimentální válečky.	15
Obrázek 5: Příklad umístění válečků (a jednoho válce) a také teploměrů do hloubky 3-5 cm hyporeálu na lokalitách Ovesná (vlevo) a Studená Vltava (vpravo).....	16
Obrázek 6: Příprava kalibrační křivky pro stanovení obsahu neutrálních sacharidů. ...	18
Obrázek 7: Graf koncentrace polysacharidů (ve válečcích i válcích) naměřených v letech 2019 a 2020 na jednotlivých lokalitách.	20
Obrázek 8: Graf procentuálního množství uhlíku naměřeného ve válcích i válečcích na jednotlivých lokalitách v letech 2019 a 2020.....	21
Obrázek 9: Graf procentuálního množství uhlíku naměřeného na jednotlivých lokalitách v letech 2019 a 2020, pouze data z válce v 10 cm a 20 cm.	22
Obrázek 10: Naměřený obsah kyslíku v intersticiální vodě ve všech válečcích i válcích v letech 2019 a 2020 na všech lokalitách (mg/l).....	23

Seznam použitých zkratk

FDA – fluorescein diacetát

EPM – extracelulární polymerní matrice

EPS – extracelulární polymerní substance

AMK – aminokyseliny

DOM – „dissolved organic matter“ (rozpuštěný organický materiál)

FPOM – „fine particulate organic matter“ (jemný naplavený organický materiál)

POM – „particulate organic matter“ (partikulovaný organický materiál)

LOI – „lost of ignition“ (ztráta spalováním)

TOC – „total organic carbon“ (celkový organický uhlík)

DOC – „dissolved organic carbon“ (rozpuštěný organický uhlík)

POC – „particulate organic carbon“ (partikulovaný organický uhlík)

Poděkování

Nejprve bych ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce, doc. RNDr. Martinu Rulíkovi, Ph.D., za poskytnutí cenných rad, literatury i za trpělivost, kterou se mnou měl. Dále bych ráda poděkovala své rodině i přátelům, kteří mě podporovali po celou délku mého studia. V poslední řadě bych chtěla poděkovat Ing. Janu Černoorskému za pomoc při laboratorních analýzách a Mgr. Lukáši Weberovi za pomoc se statistickými analýzami.

1 Úvod

Hyporheické biofilmy hrají obrovskou roli ve fungování zdravých řek, bez kterých bych v této práci nemohla rozebírat ani v přírodě velmi ohroženého mlže perlorodku říční (*Margaritifera margaritifera*). Tento velký mlž prochází složitým životním cyklem, přes parazitární larvu a glochidii, kvůli kterému se dospělosti dožije pouze minimální počet jedinců. Juvenilové perlorodek se zahrabávají do hyporheické části dna, kde se mohou vyvíjet až 10 let, a to pouze v případě, jestliže jsou dodrženy všechny životu důležité podmínky. Jedním z těchto faktorů ovlivňujících vývoj tohoto mlže by mohly být také nárosty hyporheického biofilmu, nacházející se v sedimentu, do kterého se juvenil perlorodky zahrabává.

Perlorodka je podle vyhlášky č. 395/1992 Sb. v České republice kriticky ohroženým, zvláště chráněným druhem. Důvodů ohrožení je mnoho, od eutrofizace vod, introdukce nepůvodních druhů, erozní činnosti v povodích spojených s odvodněním a melioracemi na zemědělské i lesní půdě, až po regulaci vodních toků. Nejen díky těmto rušivým elementům dochází ke změnám podmínek v oligotrofních tocích i na Šumavě, kde se nachází jedna z posledních lokalit výskytu perlorodky říční v České republice.

Jednou ze základních otázek této práce a výzkumu je, jestli spolu souvisí množství uhlíku a polysacharidů v biofilmových nárostech, a také, zda korelují hodnoty kyslíku s naměřenými hodnotami uhlíku a polysacharidů. Tedy jestli bude se stoupajícím množstvím uhlíku nebo polysacharidů klesat množství naměřeného kyslíku v intersticiální vodě.

2 Cíle

Tato práce si klade za cíl přispět ke zdokumentování hyporheických biofilmů v kontextu ohrožení juvenilů perlorodky říční a porovnání biofilmů na jednotlivých lokalitách.

Cílem této bakalářské práce je vypracování literární rešerše na téma hyporheické biofilmy v souvislosti s výskytem juvenilů perlorodky říční, a dále provedení laboratorní analýzy a kvantifikace biofilmových nárůstů ve vzorcích sedimentů, inkubovaných v tocích s výskytem tohoto mlže.

Práce je rozdělena na dvě části, teoretickou a praktickou. V teoretické části se zabývá především základními pojmy v oblasti biofilmových nárůstů v řekách a také životním cyklem perlorodky říční i tím, jak by hyporheické biofilmy a juvenilové perlorodky mohly souviset a navzájem se ovlivňovat. Praktická část se zaměřuje již na vlastní výzkum biofilmů v hyporheickém prostředí na území národního parku Šumava, v řece Studená, Teplá Vltava i těsně pod jejich soutokem na Vltavě, kde je potvrzen výskyt perlorodky říční. Součástí práce je i popis inkubací, odběru vzorků sedimentu a měření kyslíku v intersticiální vodě.

3 Teoretická část

3.1 Životní cyklus perlorodek

Je nezbytné, abych uvedla životní cyklus perlorodky, a mohla tak definovat stádium juvenila, o kterém se v práci zmiňuji. Rozmnožovací cyklus perlorodky říční (*Margaritifera margaritifera*) zahrnuje parazitické larvální stádium vyžadující hostitele a dále dlouhé období vývoje juvenilního jedince, které se kompletně odehrává v říčních sedimentech (obr. 1). Perlorodka říční je sice gonochorista, ale jedinci žijící roztroušeně v toku mohou být i hermafroditní. V populaci jiných velkých mlžů, nebo při malé hustotě populace, mohou hermafroditní jedinci tvořit až 80 % populace perlorodky. U rodu *Margaritifera margaritifera* se však mohou stát hermafrodity jen samice (Bauer *et* Wächtler 2001).

Samci perlorodky vypouští v letních měsících do vody velké množství spermií, které jsou nasávány přijímacím otvorem samic a dochází tak k oplození vajíček uvnitř jejich těla. U hermafroditických samic dochází k oplození v těle samice bez účasti samce (Bauer 1987; Bauer *et* Wächtler 2001).

Oplodněná vajíčka se vyvíjí v mezižaberních prostorách samičky 4–6 týdnů do invazního stádia larvy (glochidie). Ukončení tohoto procesu je ovlivňováno teplotou vody, je nutné dosažení celkové sumy 380 až 420 °C (Simon *et al.* 2015). Glochidie jsou poté vyvrhovány do vodního proudu, kde se některé z nich uchytí na žaberní aparát svého hostitele (Bauer 1988). Jde o první kritickou fázi ve vývoji perlorodky, vyznačující se vysokou mortalitou vyvrhovaných larev.

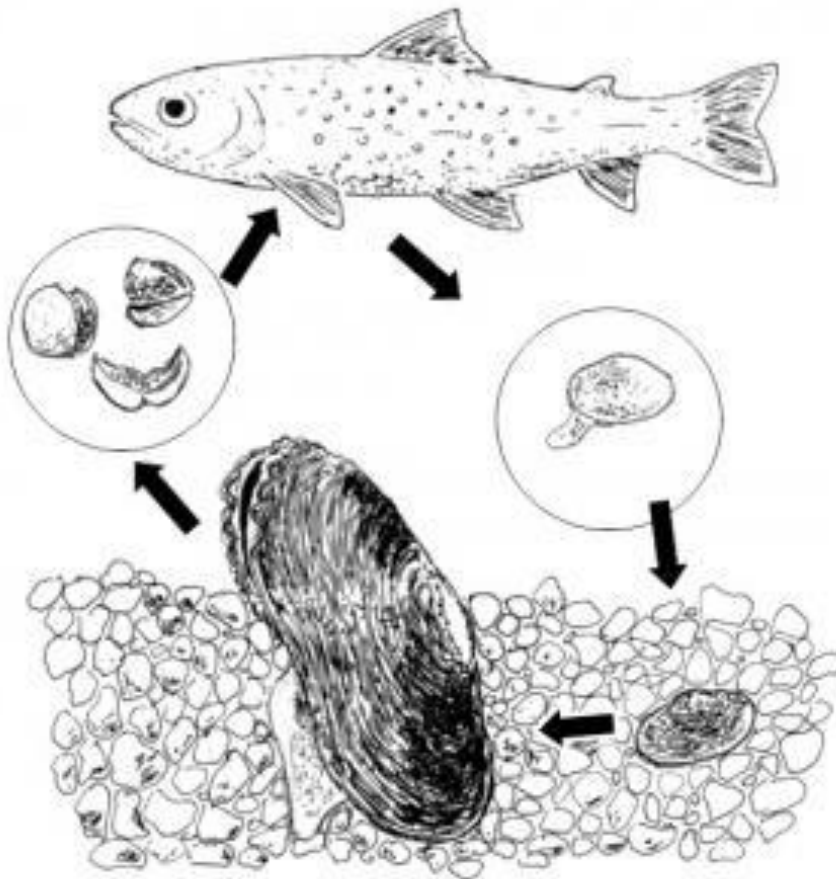
V Evropě je hostitelem perlorodky říční (glochidií) losos obecný (*Salmo salar*) a pstruh obecný, forma potoční (*Salmo trutta* m. *fario*) (Gethin *et al.* 2010).

V České republice je v současnosti jediným a výhradním hostitelem glochidie pstruh obecný f. potoční (*Salmo trutta*). Glochidie je sice schopná uchytit se i na žábřácích jiných hostitelů, ale v průběhu 48 hodin uhyne. Původním hostitelem v Čechách byl losos obecný, který se však po přerušení jeho tahu vodními díly na Labi, na lokalitách s výskytem perlorodek již nevyskytuje (Simon *et al.* 2018).

Po uchycení glochidie v žaberním aparátu ryby, vytvoří larva cystu a začne metamorfóza na juvenilní, dospělci podobnou perlorodku. Parazitická fáze je závislá na teplotě vody a trvá v podmínkách jihočeských toků okolo 11 měsíců. Po ukončení metamorfózy se

juvenil uvolní z cysty a vypadává na dno toku. V této fázi dosahují mladé perlorodky asi 0,3 až 0,5 mm (Simon *et al.* 2018).

V době uvolňování juvenilů a osídlování substrátu dna nastává druhá kritická fáze. V této fázi musí být splněny všechny požadavky na kvalitu biotopu (teplota, příznivé složení substrátu dna, příznivé kyslíkové poměry v prostorách substrátu dna), a přítomnost dostatečného množství kvalitní potravy. Jestliže tomu tak není, juvenilové hynou. Pokud jsou podmínky dodrženy, juvenil se pomocí svalnaté nohy zahrabe do substrátu. V tomto intersticiálním prostředí žijí juvenilové až 10 let. Teprve ve starším věku zaujmají stabilní jedinci stálou pozici na povrchu dna. V našich podmínkách dosahuje perlorodka pohlavní dospělosti až mezi 15. a 20. rokem života, může se však lišit podle dlouhověkosti dané populace (Meyers *et Raymond* 1977). Perlorodka říční může v České republice v chladných horských polohách přežívat běžně až 100 let. Na řece Blanici byli dokonce nalezeni nejstarší jedinci ve věku 110 let (Simon *et al.* 2015).



Obrázek 1: Rozmnožovací cyklus perlorodky říční. (převzato ze Simon *et al.* 2018).

3.2 Mikrobiální biofilmy

3.2.1 Vznik, složení a význam biofilmů

Mikrobiální společenstva se ve vodním prostředí mohou vyskytovat ve formě volně plovoucích planktonních organismů, nebo jako přisedlá biofilmová komunita (Van Horn *et al.* 2011). Mikroorganismy mohou přecházet z volně plovoucích do fáze přisedlé a naopak, jako přisedlé pak kolem sebe formují slizovitý ochranný obal, zvaný polysacharidová matrice. (Battin *et al.* 2007).

Uvádí se, že většina bakterií je schopna formovat biofilmy, neboť je to pro jejich přežití velice praktické (Johnson 2008). Polysacharidová matrice je totiž nejen místem akumulace živin, ale slouží také jako bariéra, která chrání mikrobiální společenstvo před predátory, patogeny i extrémními podmínkami prostředí. Bakterie, které jsou přisedlé k povrchu v podobě biofilmu obvykle dominují celkovému mikrobiálnímu životu v řekách (Battin *et al.* 2016).

V literatuře můžeme najít celou spoustu definic biofilmu. Obecně lze biofilm charakterizovat jako aktivní biologickou vrstvu, složenou z mikroorganismů (bakterií, archeí, sinic, řas, hub a prvoků) a jejich extracelulárních polymerních produktů, která je přichycena na podkladu, na kterém vytváří funkční mikrobiální konsorcium ukotvené v rozsáhlé polymerní matrici (Lock *et al.* 1984; Costerton *et al.* 1987; Neu *et al.* Lawrence 1997; Fried *et al.* 2000). Aktuálnější definice popisuje biofilm jako „přisedlé společenstvo mikroorganismů, charakterizované tím, že buňky, které jsou ireverzibilně přichyceny k podkladu nebo k sobě navzájem, jsou zanořeny v matrici svých extracelulárních produktů a vykazují odlišný fenotyp s ohledem na rychlost růstu a transkripci genů“ (Donlan *et al.* Costerton 2002).

Vznik biofilmu můžeme popsat ve čtyřech fázích (Costerton *et al.* 1987; Donlan 2001; Rulík *et al.* 2011):

- i. Fáze vzniku biofilmu, také nazývaná jako „inicial events“ zahrnuje transport a adsorpci organických molekul na podklad, tzv. conditioning.
- ii. Fáze přisedání mikroorganismů (adheze), při které buňky používají k přichycení specifické, povrchově aktivní molekuly tzv. adheziny, které mohou mít povahu bílkovin, glykopeptidů nebo polysacharidů. Buňkám napomáhají k adhezi také

buněčné struktury např. fimbrie. Proces přichycení dělíme na reverzibilní a ireverzibilní.

- iii. Fáze růstu a zrání biofilmu následuje pouze po úspěšném přichycení buněk k povrchu. V této fázi produkují mikroorganismy poměrně velké množství extracelulárních polymerních produktů a postupně se tak vytváří zralá a stratifikovaná vrstva biofilmu.
- iv. Fáze uvolňování jednotlivých buněk z biofilmu, ve které dochází k uvolňování jednotlivých mikrobiálních buněk nebo jejich shluků a k následné disperzi do okolí. Disperze nastane až po dosažení kritické abundance buněk v biofilmu, nebo působením fyzikálních faktorů (např. hydraulických sil).

U posledních dvou fází je důležitý vznik vnitrobiofilmové komunikace tzv. „quorum sensing“. Tento mechanismus je založen na produkci chemických signálů dvojího typu a jejich vysílání do prostředí biofilmu. Buňky v biofilmu mohou díky němu řízeně kontrolovat růst a denzitu celého společenstva. Pokud je denzita nízká, k vysílání signálu nedochází, avšak jestliže se zvyšuje buněčná hustota, zvyšuje se i intenzita vysílaných signálů. Gram pozitivní bakterie vysílají především oligopeptidy a gram negativní bakterie vysílají převážně N-acyl-homoserinové laktony. Produkované chemické signály tímto způsobem upozorňují okolní buňky o populační hustotě a zabraňují tak dalšímu nadměrnému populačnímu růstu (Dürr *et* Thomason 2010).

Mimo již popsané behaviorální faktory, ovlivňují morfologii společenstva i fyzikální faktory, mezi které v tekoucích vodách patří především rychlost proudění. Biofilmy rostoucí v prostředí, kde je rychlejší proudění vody, jsou většinou hustší a hladší než ty, které rostou v prostředí s pomalým prouděním vody. Ty bývají mnohem více porézní. Složení biofilmu výrazně ovlivňuje prostředí, ve kterém se nachází. Většina biofilmů je tvořena až z 85 % extracelulárními polymerními látkami (EPS), které jsou složeny z polysacharidů (exopolysacharidů), bílkovin, fosfolipidů a nukleových kyselin. Přírodní biofilmy mohou být tvořené bakteriemi, sinicemi, kvasinkami i řasami. Mikroorganismy jsou v biofilmu rozloženy nerovnoměrně a rostou v mikrokoloniích, které lze popsat jako shluky kuželovitého či houbovitého tvaru, spojené různě širokými, spleťnými kanálky, které podporují transport živin i odpadních produktů v plně vyztáhlém biofilmu s heterogenní strukturou. Živiny i odpadní látky se tak mohou dostat do i z nejhlubších částí biofilmu, které jsou již většinou tvořeny anaerobními mikroorganismy (Rulík *et al.* 2011).

Biofilmy lze nalézt prakticky všude, kde je dostatek živin, vody i relativně dobrá výměna plynů. Rostou na téměř jakémkoliv povrchu. Mohou se vyskytovat v přírodě, v nejrůznějších odvětvích průmyslu i v medicíně. Pracuje s nimi i molekulární inženýrství. S problémy, vyskytujícími se v souvislosti s růstem biofilmů bojuje zejména humánní medicína. Bakterie rostoucí v biofilmech jsou často více odolné před účinky antibiotik a způsobují tak různé poruchy imunitního systému. Dále mohou způsobovat endokarditidu (zánětlivé onemocnění srdečních chlopní a vnitřní výstelky srdce), cystickou fibrózu či infekci dutiny ústní. Nárůst biofilmů na umělých implantátech, např. kardiostimulátorech, umělých vnitřních chlopních, kloubních náhradách nebo nitroděložních tělískách může způsobovat také řadu problémů. Proto se v moderní medicíně neustále vyvíjejí nové nanotechnologie a způsoby sterilizace nástrojů i těchto implantátů.

Biofilm může také urychlovat korozi, ucpávat náplně chladících věží, potrubí a průchodů vody, v souvislosti s biofoulingem (vznik povlaků bakterií na površích ponořených do tekutiny). Tyto unikátní mikrobiální kolonie však mají i spoustu pozitivních vlivů. Značnou mírou se podílejí na samočisticí schopnosti potoků i řek, umějí snižovat znečištění půd, používají se pro úpravu podzemních pitných vod i v technologii výroby potravin (Costerton 1999; Dürr *et Thomason* 2010; Holá *et al.* 2011).

3.3 Význam polysacharidové matrice

Biofilm je charakterizován hlavně tím, že většinu jeho hmoty tvoří extracelulární polymerní matrice (dále už jen EPM). V literatuře se udává, že EPM slouží nejen k fixaci jednotlivých organismů, ale určuje i strukturu biofilmu a to, jak budou mikroorganismy v biofilmu umístěny. Přispívá tak rovnoměrnému rozdělení buněk tak, aby měly všechny dostatek živin a biofilm tím mohl dosáhnout homeostáze. Složení EPS může být různé, záleží jak na vnitřních podmínkách společenstva, jako je např. genotyp buněk v biofilmu, tak i na vnějších podmínkách prostředí, např. povaha kolonizovaného prostředí i jiné fyzikálně-chemické podmínky okolí. Z tohoto důvodu může docházet k rozdílnému složení EPS a jejich fyzikálních vlastností, přestože je tvořena podobnými či i identickými organismy. Hlavní složkou EPS je voda, polysacharidy (homosacharidy a heterosacharidy), proteiny (extracelulární a výsledek lýze) a to i včetně enzymů, DNA a RNA z lyzovaných buněk a v poslední řadě i vázané a volné ionty. Dále se zde nachází i peptidoglykany, fosfolipidy, lipidy a další složky buněk. Velkou důležitost v matici mají

i (exo)polysacharidy, což jsou polysacharidy, nacházející se na povrchu buněčné stěny mikrobiálních buněk. Voda může být v biofilmu vázána v kapsulích buněk nebo jako rozpouštědlo, jehož vlastnosti determinují látky v něm rozpuštěné. Dalšími důležitými složkami polysacharidové matrice jsou komplex vyloučených polymerů, absorbovaných živin a metabolitů buněk, dále produkty buněčné lýze i s partikulovaným materiálem a detritem z vnějšího prostředí.

EPM slouží především k fixaci biofilmu, přesto má i spoustu dalších funkcí. Slouží jako selektivní síto, které dokáže účinně filtrovat a dávkovat množství plynů, rozpuštěných solí a makromolekul z okolního prostředí. Díky EPM může biofilm velice účinně vychytávat nezbytné nutrienty a organické látky z okolní vody, díky nimž pak může růst ve vyložené oligotrofním prostředí (Dürr *et* Thomas 2010).

Důležitou funkcí EPM je ochrana buněk před UV zářením, antibiotiky, toxicitou a dalšími nepříznivými účinky vnějšího prostředí. Díky tomu jsou buňky uvnitř biofilmu odolnější (Rulík *et al.* 2011).

V posledních letech se mluví i o důležitosti stabilizace říčních i mořských sedimentů, a to nejen pomocí fyzikálně – chemických vazeb, ale i díky biologické aktivitě mikroorganismů, které produkují extracelulární polymerní matici. Ta se podle novějších studií významně podílí při ochraně sedimentů před erozí, výraznějším pohybem a dalšími sediment ohrožujícími faktory. EPM vytvářená metabolickou aktivitou biofilmu a v něm uložených mikroskopických řas a bakterií ovlivňuje vlastnosti sedimentu tím, že na sebe navazuje jemnozrné částičky sedimentu, mění obsah vody a zvyšuje podíl celkového organického materiálu ve svém okolí právě skrze vyloučené produkty. Síť EPM napomáhá soudržnosti sedimentů tím, že absorbuje jeho drobná zrna a tím vyplňuje mikroskopická místa v sedimentu. Díky tomu jsou pak jemnozrné sedimenty více imunní vůči erozi např. unášením proudem (Gerbersdorf *et al.* 2008).

3.4 Biofilmy v tekoucích vodách a říčních sedimentech

Mikrobiální biofilmy jsou nepostradatelnou součástí všech tekoucích vod. Podporují spoustu biochemických cyklů včetně fixace dusíku, oxidu uhličitého, probíhá zde i denitrifikace, nitrifikace, metanogeneze, redukce síranů i železa a velké množství dalších procesů. Biofilmy se také podílejí při čištění toků a mohou sloužit jako potrava pro velkou řadu organismů (Dürr *et* Thomason 2010).

Podle toho, na jakém povrchu se biofilmy vyskytují, je můžeme rozdělit na biofilmy (Rulík *et al.* 2011):

- epilítické, vyskytující se na jakémkoliv pevném minerálním povrchu, např. na kamenech či skalách, zároveň prozatím nejvíce prozkoumaná forma biofilmů,
- epipelické, vyskytující se na bahnitých substrátech,
- epipsamické, vyskytující se na zrnech písku,
- epixylické, vyskytující se na jakémkoliv dřevnatém materiálu,
- epifytické, vyskytující se na rostlinách a
- epizootické, vyskytující se na tělech živočichů.

Pro mou práci jsou důležité hlavně epilítické biofilmy, které narůstají na šterkopískovém sedimentu, do kterého se zahrabávají juvenilové perlorodek.

3.4.1 Druhá diverzita biofilmu v tekoucích vodách a říčních sedimentech

Nejrozšířenější bakteriální skupinou, nacházející se ve sladkovodních biofilmech jsou typicky *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* a *Cyanobacteria*. Ve sladkovodních tocích dominují především *Beta-Proteobacteria*, to však nemusí být vždy pravidlem. Podobnou hojnost totiž mohou ve sladkovodních tocích zaujmout i *Alpha-Proteobacteria*, která obvykle obývají slánovodní ekosystémy (Battin *et al.* 2001; Simon *et al.* 2002).

Biofilmy vystavené světlu většinou obsahují velkou spoustu cyanobakterií, v prostředí s nízkým pH to může být např. typicky se vyskytující *Acidobacteria*, dále *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Gamma-* a *Delta-Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes* a *Deinococcus-Thermus*. Méně důležitá složka říčních biofilmů jsou obvykle *Archea* (Wilhelm *et al.* 2014). Přesto byly nalezeny výjimky. A to v hyporheickém biofilmu, kde se může nacházet i více než 10 % methanogenních archea (Olapade *et Leff* 2005; Buriánková *et al.* 2012).

Následující nepostradatelnou složkou říčních biofilmů jsou i mikrobiální eukaryota, nejčastěji zástupci rozsivek (*Bacillariophyta*) a zelených řas (*Chlorophyta*), které slouží jako úložiště uhlíku. Ten pak spotřebovávají heterotrofní mikroorganismy. Další důležitou složkou biofilmu jsou houby. Fungují jako dekompozitoři a mohou být i hlavním, strukturu tvořícím elementem. Ve sladkých vodách jsou to hlavně Ascomycota (Das *et al.* 2007; Heino *et al.* 2014).

Poslední složkou biofilmu jsou prvoci, mezi které můžeme zařadit např. měňavky, bičíkovce či nálevníky. Ti společně s viry mohou částečně kontrolovat růst, architekturu, funkci i diverzitu biofilmu (Jackson *et al.* 2008; Böhme *et al.* 2009; Dürr *et Thomason* 2010; Besemer 2015).

Důležitou a nepostradatelnou složkou biofilmů jsou již výše zmíněné rozsivky, jejichž výskyt může být korelován s množstvím a výskytem mlžů. Z důvodu podobného složení schránek těchto dvou organismů by rozsivky mohly být také důležitou složkou v potravním řetězci zahrnujícím mlže (Andriana *et al.* 2021).

3.4.2 Časoprostorová distribuce biofilmů v tekoucích vodách a říčních sedimentech

V řekách dominují s velkou převahou biofilmy přisedlé k povrchu. Podle toho, jaká intenzita světla se biofilmu dostává v různých hloubkách sedimentu, můžeme zde nalézt odlišné složení biofilmového společenstva. V bentické zóně, která se nachází na povrchové části sedimentu, převahují eukaryotické řasy (např. rozsivky, skrytěnky, zlativky, zelené řasy a ruduchy), do určité míry i cyanobakterie, bakterie a archaea. Dalším důležitým obyvatelem jsou pravděpodobně i houby, tato složka biofilmů je však stále málo probádaná (Baschien 2008). Takováto místa jsou většinou i hojněji osídlována vodními bezobratlými živočichy (Geesey *et al.* 1978; Pusch 1996; Battin *et al.* 2016).

Hlubším zónám, s menším množstvím slunečního záření poté dominují spíše bakterie a archaea, které se podílejí na řadě anaerobně respiračních procesů. Mezi takové anaerobní respirační procesy zařazujeme např. metanogenezi, respiraci sulfátu, nitrátu nebo železa. Tato hlubší oblast je nazývána „*hyporheickou zónou*“, což je intersticiální, porézní a dobře okysličená oblast sedimentů dna s bohatým výskytem biofilmu a jiných vodních organismů, včetně pro nás důležitého juvenila perlorodky říční. Hyporheická zóna je definována především tím, že zde proudí jak povrchová voda z koryta, tak podzemní voda a může docházet k jejich míšení. Tím, že je hyporheická zóna centrem vysoké metabolické aktivity, je důležitou složkou v procesu samočištění, akumulace, mineralizace i přeměny živin. Kyslík rozpuštěný ve vodě je spotřebováván při degradaci akumulované organické hmoty, avšak na rozdíl od stojatých vod, kde dochází ke stagnaci vody na jednom místě, v řekách voda neustále hyporheickou zónou různě proudí, přináší kyslík a díky tomu vytváří rozmanité gradienty redox potenciálu a různých metabolických drah. V hyporheických sedimentech tak můžeme na určitých lokalitách naměřit relativní

vysoké nasycení vody kyslíkem až do hloubky 80 cm (Fischer *et al.* 2005; Arnon *et al.* 2009; Fasching *et al.* 2016; Battin *et al.* 2016).

3.5 Biofilmy jako potravní složka

V řekách jsou biofilmy hlavní složkou enzymatických aktivit, včetně cyklu organického materiálu, ekosystémové respirace a primární produkce a jako takové tvoří základ potravní sítě (Barlocher *et al.* 1989).

Mikroorganismy v rámci biofilmu rozkládají, používají a absorbují organické látky jak z okolních alochtonních zdrojů, tak využívají i živiny (zdroje), které jsou si schopny vytvořit sami. Takové nazýváme autochtonními a v rámci biofilmového společenstva je tvoří především sinice a řasy. Většina organických látek jako jsou bílkoviny, nukleové kyseliny, cukry či lipidy, se v prostředí vyskytují ve formě tzv. vysokomolekulárních látek a díky tomu je mikroorganismy nemohou dobře využívat. Je tedy nutné, aby prošly degradací a byly přetvořeny na nízkomolekulární látky. Tyto látky už jsou lépe využitelné pro mikroorganismy, protože jsou tvořeny jednodušší malou molekulou. Jsou to např. jednoduché cukry, aminokyseliny či nukleotidy a tvoří základní stavební látky pro vysokomolekulární látky. Na degradaci vysokomolekulárních látek na nízkomolekulární se podílí extracelulární enzymy, které produkují především bakterie, méně často i houby a řasy (Dürr *et al.* 2010; Pohlson *et al.* 2010).

Velice důležitou schopností biofilmu je degradovat neboli odbourávat organické látky, přičemž zároveň dochází k uvolňování živin do prostředí. Díky tomu jsou mikrobiální biofilmy esenciální složkou potravního řetězce. Velice důležitou roli hrají díky své vysoké metabolické aktivitě hlavně biofilmy žijící na dně a v hyporheické zóně v sedimentu. Tam dochází k akumulaci všech živin v daném toku, a tím i k optimálním podmínkám pro růst a dostatečnou enzymatickou aktivitu mikrobiálních organismů (Giorgio *et al.* 2005; Dürr *et al.* 2010).

Biofilm hraje důležitou roli i v tzv. mikrobiální smyčce (microbial loop), která vysvětluje využití organických látek z různých zdrojů k produkci biomasy (Azam *et al.* 1983; Landry 2002; Pomeroy *et al.* 2007).

Část rozpuštěných organických látek (DOM – dissolved organic matter), uvolněných z metabolismu rostlinných i živočišných organismů je zabudována do těl bakterií, následně je bakterie pohlcena eukaryotickým organismem (hlavně bičíkovci a nálevníky),

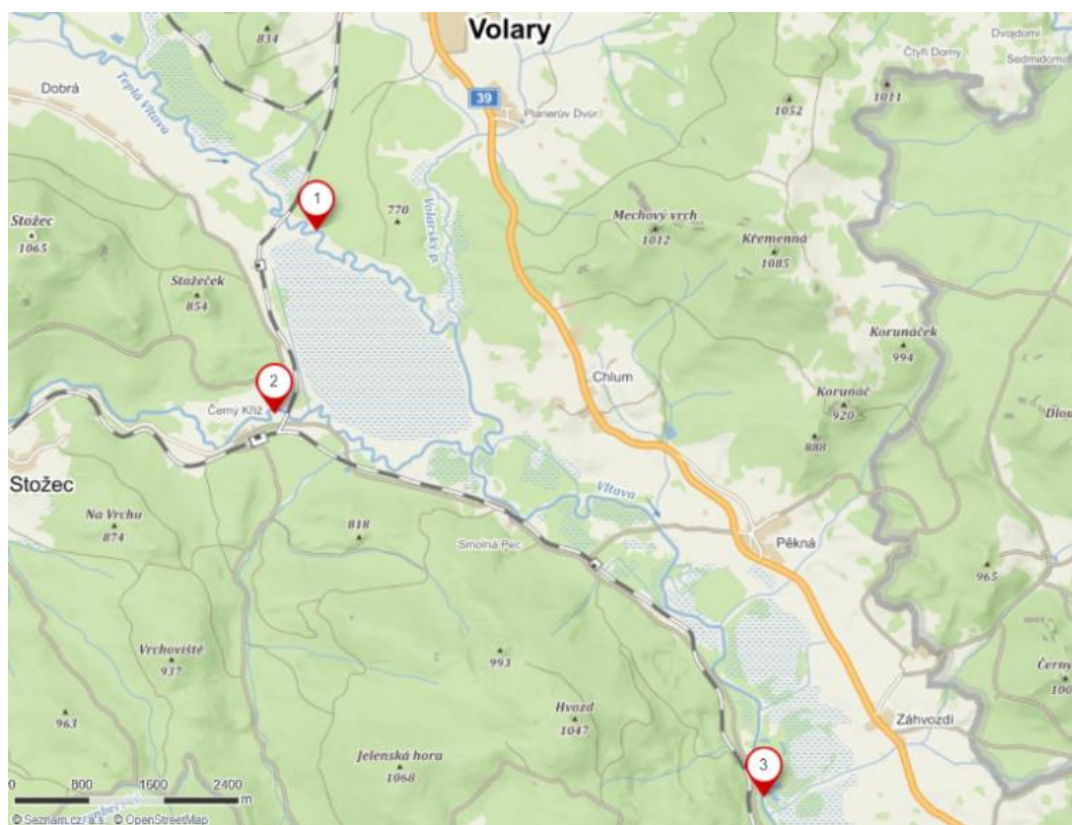
které poté může v pelagickém prostředí zkonzumovat zooplankton. Tím se podstatně zvýší potravní zdroje pro konzumenty, v našem případě perlorodky říční. Místa, kde byla naměřena vysoká mikrobiální aktivita jsou daleko hojněji kolonizována vodními bezobratlými živočichy (Pusch 1996).

4 Materiál a metody

4.1 Inkubace a odběr sedimentů

Výzkum, koordinovaný pracovníky VÚV T.G.M. Praha, probíhal na území Národního parku Šumava, na 3 lokalitách zvolených na řece Vltavě a jejích přítocích. Kromě inkubace a odběru sedimentů s vytvořeným biofilmem zde bylo rovněž opakovaně prováděno i měření rozpuštěného kyslíku v intersticiální vodě sedimentu.

Lokalita Dobrá se nachází na Teplé Vltavě, lokalita Studená Vltava na Studené Vltavě a lokalita Ovesná pod soutokem Teplé a Studené Vltavy. Lokality jsou níže vyznačeny i na mapě (obr. 2). Na všech těchto lokalitách byl prokázán výskyt perlorodky říční. Vzorky inkubovaného sedimentu pro analýzu byly odebírány na těchto lokalitách v roce 2019 a 2020.



Obrázek 2: Mapa lokalit sběru vzorků - 1. lokalita – Dobrá na Teplé Vltavě (GPS - 48.8809553N, 13.8697750E), 2. lokalita - Studená Vltava (GPS - 48.8631475N, 13.8635042E), 3. lokalita – Ovesná pod soutokem Teplé a Studené Vltavy (GPS - 48.8260611N, 13.9356286E) (zdroj z www.mapy.cz).

Nárostovým substrátem válců v experimentálních krabicích i ve válečkích byl písek velikostní frakce 1-2 mm odebraný z Teplé a Studené Vltavy. Písek byl odebrán ruční lopatkou ze dna řeky, pomocí granulometrického síta byla získána požadovaná frakce, která byla následně vysušena a sterilizována vyžháním v peci při 550 °C. Velikost zrn písku 1-2 mm byla zvolena z hlediska velikosti ok použité síťoviny válečků a válců, z hlediska retence a výzkumu množství jemného naplaveného organického materiálu (FPOM) a také z důvodu největšího množství partikulovaného organického materiálu (POM) a biofilmu na zrnech sedimentu o velikosti < 1 mm (Leichtfried 1995).

Dle Leichtfried (1985) je hlavním důvodem největšího osídlení této velikostní frakce zrn sedimentu větší relativní plocha k osídlení pro mikrobiální společenstvo.

Dne 21.8.2019 byly v proudnici řeky umístěny speciální inkubační krabice se dvěma vloženými speciálně upravenými PVC válci, umožňující inkubaci sedimentů v hloubkách dna 10 a 20 cm (obr. 3).



Obrázek 3: Experimentální krabice k uložení válců do 10 a 20 cm hloubky dna. Foto: R. Čablová.

Tyto krabice byly umístěny na všech lokalitách, přičemž na lokalitě Dobrá bylo navíc umístěno experimentálně dalších 24 menších válečků z drátového pletiva v hloubce 5-10 cm, a to na šesti místech po čtyřech kusech válečků (obr. 4).



Obrázek 4: Experimentální válečky. Foto vlevo: I. Ibrahimovič, vpravo: R. Čablová.

Po třech měsících inkubace bylo 28.11.2019 vyjmuto ze sedimentu 22 malých válečků (2 válečky se v průběhu inkubace ztratily) i velké válce ze všech krabic.

Následující rok, dne 23.4.2020 bylo na všech lokalitách umístěno v okolí kolem krabice 9 malých válečků opatřených hadičkami pro přímé měření rozpuštěného kyslíku. Hadičky vyčnívaly ze dna a byly zašpuntovány (obr. 5). Vedle válečků byly v hloubce 10 a 20 cm na každé lokalitě umístěny i kontinuální teploměry (TT) HOBO Pendant. Veškeré vzorky byly vyjmuty 5.11.2020.

V roce 2019 byla tedy doba inkubace vzorků 99 dní, v roce 2020 probíhala inkubace vzorků v terénu po dobu 196 dní. Po odebrání byl sediment z válců i malých válečků přemístěn do označených PVC sáčků a hluboko zamražen až do doby jejich zpracování (5.2.2020, resp. 22.1.2021).



Obrázek 5: Příklad umístění válečků (a jednoho válce) a také teploměrů do hloubky 3-5 cm hyporeálu na lokalitách Ovesná (vlevo) a Studená Vltava (vpravo). Foto: R. Čablová.

4.2 Metody

4.2.1 Určení obsahu organických látek pomocí ztráty žháním (Lost of ignition, LOI)

Tato poměrně jednoduchá metoda slouží k získávání poznatků ohledně hmotnosti organického materiálu, akumulovaného za určitou dobu na inkubovaném substrátu. Díky této metodě můžeme získat informace o množství veškerého organického materiálu, který se na jednotlivých lokalitách nachází a dopočítat i procentuální podíl uhlíku.

Zmražené vzorky byly rozmístěny do předem označených a zvážených smaltovaných keramických misek. Dále byly vzorky vysušeny v horkovzdušné sušárně po dobu 24 hodin na 105 °C. Po vysušení byly vzorky ihned přesunuty do exsikátoru tak, aby neabsorbovaly vzdušnou vlhkost a vážení bylo co nejpřesnější. Po zchladnutí sušiny v exsikátoru byly vzorky zváženy a poté vloženy na 4 hodiny do laboratorní pece o teplotě 550 °C. V peci došlo ke spálení veškerých organických látek. Po vytažení z pece a následném zchladnutí v exsikátoru byly vzorky opět zváženy na analytické váze. Z rozdílu mezi sušinou a zbytkem po vyžháním bylo stanoveno množství přítomné organické hmoty. Organická hmota byla následně přepočítána na uhlíkové ekvivalenty za použití koeficientu 0,45 (předpoklad 45 % obsahu uhlíku v organické hmotě – Meyer et al. 1981) a pro každý vzorek vypočten % podíl organického uhlíku.

4.2.2 Stanovení obsahu neutrálních sacharidů podle Duboise

Tato metoda se zakládá na dehydrataci cukrů koncentrovanou kyselinou sírovou a poté následné kondenzaci vzniklého furfuralu či 5-hydroxymethylfurfuralu s fenolem, za vzniku různě barevných kondenzačních produktů, které lze stanovit na spektrofotometru. Jedná se o neutrální sacharidy, tedy „pravé“ cukry a např. jejich aminoderiváty (Káš *et al.* 2005). Tato metoda je používána v mikrobiální ekologii jako proxy metoda stanovení množství přítomných biofilmů (Battin *et al.* 2003).

4.2.2.1 Roztoky a chemikálie

Koncentrovaná kyselina sírová, 5% vodný roztok fenolu ve vodě, základní roztok D-glukosy o koncentraci 100 µg/ml H₂O.

4.2.2.2 Pracovní postup

Nejdříve bylo nutné provést kalibraci s vodnými roztoky D-glukosy. Byl namíchán zásobní roztok D-glukosy o $c = 500 \mu\text{g/ml}$, ze kterého bylo napipetováno do osmi skleněných zkumavek 0; 0,25; 0,50; 0,75; 1; 1,25; 2 a 2,5 ml. Dále byl doplněn roztok do 1 ml vodou, u objemu 1,25; 2; 2,5 do 3 ml vodou. K naředěným roztokům D-glukosy bylo dále napipetováno z dávkovací láhve 1 ml 5% roztoku fenolu a 5 ml koncentrované kyseliny sírové. Směs byla ihned protřepána na horizontální kruhové třepačce, a poté nechána stát při laboratorní teplotě po dobu 30 minut, za exotermické reakce. Poté byla změřena na spektrofotometru při absorpenci 490 nm ve skleněných kyvetách, proti blanku (slepému pokusu – 1 ml 5% fenolu a 1 ml kyseliny sírové). Docházelo ke zbarvení vzorků od světle modré, přes světle červeno – hnědou až po světle hnědou (obr. 6).

Vynesením hodnot absorbance standardů proti množství glukosy v jednotlivých zkumavkách byl vytvořen kalibrační graf, kde byla provedena lineární závislost, která procházela počátkem. Poté byl interpolací z grafu stanoven průměrný procentuální obsah neutrálních sacharidů ve vzorku.



Obrázek 6: Příprava kalibrační křivky pro stanovení obsahu neutrálních sacharidů.

Foto: M. Firlová.

Následně byly podobnou metodou proměřeny i vzorky. Do každé zkumavky byl navážen cca 1 g zamraženého sedimentu s biofilmy, dále byl přidán 1 ml 5% roztoku fenolu 5 ml koncentrované kyseliny sírové. Zkumavky byly po dobu 10–20 s protřepány na třepáče a poté nechány v laboratorní teplotě 30 minut ležet. Následně byly vzorky změřeny v spektrofotometru při vlnové délce 490 nm ve skleněných kyvetách, a to proti blanku.

Vzorky sedimentů byly následně přesety přes jemné síto a propláchnuty destilační vodou. Takto upravený sediment byl vysušen v keramických miskách v horkovzdušné sušárně při 105 °C za účelem stanovení sušiny.

4.2.3 Zpracování dat

Všechna data byla zpracována v programu Microsoft Excel, a dále byly pomocí statistického softwaru R stanoveny korelace mezi jednotlivými roky a lokalitami. Byly k tomu použity statistické metody regresní analýza, ANOVA a dvouvýběrový t-test s nerovností rozptylů. Jednofaktorová analýza rozptylu (one-way ANOVA) byla použita k porovnání dat z jednotlivých lokalit v rámci jednoho roku. Dvouvýběrový t-test s nerovností rozptylů byl použit k rozlišení dat z jednotlivých let v rámci jedné lokality.

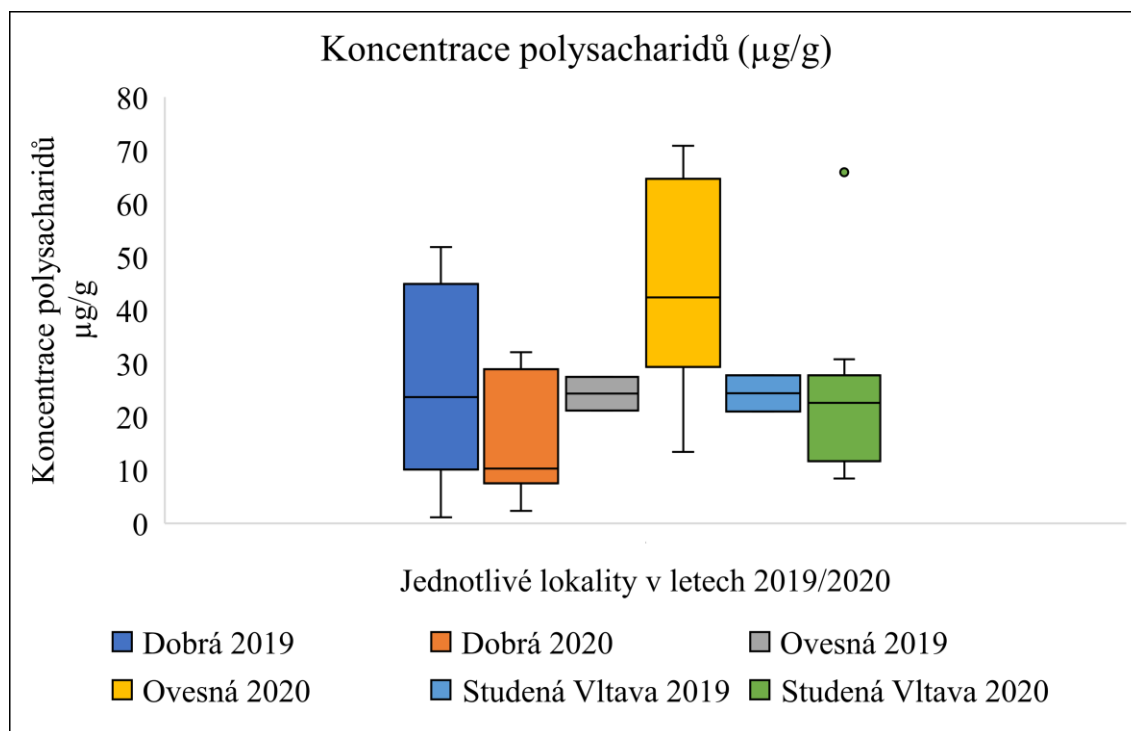
5 Výsledky

5.1 Stanovení koncentrace polysacharidů

Obsah polysacharidů ve vzorcích z malých válečků kolísal od 1,09 do 65,87 $\mu\text{g/g}$ sušiny, ve válcích pak od 1,35 do 31,3 $\mu\text{g/g}$ sušiny.

Množství polysacharidů zjištěné na jednotlivých lokalitách v roce 2020 se signifikantně lišilo ($P < 0,05$). Na lokalitě Dobrá byl pak zjištěn i signifikantní rozdíl mezi roky 2019 a 2020, přičemž v roce 2019 byla podstatně vyšší koncentrace polysacharidů než v roce 2020 ($P < 0,05$) (obr. 7).

Vzhledem k nedostatečnému množství velkých válců exponovaných v hloubce 10 a 20 cm, nebylo možné provést statistickou analýzu, která by porovnávala rozdíl mezi množstvím biofilmu v různé hloubce sedimentu. Přesto však u většiny lokalit byl zjištěn pokles koncentrace polysacharidů s rostoucí hloubkou. Koncentrace polysacharidů v hloubce 10 cm byla větší, než koncentrace v hloubce 20 cm.



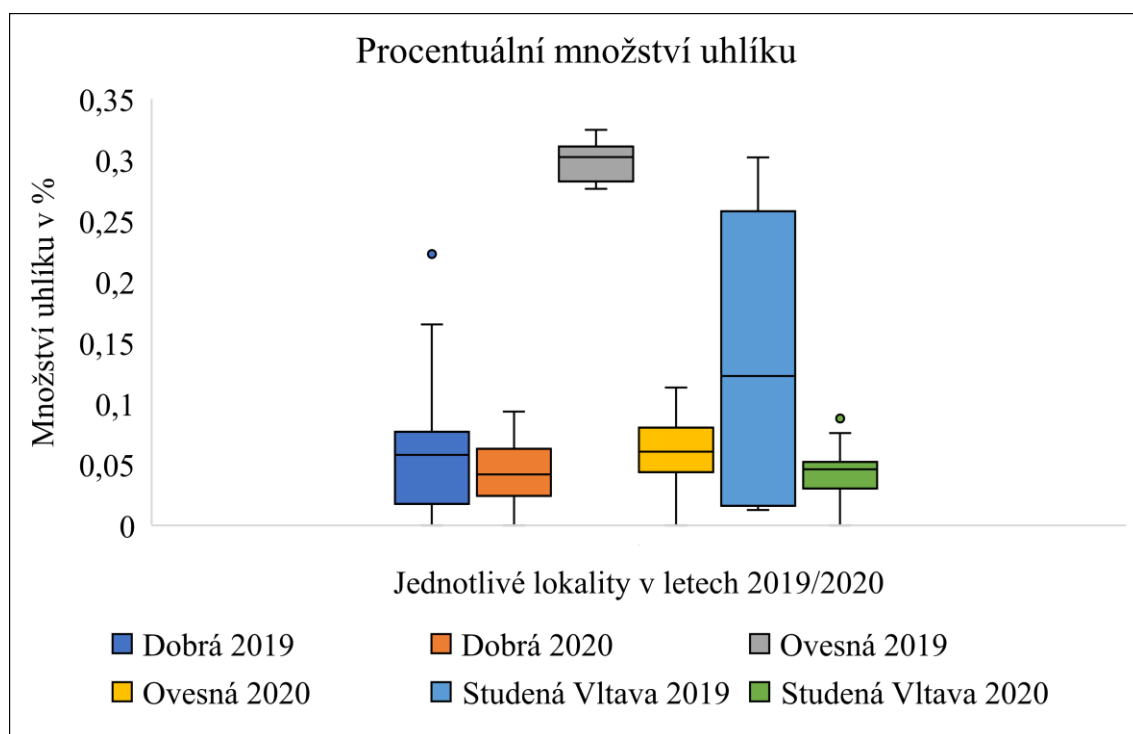
Obrázek 7: Graf koncentrace polysacharidů (ve válečcích i válcích) naměřených v letech 2019 a 2020 na jednotlivých lokalitách.

5.2 Procentuální obsah uhlíku

Průměrný procentuální obsah uhlíku v obou letech se pohyboval ve vzorcích z válečků od 0,008 % do 0,884 % a ve vzorcích z válců od 0,007 % do 0,3247 %.

Z hlediska procentuálního množství uhlíku nebyl mezi jednotlivými lokalitami v roce 2020 naměřen signifikantní rozdíl ($P > 0,05$), přičemž v těchto testech byla zohledněna všechna data (válece i válečky). Naproti tomu v roce 2019 byl mezi jednotlivými lokalitami naměřen vysoce signifikantní rozdíl a lokality se mezi sebou v rámci naměřeného uhlíku podstatně lišily ($P < 0,05$) (obr. 8).

Rozdíl obsahu uhlíku na lokalitě Ovesná a Dobrá mezi lety 2019 a 2020 byl vysoce signifikantní ($P < 0,05$). Na lokalitě Studená Vltava nebyl potvrzen signifikantní rozdíl mezi lety 2019 a 2020 ($P > 0,05$) (obr. 8).

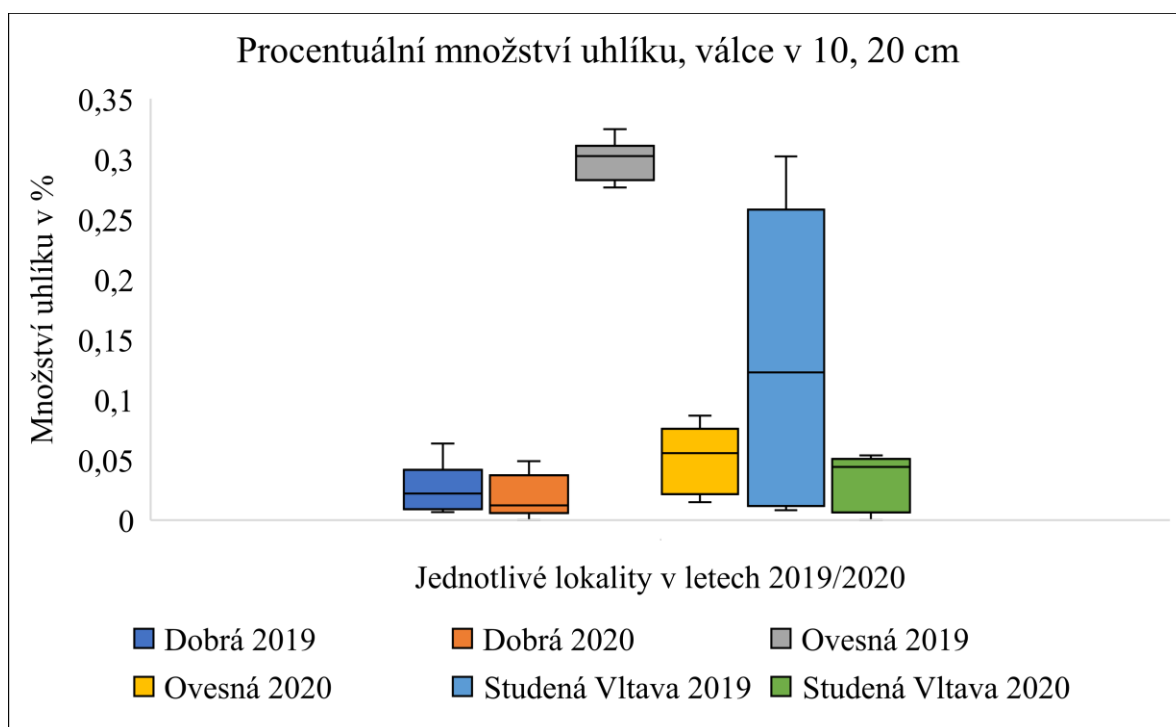


Obrázek 8: Graf procentuálního množství uhlíku naměřeného ve válcích i válečkách na jednotlivých lokalitách v letech 2019 a 2020.

Dále byla statistickým testům podrobena data ukazující procentuální množství uhlíku ve vzorcích jen z velkých válců v hloubkách 10 cm a 20 cm. V roce 2019 byl mezi daty z jednotlivých lokalit zjištěn signifikantní rozdíl ($P < 0,05$). V roce 2020 už tento rozdíl mezi daty z jednotlivých lokalit signifikantní nebyl ($P > 0,05$).

Testována byla i data jednotlivých lokalit v obou letech. Signifikantní rozdíl byl však zjištěn pouze u válců z lokality Ovesná ($P < 0,05$). U dat z lokalit Dobrá byl výsledek nesignifikantní ($P > 0,05$), stejně jako u dat z lokality na Studené Vltavě ($P > 0,05$) (obr. 9).

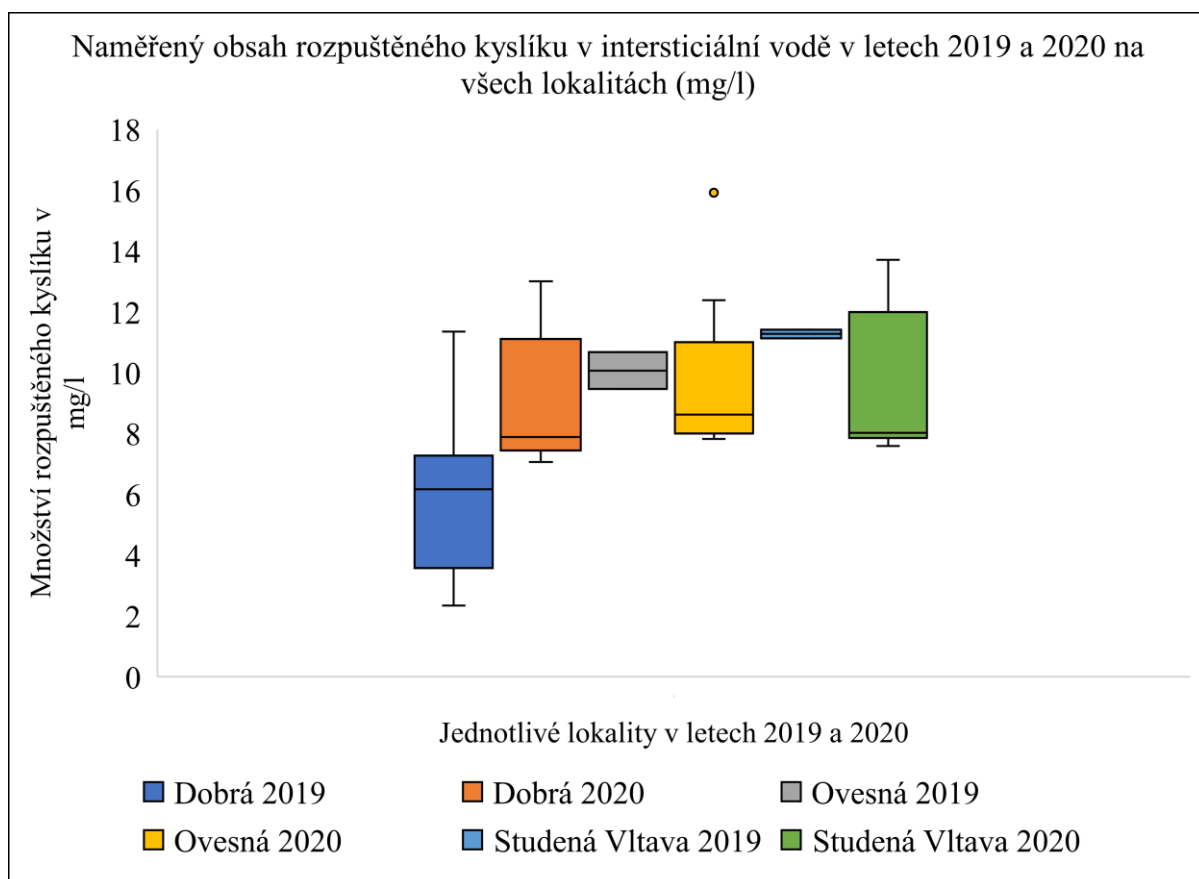
Procentuální množství organického uhlíku nevykazovalo žádný trend s rostoucí hloubkou sedimentu.



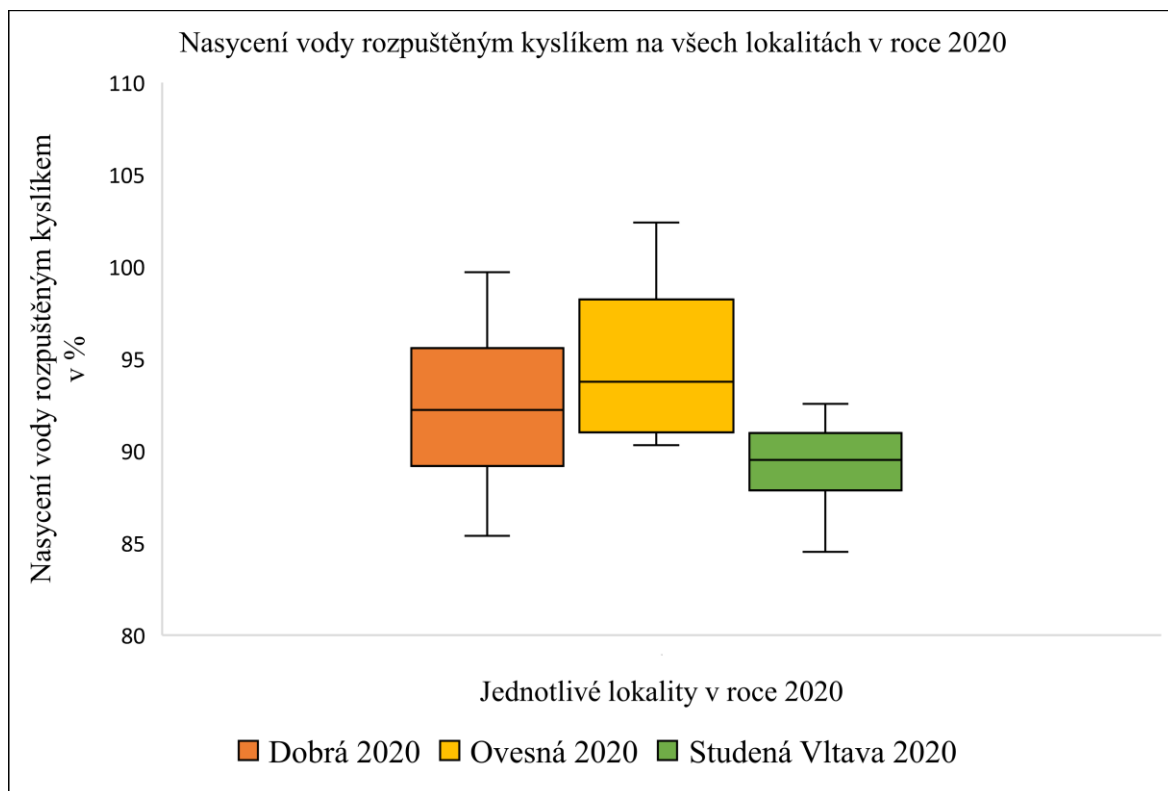
Obrázek 9: Graf procentuálního množství uhlíku naměřeného na jednotlivých lokalitách v letech 2019 a 2020, pouze data z válců v 10 cm a 20 cm.

5.3 Měření kyslíku v intersticiální vodě

Hodnoty obsahu rozpuštěného kyslíku v intersticiální vodě jednotlivých válečků značně kolísaly. V roce 2019 se hodnoty pohybovaly mezi 2,33-11,41 mg/l a v roce 2020 mezi 7,05-15,91 mg/l (obr. 10). Procentuální nasycení kyslíku kolísalo v roce 2020 mezi 84,53 % až 102,41 % (obr. 11).



Obrázek 10: Naměřený obsah kyslíku v intersticiální vodě ve všech válečcích i vácích v letech 2019 a 2020 na všech lokalitách (mg/l).



Obrázek 11: Nasycení vody rozpuštěným kyslíkem (procentuální) pouze ve válečcích na všech lokalitách v roce 2020.

5.4 Vztahy mezi studovanými parametry

Mezi výsledky procentuálního množství uhlíku v biofilmu a množstvím polysacharidů byla zjištěna pozitivně signifikantní korelace ($P < 0,05$), naznačující úzký vztah mezi oběma studovanými veličinami. Naopak mezi množstvím uhlíku i polysacharidů a kyslíkem rozpuštěným ve vodě nebyla zjištěna žádná signifikantní korelace ($P > 0,05$).

6 Diskuze

Cílem této práce bylo stanovit obsah polysacharidů a určit procentuální obsah uhlíku v sedimentech inkubovaných na lokalitách Dobrá, Ovesná a Studená Vltava v letech 2019 a 2020. Dále porovnat jednotlivé hodnoty společně s naměřeným kyslíkem v intersticiální vodě.

V naší studii jsme zjistili pozitivně signifikantní korelaci mezi procentuálním množstvím uhlíku v biofilmech a množstvím polysacharidů. Toto zjištění naznačuje, že obě metody použité pro kvantifikaci přítomných biofilmů, tedy určení obsahu organických látek pomocí ztráty žíhání (LOI) i stanovení obsahu neutrálních sacharidů podle Duboise si navzájem odpovídají a mohou být použity zástupně, popř. obě pro kontrolu. Větší rozvoj biofilmu obecně znamená jak zvýšení procentuálního množství uhlíku, tak i zvýšení koncentrace polysacharidů v daném vzorku (Meyer *et al.* 1981).

Při porovnání dat (uhlík/polysacharidy) pouze z velkých válců, uložených v hloubkách sedimentu 10 a 20 cm, korelace zjištěna nebyla. To mohlo být způsobeno malým množstvím nasbíraných dat, protože na každé lokalitě byly rozmístěny pouze 2 velké válce v 10 cm a v 20 cm.

6.1 Koncentrace polysacharidů

Ke stanovení koncentrace polysacharidů jsem využila metodu podle Duboise. Tato metoda je velice často používána právě v souvislosti se stanovením biofilmu (Romaní *et al.* 2008). Je tedy pravděpodobné, že i v tomto případě určila množství biofilmu poměrně přesně. Tím, že byla zjištěna i pozitivně signifikantní korelace s obsahem organických látek pomocí ztráty žíháním (LOI), se toto tvrzení jen upřesnilo (Batin *et al.* 2003).

Metoda je poměrně jednoduchá, rychlá a nevyžaduje mnoho finančních prostředků. Právě díky těmto výhodám byla zvolena také pro tento výzkum. Metod pro detekci biofilmových nárůstů i kvantifikace jejich aktivity je samozřejmě mnohem více (Rulík *et al.* 2011).

Původně jsme chtěli rovněž aplikovat metodu měření hydrolytické aktivity biofilmu pomocí fluorescein-diacetátu (FDA) (Battin 1997), bohužel však nebyly k dispozici čerstvé vzorky sedimentu, které jsou pro tuto analýzu nezbytně nutné. Vzorky použité v této práci byly ihned po odebrání zmrazeny.

Vzhledem k tomu, že koncentrace polysacharidů velice úzce souvisí s růstem biofilmů (Rulík *et al.* 2011), je možné konstatovat, že navzdory celoročně nízké teplotě vody (v roce 2019 se teplota říční vody pohybovala mezi 2,6-11,7 °C, v roce 2020 kolísala mezi 8-19,9 °C) se na všech třech lokalitách po určitý čas vytvořil na substrátu biofilm, který mohl ovlivňovat kyslíkové parametry či výskyt perlorodky říční.

Obsah polysacharidů ve vzorcích z válečků i z velkých válců značně kolísal. Přesto však poměrně dobře koresponduje s hodnotami z jiných studií, např. se studií Gerbersdorf (*et al.* 2008). Výsledky v této studii jsou jen o cca 12 µg/g nižší, což mohly zapříčinit také rozdílné teploty, u jednotlivých studií, intenzivnější proudění vody nebo větší množství analyzovaných vzorků sedimentu. Přestože to nebylo cílem této práce, autoři prokázali také stejný trend snižování koncentrace polysacharidů s klesající hloubkou odebíraných sedimentů s biofilmy.

Množství polysacharidů, které bylo v roce 2020 zjištěno na jednotlivých lokalitách se signifikantně lišilo. V roce 2019 bohužel nebylo na všech lokalitách rozmístěno dostatečné množství válečků, tím pádem nemohla být provedena analýza polysacharidů. Porovnání roků 2019 a 2020 bylo možné pouze v případě lokality Dobrá. Mezi těmito dvěma lety byl na lokalitě Dobrá zjištěn signifikantní rozdíl, přičemž v roce 2019 byl průměr naměřených polysacharidů vyšší. Přestože byly válečky v roce 2019 inkubovány v toku kratší dobu než v roce 2020, bylo zde naměřeno vyšší množství polysacharidů. To by mohlo být způsobeno nižší teplotou vody v roce 2020, popř. intenzivnějším prouděním vody či nadměrným výskytem konzumentů biofilmů v daný čas v daném území (Sabater *et al.* 2002).

6.2 Množství celkového organického uhlíku

Do řek se dostává uhlík ve formě CO₂ z atmosféry, ale také biologickými procesy ve vodním prostředí. K produkci organické hmoty, a tedy i uhlíku přispívá i mikrobiální biofilm, proto je možné použít k detekci biofilmových nárostů také analýzu množství celkového organického uhlíku (TOC) v sedimentu. Ne všechny uhlík však pochází pouze z biofilmu, část rozpuštěného (DOC) i partikulovaného (POC) uhlíku z okolní vody se může akumulovat rovněž adhezí přímo na sedimentech či na povrchu biofilmů (Koutný *et Rulík* 2007).

Výsledky celkového organického uhlíku naměřeného ve válečcích i válcích v roce 2019 byly signifikantně vyšší než v roce 2020, a to i přesto, že byly ve dně ponechány v roce 2020 o něco déle.

Při analýze dat z velkých válců, uložených v 10 a 20 cm v sedimentu byl v roce 2019 naměřen také signifikantně vyšší rozdíl na všech lokalitách než v roce 2020.

Mezi jednotlivými lety 2019 a 2020 byl naměřen signifikantní rozdíl na lokalitách Dobrá a Ovesná, přičemž u obou těchto lokalit bylo opět zjištěno vyšší množství organického uhlíku v roce 2019.

To, že ze všech výše uvedených analýz vyplývá signifikantně větší množství uhlíku v roce 2019 by mohlo být ovlivněno řadou faktorů. Mírným rozdílem teploty při inkubaci válců a válečků v sedimentu, nadměrným výskytem konzumentů nebo nejpravděpodobněji rozdílnou rychlostí proudění vody skrz sediment v jednotlivých letech.

Proudění vody skrz sediment je totiž závislé na aktuálních průtocích daného toku. Jestliže je proudění rychlejší, dochází také k vyššímu pohybu sedimentů a proudění vody přes sediment a může dojít i k většímu zachytávání organické hmoty a uhlíku (Rulík et al. 2001).

Je možné, že za tento rozdíl mohl i charakter dna na studovaných lokalitách (a to i přestože nárostový substrát, na kterém byl biofilm inkubován, byl použit ve všech válcích i válečcích stejný): na lokalitě Dobrá standardní štěrkopískové dno, na lokalitě Ovesná štěrkopískové dno s větším zastoupením písku a na lokalitě Studená Vltava je charakter dna spíše štěrkopískový s většími kameny.

6.3 Měření kyslíku v intersticiální vodě

Naměřené hodnoty obsahu kyslíku v intersticiálních vodách v jednotlivých válečcích v průběhu experimentu značně kolísaly. Ovlivněno to mohlo být zvýšenou akumulací jemného organického materiálu (FPOM) v průběhu měření, ale také tvorbou biofilmu na inkubovaném sedimentu.

Obecně byl obsah rozpuštěného kyslíku poměrně vysoký. Porovnatelný by byl se studií Hlaváčová (*et al.* 2003) – v této studii se obsah rozpuštěného kyslíku v intersticiální vodě pohyboval v rozmezí 2-15 mg/l, zatímco v naší studii v roce 2019 v rozmezí 2-11 mg/l v

roce 2020 pak kolísal mezi 7-16 mg/l. Toto výrazné kolísání odráží značnou heterogenitu hyporheického prostředí (granulometrie, rychlost a směr proudění intersticiální vody).

Mezi množstvím uhlíku/polysacharidů a kyslíkem rozpuštěným ve vodě nebyla zjištěna žádná korelace.

Vyvrátili jsme tak původní pracovní hypotézu, že se stoupajícím množstvím biofilmů ve vzorcích bude klesat hodnota kyslíku v intersticiální vodě. Množství biofilmů nejspíše tedy nemá vliv na množství naměřeného kyslíku v intersticiální vodě.

7 Závěr

Biofilmové nárosty jsou beze sporu nepostradatelnou součástí všech správně fungujících vodních ekosystémů, přičemž přítoky Vltavy i řeka samotná nejsou žádnou výjimkou.

Ačkoliv výsledky jednotlivých měření uhlíku i polysacharidů mezi lokalitami i lety značně kolísaly, mezi použitými metodami odhadu tvorby biofilmu byla nalezena pozitivní korelace.

Rozdíly mohly být ovlivněny řadou vnějších vlivů např. teplotou či aktuálním průtoky v daných řekách.

Korelace mezi obsahem kyslíku a polysacharidů/uhlíku v říčním sedimentu zjištěna nebyla, bylo by tedy teoreticky možné konstatovat, že biofilmové nárosty neovlivňují obsah kyslíku v intersticiální vodě, a tedy nejspíše neovlivňují ani vývoj juvenilů perlorodky říční.

Tento závěr je však nutno potvrdit i dalšími studiemi, které se budou na toto téma provádět v následujících letech.

Literatura

- Andriana R., Engel F.G., Gusmao J.B. *et al.* 2021. Intertidal mussel reefs change the composition and size distribution of diatoms in the biofilm. *Marine Biology* [online]. 168(3) [cit. 2021-03-06]. DOI: 10.1007/s00227-020-03819-2. ISSN 0025-3162. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00227-020-03819-2>
- Arnon S., Marx L.P., Searcy K.E., Packman A.I. 2009. Effects of overlying velocity, particle size, and biofilm growth on stream-subsurface exchange of particles. *Hydrological Processes* [online]. [cit. 2021-02-20]. DOI: 10.1002/hyp.7490. ISSN 08856087. Dostupné na internete: <http://doi.wiley.com/10.1002/hyp.7490>
- Azam F., Fenchel T., Field J.G., Gray J.S., Meyer-Reil L.A. *et al.* 1983. The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. *Marine Ecology Progress Series*. 10: 257-263. DOI: 10.3354/meps010257. ISSN 0171-8630
- Barlocher F., Murdoch J.H. 1989. Hyporheic biofilms — a potential food source for interstitial animals. *Hydrobiologia* [online]. 184(1-2): 61-67 [cit. 2021-02-20]. DOI: 10.1007/BF00014302. ISSN 0018-8158. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00014302>
- Baschien C., Manz W., Neu T.R., Marvanová L., Szewzyk U. 2008. In Situ Detection of Freshwater Fungi in an Alpine Stream by New Taxon-Specific Fluorescence In Situ Hybridization Probes. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 74(20): 6427-6436 [cit. 2021-02-20]. DOI: 10.1128/AEM.00815-08. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <https://AEM.asm.org/content/74/20/6427>
- Battin T. J. Assessment of fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total esterase activity in natural stream sediment biofilms. *Science of The Total Environment* [online]. 1997, 198(1), 51-60 [cit. 2021-02-20]. ISSN 00489697. DOI:10.1016/S0048-9697(97)05441-7.
- Battin T.J., Besemer K., Bengtsson M.M., Romani A.M., Packmann A.I. 2016. The ecology and biogeochemistry of stream biofilms. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 14(4): 251-263 [cit. 2020-11-03]. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.15. ISSN 1740-1526. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nrmicro.2016.15>
- Battin T.J., Kaplan L.A., Newbold J.D., Cheng X., Hansen C. 2003. Effects of Current Velocity on the Nascent Architecture of Stream Microbial Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 69(9): 5443-5452 [cit. 2021-04-09]. DOI: 10.1128/AEM.69.9.5443-5452.2003. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <https://AEM.asm.org/content/69/9/5443>
- Battin T.J., Sloan W.T., Kjelleberg S., Daims H., Head I.M., Curtis T.P., Eberg L. 2007. Microbial landscapes: new paths to biofilm research. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 5(1): 76-81 [cit. 2020-11-03]. DOI: 10.1038/nrmicro1556. ISSN 1740-1526. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nrmicro1556>

- Battin T.J., Willw A., Sattle B., Psenner R. 2001. Phylogenetic and Functional Heterogeneity of Sediment Biofilms along Environmental Gradients in a Glacial Stream. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 67(2): 799-807 [cit. 2021-02-20]. DOI: 10.1128/AEM.67.2.799-807.2001. ISSN 1098-5336. Dostupné z: <https://AEM.asm.org/content/67/2/799>
- Bauer G. 1987. Reproductive Strategy of the Freshwater Pearl Mussel *Margaritifera margaritifera*. *The Journal of Animal Ecology* [online]. 56(2) [cit. 2020-11-03]. DOI: 10.2307/5077. ISSN 00218790. Dostupné z: <https://www.jstor.org/stable/5077?origin=crossref>
- Bauer G. 1988. Threats to the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* L. in Central Europe. *Biological Conservation* [online]. 45(4): 239-253 [cit. 2020-11-03]. DOI: 10.1016/0006-3207(88)90056-0. ISSN 00063207. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006320788900560>
- Bauer G., Wächtler K. *et al.* 2001. Ecology and Evolution of the Freshwater Mussels Unionoida [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg [cit. 2020-11-03]. Ecological Studies. DOI: 10.1007/978-3-642-56869-5. ISBN 978-3-642-63140-5.
- Besemer K. 2015. Biodiversity, community structure and function of biofilms in stream ecosystems. *Research in Microbiology* [online]. 166(10): 774-781 [cit. 2021-02-09]. DOI: 10.1016/j.resmic.2015.05.006. ISSN 09232508. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923250815000819>
- Böhme A., Risse-Buhl U., Küsel K. 2009. Protists with different feeding modes change biofilm morphology. *FEMS Microbiology Ecology* [online]. 69(2): 158-169 [cit. 2021-02-09]. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2009.00710.x. ISSN 01686496. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsec/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6941.2009.00710.x>
- Buriánková I., Brablcová L., Mach V., Hýblová A., Badurová P., Cupalová J., Rulík M. *et al.* 2012. Methanogens and methanotrophs distribution in the hyporheic sediments of a small lowland stream. *Fundamental and Applied Limnology* [online]. 181(2): 87-102 [cit. 2021-02-09]. DOI: 10.1127/1863-9135/2012/0283. ISSN 1863-9135. Dostupné z: http://www.schweizerbart.de/papers/fal/detail/181/78437/Methanogens_and_methanotrophs_distribution_in_the_?af=crossref
- Costerton J.W., Cheng K.J., Geesey G.G., Ladd T.I., Nickel J.C., Dasgupta M., Marrie T.J. 1987. Bacterial Biofilms in Nature and Disease. *Annual Review of Microbiology* [online]. 41(1): 435-464 [cit. 2020-11-09]. DOI: 10.1146/annurev.mi.41.100187.002251. ISSN 0066-4227. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.mi.41.100187.002251>
- Costerton J.W. 1999. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* [online]. 284(5418): 1318-1322 [cit. 2021-02-15]. DOI: 10.1126/science.284.5418.1318. ISSN 00368075. Dostupné z: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.284.5418.1318>

- Das M., Royer T.V., Leff L.G. 2007. Diversity of Fungi, Bacteria, and Actinomycetes on Leaves Decomposing in a Stream. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 73(3): 756-767 [cit. 2021-02-09]. DOI: 10.1128/AEM.01170-06. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <https://AEM.asm.org/content/73/3/756>
- Donlan R.M., Costerton J.W. 2002. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 15(2): 167-193 [cit. 2020-11-09]. DOI: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <https://CMR.asm.org/content/15/2/167>
- Donlan R.M. 2001. Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 33(8): 1387-1392 [cit. 2020-11-09]. DOI: 10.1086/322972. ISSN 1058-4838. Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/322972>
- Dürr S., Thomason J.C. *et al.* *Biofouling*. 1 st ed. School of Biology, Newcastle University Newcastle-upon-Tyne, UK: Blackwell Publishing Ltd. ISBN 978-1-4051-6926-4.
- Fasching C., Ulseth A.J., Schelker J., Steniczka G., Battin T.J. 2016. Hydrology controls dissolved organic matter export and composition in an Alpine stream and its hyporheic zone. *Limnology and Oceanography* [online]. 61(2): 558-571 [cit. 2021-02-20]. DOI: 10.1002/lno.10232. ISSN 0024-3590. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/lno.10232>
- Fischer H., Kloep F., Wilczek S., Pusch M.T. 2005. A River's Liver – Microbial Processes within the Hyporheic Zone of a Large Lowland River. *Biogeochemistry* [online]. 76(2): 349-371 [cit. 2021-02-20]. DOI: 10.1007/s10533-005-6896-y. ISSN 0168-2563. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10533-005-6896-y>
- Fried J., Maye G., Berger H., Traunspurger W., Psenner R., Lemmer H. 2000. Monitoring protozoa and metazoa biofilm communities for assessing wastewater quality impact and reactor up-scaling effects. *Water Science and Technology* [online]. 41(4-5): 309-316 [cit. 2020-11-09]. DOI: 10.2166/wst.2000.0460. ISSN 0273-1223. Dostupné z: <https://iwaponline.com/wst/article/41/4-5/309/10135/Monitoring-protozoa-and-metazoa-biofilm>
- Geesey G.G., Mutch R., Costerton J.W., Green R.B. 1978. Sessile bacteria: An important component of the microbial population in small mountain streams 1. *Limnology and Oceanography* [online]. 23(6): 1214-1223 [cit. 2021-01-25]. DOI: 10.4319/lo.1978.23.6.1214. ISSN 00243590. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.4319/lo.1978.23.6.1214>
- Gerbersdorf S.U., Jancke T., Westrich B., Paterson D.M. 2008. Microbial stabilization of riverine sediments by extracellular polymeric substances. *Geobiology* [online]. 2008(6): 57-69 [cit. 2021-01-25]. DOI: 10.1111/j.1472-4669.2007.00120.x. ISSN 1472-4677. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-4669.2007.00120.x>

Giorgio P. E. del, Williams J. le B. 2005. *Respiration in Aquatic Ecosystems*. 1. Oxford, UK: Oxford university Press. ISBN 0198527098.

Heino J., Tolkkinen M., Pirttilä A. M., Aisala H., Mykrä H., Maggs C. 2014. Microbial diversity and community-environment relationships in boreal streams. *Journal of Biogeography* [online]. 41(12): 2234-2244 [cit. 2021-02-09]. DOI: 10.1111/jbi.12369. ISSN 03050270. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jbi.12369>

Hlaváčová E., Rulík M., Čáp L. 2005. Anaerobic microbial metabolism in hyporheic sediment of a gravel bar in a small lowland stream. *River Research and Applications* [online]. 21(9), 1003-1011 [cit. 2021-5-2]. ISSN 1535-1459. DOI:10.1002/rra.866

Holá V., Růžička F., Rulík M., Otava M. *et al.* 2011. Význam biofilmu v medicíně. *Mikrobiální biofilmy*. 1. vyd. Olomouc: ESCMID, s. 57-62. ISBN 978-80-2747-8.

Jackson E. F., Jackson C. 2008. Viruses in wetland ecosystems. *Freshwater Biology* [online]. 53(6): 1214-1227 [cit. 2021-02-09]. DOI: 10.1111/j.1365-2427.2007.01929.x. ISSN 00465070. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2427.2007.01929.x>

Johnson L.R. 2008. Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria. *Journal of Theoretical Biology* [online]. 251(1): 24-34 [cit. 2021-02-15]. DOI: 10.1016/j.jtbi.2007.10.039. ISSN 00225193. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022519307005188>

Káš J., Kodíček M., Valentová O. 2005. *Laboratorní techniky biochemie*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. ISBN 80-7080-586-2.

Koutný J., Rulík M. 2007. Hyporheic Biofilm Particulate Organic Carbon in a Small Lowland Stream (Sitka, Czech Republic): Structure and Distribution. *International Review of Hydrobiology* [online]. 92(4-5), 402-412 [cit. 2021-5-2]. ISSN 14342944. DOI:10.1002/iroh.200610989

Landry M.R. 2002. Integrating classical and microbial food web concepts: evolving views from the open-ocean tropical Pacific. *Hydrobiologia* [online]. 480(13): 29-39. DOI: 10.1023/A:1021272731737. ISSN 00188158. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1021272731737>

Leichtfried, M., 1985. Organic matter in gravel streams (Project Ritrodat-Lunz). *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 22: 2058-2062.

Leichtfried M., 1995. Organic matter in bedsediments—an energy source for lotic ecosystems (a compilation of a long term study). *Folia Fac. Nat. Univ. Masarykianae Brunensis, Biologia*: 77-93.

Lock M.A., Wallace R.R., Costerton J.W., Ventullo R.M., Charlton S.E. 1984. River Epilithon: Toward a Structural-Functional Model. *Oikos* [online]. 42(1). DOI: 10.2307/3544604. ISSN 00301299. Dostupné z: <https://www.jstor.org/stable/3544604?origin=crossref>

Meyer, J.L., Likens, G.E. & Sloane, J., 1981: Phosphorus, nitrogen, and organic carbon flux in a headwater stream. – *Arch. Hydrobiol.* 91: 28–44.

Meyers T.R., Millemann R.E. 1977. Glochidiosis of Salmonid Fishes. I. Comparative Susceptibility to Experimental Infection with *Margaritifera margaritifera* (L.) (Pelecypoda: Margaritanidae). *The Journal of Parasitology* [online]. 63(4) [cit. 2020-11-03]. DOI: 10.2307/3279583. ISSN 00223395. Dostupné z: <https://www.jstor.org/stable/3279583?origin=crossref>

Neu T.R., Lawrence J.R. 1997. Development and structure of microbial biofilms in river water studied by confocal laser scanning microscopy. *FEMS Microbiology Ecology* [online]. 24(1): 11-25 [cit. 2020-11-03]. DOI: 10.1111/j.1574-6941.1997.tb00419.x. ISSN 01686496. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsec/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6941.1997.tb00419.x>

Olapade O.A., Leff L.G. 2005. Seasonal Response of Stream Biofilm Communities to Dissolved Organic Matter and Nutrient Enrichments. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 71(5): 2278-2287 [cit. 2021-02-09]. DOI: 10.1128/AEM.71.5.2278-2287.2005. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <https://AEM.asm.org/content/71/5/2278>

Pohlon E., Marxsen J., Küsel K. 2010. Pioneering bacterial and algal communities and potential extracellular enzyme activities of stream biofilms. *FEMS Microbiology Ecology* [online]. 71(3): 364-373 [cit. 2021-03-08]. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2009.00817.x. ISSN 01686496. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsec/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6941.2009.00817.x>

Pomeroy L.R., Williams P.J., Azam F., Hobbie J. 2007. The Microbial Loop. *Oceanography* [online]. 20(2): 28-33 [cit. 2021-04-09]. DOI: 10.5670/oceanog.2007.45. ISSN 10428275. Dostupné z: <https://tos.org/oceanography/article/the-microbial-loop>

Pusch M. 1996. The metabolism of organic matter in the hyporheic zone of a mountain stream, and its spatial distribution. *Hydrobiologia* [online]. 323(2): 107-118 [cit. 2021-02-20]. DOI: 10.1007/BF00017588. ISSN 0018-8158. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00017588>

Rulík M., Holá V., Růžička F., Votava M. 2011. *Mikrobiální biofilmy*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. ISBN 978-80-244-2747-8.

Rulík M., Zavřelová P., Duchoslav M. 2001. Decomposition of Two Different POM Types in Surface Water and within Hyporheic Sediments of a Small Lowland Stream (Sitka, Czech Republic). *International Review of Hydrobiology* [online]. 86(4-5), 487-500 [cit. 2021-5-2]. ISSN 1434-2944. DOI:10.1002/1522-2632(200107)86:4/5487::AID-IROH4873.0.CO;2-U

Sabater S., Guasch H., Romaní A., Muñoz I. 2002. The Effect of Biological Factors on the Efficiency of River Biofilms in Improving Water Quality. *Hydrobiologia* [online]. 469(13): 149-156 [cit. 2021-04-20]. DOI: 10.1023/A:1015549404082. ISSN 00188158. Dostupné na internete: <http://link.springer.com/10.1023/A:1015549404082>

Simon M., Grossart H.P., Schweitzer B., Ploug H. 2002. Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. *Aquatic Microbial Ecology* [online]. 28: 175-211 [cit. 2021-02-20]. DOI: 10.3354/ame028175. ISSN 0948-3055. Dostupné z: <http://www.int-res.com/abstracts/ame/v28/n2/p175-211/>

Simon O.P., Vaníčková I., Bílý M., Douda K., Patzenhauerová H., Hruška J., Peltánová A. 2015. The status of freshwater pearl mussel in the Czech Republic: Several successfully rejuvenated populations but the absence of natural reproduction. *Limnologia* [online]. 50: 11-20 [cit. 2020-11-03]. DOI: 10.1016/j.limno.2014.11.004. ISSN 00759511. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0075951114000772>

Simon O., Tichá K., Rambousková K. 2018. *Metodika podpory perlorodky říční (Margaritifera margaritifera)*. Praha: Výzkumný ústav vodohospodářský T.G. Masaryka, v.v.i. ISBN 978-80-87402-63-4.

Gethin R.T., Taylor J. *et al.* 2010. Captive breeding of the endangered freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera*. *Endangered Species Research* [online]. 12(1): 1-9 [cit. 2020-11-03]. DOI: 10.3354/esr00286. ISSN 1863-5407. Dostupné z: <http://www.int-res.com/abstracts/esr/v12/n1/p1-9/>

Van Horn J.D., Sinsabaugh R.L., Takacs-Vesbach C.D., Mitchell K.R., Dahm C.N. 2011. Response of heterotrophic stream biofilm communities to a gradient of resources. *Aquatic Microbial Ecology* [online]. 64(2): 149-161 [cit. 2020-11-03]. DOI: 10.3354/ame01515. ISSN 0948-3055. Dostupné z: <http://www.int-res.com/abstracts/ame/v64/n2/p149-161/>